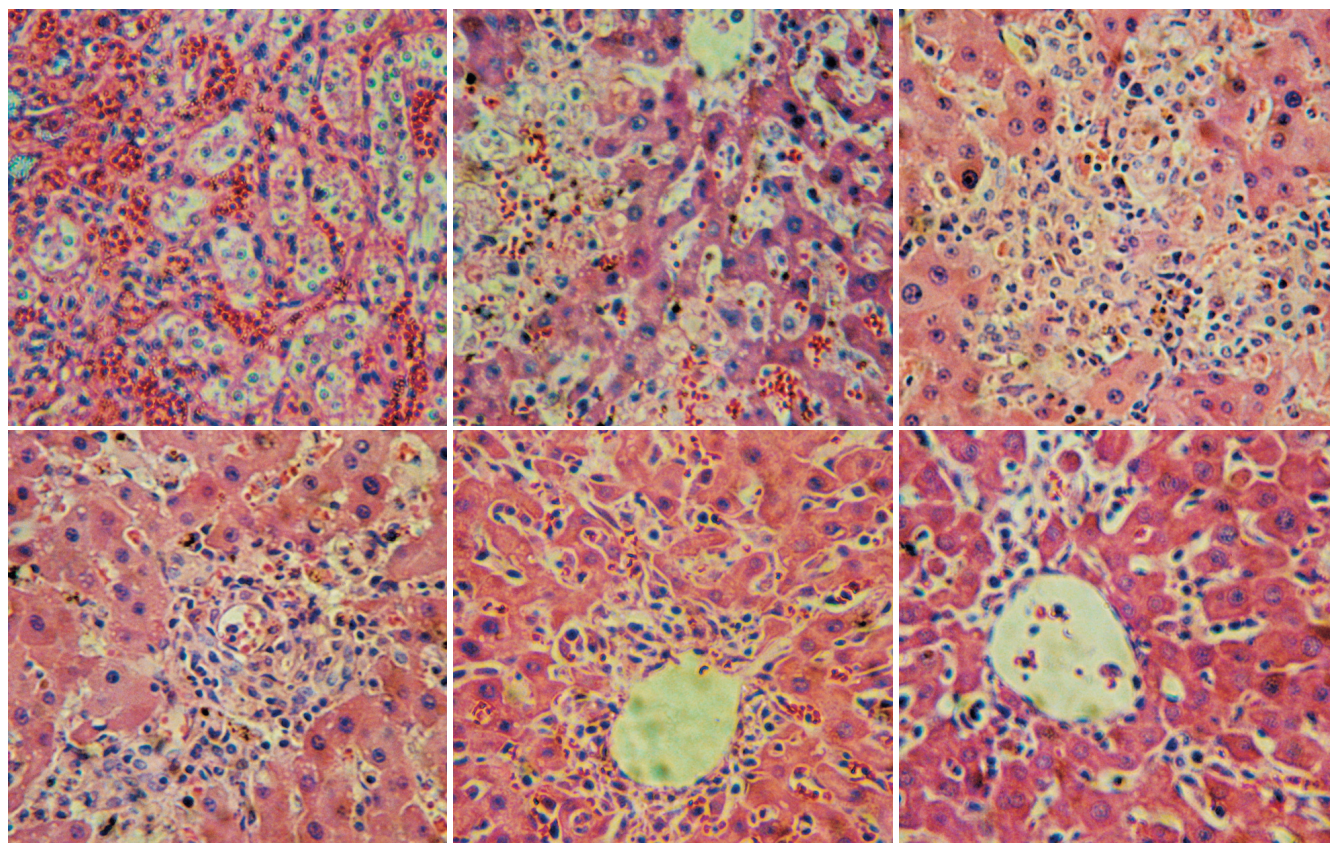


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 4 月 18 日 第 15 卷 第 11 期 (Volume 15 Number 11)



11 / 2007

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  
黄象谦教授  
黄志强教授  
裘法祖教授  
王宝恩教授  
危北海研究员  
吴孟超教授  
杨春波教授  
周殿元教授

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

陈士葆教授  
房殿春教授  
纪小龙教授  
姜洪池教授  
王苑本教授  
吴云林教授  
徐克成教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
岳茂兴教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 常务编委

成军教授  
程英升副教授  
范学工教授  
高毅主任医师  
江学良主任医师  
李岩教授  
刘连新教授  
吕宾教授  
罗和生教授  
聂青和副教授  
王小众教授

### 编委

白爱平主治医师

白文元教授  
白玉贤教授  
别平教授  
蔡淦教授  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
曹洁副教授  
曹志成院士  
苒新明教授  
陈国凤主任医师

陈公球主任医师  
陈海龙教授  
陈红松副研究员  
陈积圣教授  
陈建杰教授  
陈建荣副教授  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凇教授  
陈尼维主任医师  
陈其奎教授  
陈强谱教授  
陈仕珠主任医师  
陈卫昌教授  
陈耀凯副教授  
陈贻胜教授  
陈玉林教授  
陈知水教授  
陈治水主任医师  
陈祖林副教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程红岩教授  
程树群副教授  
迟宝荣教授  
迟强教授  
崔乃强教授  
崔彦教授  
崔毅主任医师  
崔云甫教授  
代文杰教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
党双锁副教授  
邓长生教授

丁士刚主任医师  
丁义涛教授  
丁佑铭教授  
董蕾教授  
董明主任医师  
杜群副研究员  
杜祥教授  
樊红副教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
范志宁主任医师  
房静远教授  
冯红主任医师  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高成新教授  
高春芳研究员  
高峰教授  
高润平教授  
高英堂研究员  
戈之铮教授  
龚国忠教授  
龚建平教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
关玉盘教授  
管冬元副教授  
郭克建教授  
郭晓钟教授  
郭新宁教授  
韩天权教授  
韩新巍教授  
郝春秋副教授  
郝俊鸣副主任医师  
何超教授  
何生教授  
何生松教授  
何裕隆教授  
何振平教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授

胡和平主任医师  
黄恒青主任医师  
黄金华副教授  
黄文林教授  
黄晓东副主任医师  
黄颖秋教授  
黄裕新教授  
黄志勇副教授  
霍丽娟主任医师  
季国忠副教授  
季加孚教授  
姜波健教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
江家骥教授  
蒋龙元副教授  
金懋林教授  
金瑞教授  
匡安仁教授  
兰平教授  
蓝宇教授  
劳绍贤教授  
黎乐群教授  
李定国教授  
李东辉教授  
李方儒教授  
李国威教授  
李华山副主任医师  
李继强教授  
李健丁教授  
李杰副教授  
李靖副教授  
李军祥教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李淑德教授  
李涛主治医师  
李小荣教授  
李晓宇主任医师  
李旭副教授  
李延青教授  
李永哲副研究员  
李玉民教授  
李玉明教授  
李瑜元教授  
李瑗教授

李增山副教授  
李兆申教授  
李振华教授  
李智伟教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
林胜璋副教授  
林勇讲师  
林志辉教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘冰熔教授  
刘成海研究员  
刘海林主任医师  
刘建教授  
刘鲁明教授  
刘平教授  
刘杞教授  
刘铁夫教授  
刘颖斌副教授  
刘勇钢副主任医师  
刘云鹏教授  
刘占举教授  
刘志苏教授  
刘正稳教授  
刘作金副教授  
龙致贤教授  
卢榜裕教授  
鲁华玉研究员  
陆才德教授  
陆伦根教授  
陆云飞教授  
禄韶英主治医师  
吕明德教授  
吕宁主任医师  
吕云福教授  
吕志武教授  
马大烈教授  
马金城教授  
马力文主任医师  
茅爱武主任医师  
毛高平主任医师  
梅林教授  
梅铭惠教授  
孟庆华教授



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

宁琴教授	宋于刚教授	王学美研究员	严以群主任医师	张晓岚教授
倪润洲教授	宋振顺教授	王怡主任医师	阎晓初副教授	张绪清副教授
牛建昭教授	孙诚谊教授	王正康教授	杨冬华教授	张学教授
牛俊奇教授	孙殿兴主任医师	王志刚副主任医师	杨广顺教授	张肇达教授
欧希龙副教授	孙富强副教授	王忠裕教授	杨建民教授	张占卿主任医师
潘林娜教授	孙家邦教授	卫洪波教授	杨建勇教授	张志坚教授
潘兴华副主任医师	孙侃教授	魏经国教授	杨林副研究员	张宗明教授
潘秀珍教授	孙秀发教授	魏来教授	杨维良教授	赵桂鸣主任医师
彭波副教授	孙学英教授	闻勤生教授	杨希山教授	赵桂珍教授
彭吉润主任医师	孙延平副主任医师	吴德全教授	杨尹默教授	赵景民教授
彭曦副研究员	邵升副教授	吴河水教授	杨幼林主任医师	赵连三教授
彭心宇教授	谭德明教授	吴建国教授	杨云生教授	赵平副教授
彭志海教授	谭学瑞教授	吴健雄教授	杨昭徐教授	赵晓晏教授
朴熙绪主任医师	汤恢煊教授	吴金术教授	姚登福教授	赵增仁副主任医师
朴云峰教授	汤展宏副教授	吴君主任医师	姚鹏副教授	郑加生主任医师
钱建民教授	唐采白副教授	吴萍主任医师	姚树坤教授	郑民华教授
钱林学主任医师	唐芙爱教授	吴晴教授	叶红军主任医师	郑鹏远教授
秦波教授	唐霓副研究员	吴泰璜教授	伊力亚尔·夏合丁教授	智发朝教授
秦成勇教授	唐丽安教授	吴晓东教授	阴赅宏研究员	钟德珩教授
秦春宏副主任医师	唐世刚教授	吴志勇教授	殷正丰教授	周伯平教授
秦华东教授	唐文富主治医师	席启主任医师	于恩达教授	周丁华主任医师
秦环龙教授	唐文皓副主任医师	夏建川研究员	于聪慧教授	周国雄主任医师
秦仁义教授	唐晓鹏教授	向德兵讲师	于红刚副教授	周士胜教授
邱宝安主任医师	唐旭东主任医师	肖恩华教授	于健春教授	周伟平教授
邱双健副教授	唐志鹏研究员	谢敏主任医师	于良副教授	周文兴教授
邱伟华副主任医师	田德安主任医师	谢青教授	于晓峰主任医师	周霞秋教授
仇毓东副教授	田素礼教授	谢晓华副教授	于颖彦教授	周晓东研究员
裘正军教授	童强主任医师	邢光明教授	于则利教授	周晓武副主任医师
曲智威副主任医师	屠红副研究员	熊斌教授	余宏宇教授	朱传武副主任医师
任超世研究员	万军教授	徐爱民副教授	郁宝铭教授	朱春兰主任医师
任粉玉副教授	汪波副主任医师	徐存拴教授	郁正亚副教授	朱立元教授
任建安教授	汪思应教授	徐大华主任医师	喻荣彬副教授	朱人敏教授
任建林教授	王邦茂教授	徐德忠教授	袁伟建教授	庄林主任医师
邵成浩讲师	王炳元教授	徐列明教授	曾勇教授	邹小明教授
邵先玉教授	王承党副教授	徐宁志研究员	展玉涛副主任医师	左国营副主任药师
邵永孚教授	王春友教授	徐小元教授	张柏和教授	
沈洪教授	王广义教授	徐秀英副教授	张方信主任医师	
沈俊教授	王济明教授	徐迎新研究员	张凤春教授	
沈琳主任医师	王吉耀教授	徐智教授	张国梁主任医师	
沈世强教授	王健生副教授	许春舫主任医师	张集昌主任医师	
沈守荣教授	王凯教授	许戈良教授	张吉翔教授	
沈薇教授	王莉瑛教授	许乐主任医师	张锦生教授	
沈岩主任医师	王烈主任医师	许玲副教授	张军教授	
施诚仁教授	王鲁副教授	许文燮教授	张明辉副主任医师	
施瑞华教授	王石林主任医师	许亚平副教授	张青云研究员	
师英强博士	王晓艳副教授	宣世英教授	张群华教授	
石统东副教授	王效民教授	闫惠平研究员	张水军教授	
宋世兵主任医师	王新月教授	严律南教授	张小晋主任医师	

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 4 月 18 日 第 15 卷 第 11 期 (总第199期)

## 述 评

1181 胃上皮异型增生的新概念 李凯, 唐志鹏, 戴彦成

## 基础 研究

1185 P2X受体对豚鼠胃窦环行肌自发性收缩运动的影响

黄旭, 张扬, 高玲, 赵鹏, 韩燕飞, 许文燮

1191 受体骨髓间质干细胞在大鼠原位肝移植中对免疫排斥的影响

谭浩翔, 高毅, 张会迎, 王琼

1198 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺

1202 壳寡糖及其衍生物对糖尿病大鼠糖耐量及肠道微生态平衡的影响

阎春玲, 刘兵, 刘万顺

1208 TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的诱导作用

王峻, 郭德玉

1213 软脉灵对大鼠非酒精性脂肪肝的预防作用

卢明芳, 王雯

1219 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进

王倩, 管小琴

1225 VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提

## 临 床 研 究

1232 自体树突状细胞联合抗病毒治疗对HBV慢性感染者的临床效应

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海舫, 柳立平, 申伟, 王淑云

## 文 献 综 述

1237 肝富集转录因子对乙型肝炎病毒转录与复制的调控 王甦, 唐红

1241 microRNA表达谱与消化器官肿瘤的发生、诊断及治疗 李欣, 李小青, 黄士昂

1246 与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展 崔建军, 曾争, 田国保, 田地, 陆海英

1252 RNA干扰在胃癌治疗中的研究进展 章璿, 方国恩, 王嘉锋

1257 肝脏炎性肌纤维母细胞瘤研究进展 付雪琼, 林军

1261 肝脏功能重建的细胞来源 张瑞, 郭善禹

1266 急性胰腺炎与氧化应激 王艳红, 冯志杰, 郝晓

## 研 究 快 报

1273 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用

邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新慧, 李泽峰, 盛志勇

1276  $\alpha$ -干扰素对活化的肝星状细胞早期凋亡的影响

车雷, 马力, 吴丹, 李智伟

## 临 床 经 验

1280 急诊胃镜诊治急性上消化道非曲张静脉破裂出血42例

刘辉, 柏健鹰, 王雷, 张朋彬

1283 胃癌Runx3基因的甲基化

杨少辉, 戴冬秋

1288 腹腔液中CD44和整合素 $\beta$ 1表达与胃癌腹膜转移的关系

赵东晖, 徐惠绵, 孙秀菊, 张世浦

1292 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响

卢高峰, 唐芙蓉, 郑鹏远, 马军, 白经修

1297 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进39例

李璐, 曾争, 尹彪, 蔺小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元



	<p>1302 抑癌基因WWOX在肝外胆管癌中的表达 顾军, 王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕</p> <p>1306 STAT5信号转导通路及其靶基因产物与结直肠癌恶性潜能的关系 欧云菴, 马向涛, 余力伟</p> <p>1310 血红素氧合酶-1在反流性食管炎患者食管黏膜中的表达 李军杰, 郑勇, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾</p> <p>1314 PTEN、P16基因表达与原发性胆囊癌病理生物学行为及预后的关系 许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭仁宣, 郭克建</p>
致 谢	1318 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1190 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事</p> <p>1197 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表</p> <p>1201 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于2005年世界华人消化杂志指标检索报告</p> <p>1207 中国学术期刊综合引证报告(2006)</p> <p>1212 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报</p> <p>1218 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届消化介入新技术研讨会会议及征文通知</p> <p>1231 世界华人消化杂志的同行评价</p> <p>1256 第三届全军胃肠外科学术会议暨2007年普通外科高峰论坛征文通知</p> <p>1260 世界华人消化杂志在线办公系统</p> <p>1265 2007年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知</p> <p>1272 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知</p> <p>1287 2007中西医结合肝胆胰疾病难点与热点论坛</p> <p>1291 世界华人消化杂志关于作者署名的声明</p> <p>1296 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》</p> <p>1317 2007年国际会议</p>
封面故事	<p>谭浩翔, 高毅, 张会迎, 王琼. 受体骨髓间质干细胞在大鼠原位肝移植中对免疫排斥的影响.</p> <p>世界华人消化杂志 2007;15(11):1191-1197</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1191.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1191.asp</a></p>
国际会议	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p><a href="mailto:meetings@imedex.com">meetings@imedex.com</a></p>

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2007-04-18  
原刊名 新消化病学杂志

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

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

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

订购 全国各地邮电局  
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

## 特别声明

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

2007年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证  
1401004000050

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

# World Chinese Journal of Digestology

**April 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 11**

<b>EDITORIAL</b>	1181 Updated diagnostic criteria on gastric epithelial dysplasia <i>Li K, Tang ZP, Dai YC</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1185 Effect of P2X receptor on the spontaneous contraction of gastric antral circular muscle in guinea pigs <i>Huang X, Zhang Y, Gao L, Zhao P, Han YF, Xu WX</i></p> <p>1191 Effect on immunological rejection by recipient-derived bone marrow mesenchymal stem cells after orthotopic liver transplantation <i>Tan HX, Gao Y, Zhang HY, Wang Q</i></p> <p>1198 Colonization of bacterial cryptic growth cells and its influence on the local cellular activity <i>Liu JK, Liao YF, Hu JC, Wu XL, Xu QW</i></p> <p>1202 Effect of chitooligosaccharides and its derivatives on oral glucose tolerance test and intestinal microecological balance in diabetic rats <i>Yan CL, Liu B, Liu WS</i></p> <p>1208 Induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in gastric cancer cells by tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> <i>Wang J, Guo DY</i></p> <p>1213 Preventive effect of Ruanmailing on non-alcoholic fatty liver disease in rats <i>Lu MF, Wang W</i></p> <p>1219 Improvement of induction method of non-alcoholic fatty liver model in rats <i>Wang Q, Guan XQ</i></p> <p>1225 Effects of vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and kinase insert domain-containing receptor and vascular endothelial growth factor protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells <i>in vitro</i> <i>Li HJ, Pang ZL, Mai-Mai-Ti MLAS</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	1232 Clinical effects of autologous dendritic cells combined with anti-virus therapy on chronic hepatitis B virus infection <i>Tong LX, Liu SX, Guo LH, Duan W, Chen BL, Wang HF, Liu LP, Shen W, Wang SY</i>
<b>REVIEW</b>	<p>1237 Regulation of hepatitis B virus transcription and replication by liver-enriched transcriptional factors <i>Wang S, Tang H</i></p> <p>1241 MicroRNA profiles and initiation, diagnosis and treatment of cancers in digestive organs <i>Li X, Li XQ, Huang SA</i></p> <p>1246 Advance in genetic factors influencing hepatitis B virus infection <i>Cui JJ, Zeng Z, Tian GB, Tian D, Lu HY</i></p> <p>1252 Progress of RNA interference in the therapy of gastric cancer <i>Zhang J, Fang GE, Wang JF</i></p> <p>1257 Advancement of research on inflammatory myofibroblastic tumor of the liver <i>Fu XQ, Lin J</i></p> <p>1261 Cell source of liver functional reconstruction <i>Zhang R, Guo SY</i></p> <p>1266 Relationship between acute pancreatitis and oxidative stress <i>Wang YH, Feng ZJ, Hao X</i></p>

<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1273 Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells against oxidative injury <i>Zou XF, Hu S, Lv Y, Sun N, Shi XH, Li ZF, Sheng ZY</i></p> <p>1276 Effects of interferon-<math>\alpha</math> on the early apoptosis of activated hepatic stellate cells <i>Che L, Ma L, Wu D, Li ZW</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1280 Emergent gastroscopy in the treatment of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: an analysis of 42 cases <i>Liu H, Bai JY, Wang L, Zhang PB</i></p> <p>1283 Methylation status of Runx3 gene in human gastric cancer <i>Yang SH, Dai DQ</i></p> <p>1288 Expression of CD44 and integrin <math>\beta</math>1 in peritoneal lavage fluid and their correlations with the peritoneal metastasis of gastric cancer <i>Zhao DH, Xu HM, Sun XJ, Zhang SP</i></p> <p>1292 <i>In vitro</i> effect of entecavir on the function of dendritic cells derived from chronic hepatitis B patients <i>Lu GF, Tang FA, Zheng PY, Ma J, Bai JX</i></p> <p>1297 Partial splenic embolization for liver cirrhosis accompanied by hypersplenism: an analysis of 39 cases <i>Li L, Zeng Z, Yin B, Lin XH, Wan H, Huo N, Xu JH, Xu XY</i></p> <p>1302 Expression of WW domain-containing oxidoreductase gene in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma <i>Gu J, Wang M, Wang YJ, Li YM, Yuan Y, Xue CY</i></p> <p>1306 Constitutive activation of STAT5 pathway and overexpression of target gene products correlate with malignant potential in human colorectal carcinoma <i>Ou YS, Ma XT, Yu LW</i></p> <p>1310 Expression of inducible heme oxygenase-1 in the patient's mucous membrane of esophagus of reflux esophagitis <i>Li JJ, Zheng Y, Sun K, Chang XY, Chen WG, Zhao J</i></p> <p>1314 Significance of PTEN and P16 protein expression in primary gallbladder carcinoma <i>Xu YH, Ou-Yang B, Yu GZ, Guo RX, Guo KJ</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	1318 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Tan HX, Gao Y, Zhang HY, Wang Q.</i> Effect on immunological rejection by recipient-derived bone marrow mesenchymal stem cells after orthotopic liver transplantation.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1191-1197</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1191.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1191.asp</a></p>
<b>INTERNATIONAL MEETINGS</b>	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p><a href="mailto:meetings@imedex.com">meetings@imedex.com</a></p>

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

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** April 18, 2007

**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: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

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

**Copyright** © 2007 by The WJG Press



# 胃上皮异型增生的新概念

李凯, 唐志鹏, 戴彦成

李凯, 唐志鹏, 戴彦成, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科上海市 200032

唐志鹏, 博士, 主任医师, 主要从事中医药治疗、胃肠病及肝病方面的研究。

通讯作者: 唐志鹏, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科。zhipengtang@sohu.com

电话: 021-64385700-3925

收稿日期: 2007-02-01 接受日期: 2007-03-06

## Updated diagnostic criteria on gastric epithelial dysplasia

Kai Li, Zhi-Peng Tang, Yan-Cheng Dai

Kai Li, Zhi-Peng Tang, Yan-Cheng Dai, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com

Received: 2007-02-01 Accepted: 2007-03-06

## Abstract

Large discrepancies exist between Eastern and Western countries in the diagnostic criteria for gastric epithelial dysplasia. With the purpose of a worldwide-accepted terminology and classification of precancerous lesions, Padova and Vienna classifications are established and reach a consensus that epithelial dysplasia is the earliest visible manifestation of neoplasia and the stage at which invasion has not yet occurred. So the primary term 'dysplasia' is confusing and misleading as gastric precancerous lesion. With more insight into dysplasia, new directions will be found to explore the pathogenesis, reversibility and therapy of dysplasia.

**Key Words:** Gastric epithelial dysplasia; Gastric precancerous lesion; Gastric cancer; Diagnostic criteria; Vienna classification

Li K, Tang ZP, Dai YC. Updated diagnostic criteria on gastric epithelial dysplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1181-1184

## 摘要

关于异型增生的诊断标准,在东西方国家的胃

肠病学术界存在着很大差异,曾一度导致诊断上的混乱。鉴于此,国际上制定了帕达瓦和维也纳新分类系统,对异型增生的诊断标准提出全新的概念,明确将高级别胃上皮异型增生作为胃癌最早期的镜下可见阶段,只是尚未发生浸润。因此,异型增生作为胃癌前病变这一描述已不再准确。深化对胃上皮异型增生的认识与理解,加强对其形成机制、可逆性和治疗方面的研究,是当前重要的研究课题。

**关键词:** 胃上皮异型增生; 胃癌前病变; 胃癌; 诊断标准; 维也纳分类系统

李凯, 唐志鹏, 戴彦成. 胃上皮异型增生的新概念. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1181-1184

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1181.asp>

## 0 引言

胃上皮异型增生(gastric epithelial dysplasia)曾经被认为是胃癌发病过程中的次末级阶段,亦即通常所说的胃癌前病变。但国际上新制定的维也纳诊断标准中,已明确将胃上皮异型增生视为最早期胃癌。自从异型增生与胃癌发病的密切关系得以明确,其临床重要性日益得到重视,深化对异型增生发病机制的研究,规范异型增生的诊断标准变得十分必要。然而,至今仍有许多问题亟待解决。我们从胃上皮异型增生的概念、流行病学、东西方诊断分歧到国际上新采用的诊断标准和分级等诸方面作一系统阐述。

## 1 胃上皮异型增生的研究背景

1.1 胃上皮异型增生作为胃癌前病变的概念解析 异型增生(dysplasia)是组织病理学家先前用于描述胃肠道系统癌前病变的术语。胃的异型增生同消化道其他部分的异型增生一样,被定义为癌瘤形成过程中的非浸润性上皮改变。早在一个世纪前,人们就对胃癌前病变进行了观察,但直到内镜技术被广泛应用于临床后,他的重要性才得以强调。1960年代初至1970年代末,纤维内镜被应用于临床。日本的Nakamura和Nagayo首次利用其活检取样,以证实可能存在

## ■背景资料

胃上皮异型增生曾经被认为是胃癌发病过程中的次末级阶段,亦即通常所说的胃癌前病变,是与胃癌的发生紧密联系的病理改变,其临床重要性日益得到重视。关于异型增生的诊断标准,东西方国家存在着很大差异,曾一度导致诊断上的混乱。深入对胃上皮异型增生的认识与理解,规范胃上皮异型增生的诊断标准,是当前胃肠病学研究领域的一项重要课题。

## ■相关报道

日本与欧美国家在异型增生诊断标准上存在明显分歧。对此问题, Schlemper的研究显示, 日本病理学家是基于细胞形态学改变和腺体结构改变作为诊断癌的依据, 而产生分歧的关键原因在于各国对异型增生与癌的界定上无统一标准。

的胃癌前病变, 并拟定了多种异型增生[(在日本则称之为不典型上皮(atypical epithelium))的分类方案。而在西方, 1975年Grundmann首次将“异型增生(dysplasia)”一词专门用于描述胃癌前病变。之后不久, WHO委员会批准使用该词, 并详细描述了基于非典型性细胞、变异性细胞与异型增生细胞的区别以及组织结构变化上的诊断原则。起初, 一些病理学家把异型增生理解成被以后证实为细胞再生所引起的改变。后来, 通过组织形态学把异型增生与浸润性癌以及细胞再生改变区别开来, 提出异型增生是一种良性的肿瘤上皮损伤即癌前病变<sup>[1]</sup>。

但准确区分异型增生与上述病理改变并非易事。最近, 一项利用细胞内生物标记物(Ki-67, PCNA)的变化, 对异型增生、反应性增生以及非确定性异型增生生物学特性进行区分的研究报道指出, 异型增生(尤其是高级别)在一定程度上具备了肿瘤的生物学特性, 而后两者仅显示出增生特性<sup>[2]</sup>。随着研究和认识的深入, 普通意义上的胃上皮异型增生作为胃癌前病变这一描述已不准确, 国际上新制定的维也纳胃肠肿瘤诊断标准已明确把胃上皮异型增生作为胃癌最早期镜下可见阶段, 详细内容见本文的维也纳诊断标准一节。

1.2 胃上皮异型增生与胃癌的发病关系 由Correa<sup>[3]</sup>所作的流行病学和组织病理学研究显示, 肠型胃癌的演变过程可以描述为一个连续的组织学事件, 即慢性弥漫性炎症-黏膜萎缩-肠化生(完全和/或不完全)-异型增生-浸润性癌的模式。按照此模式, 胃上皮异型增生与胃癌的发病具有密切相关性。针对胃切除术患者进行回顾性分析, 对认识胃上皮异型增生和胃腺癌的关系, 以及了解胃上皮异型增生作为胃癌前病变的致病作用是很有帮助的。早期胃癌中, 有40%-100%与中度到重度胃上皮异型增生相关; 而在早期腺癌中, 有5%-80%与其相关。这提示了胃上皮异型增生能够直接导致胃癌的形成<sup>[4-5]</sup>。Sarela *et al*<sup>[6]</sup>对高级别胃上皮异型增生患者预后的最新随访研究显示, 高级别异型增生患者最终有67%发展为浸润性癌而死亡。另外, *H pylori*感染与胃癌前病变以及胃癌发病的密切关系已得到高度重视。美国临床研究学会的一份最新相关回顾性研究指出, 全球近半数人群感染*H pylori*。*H pylori*可作为致病菌诱导胃黏膜慢性炎症, 继而促进肠上皮化生、黏膜萎缩、异型增生和胃癌的发生<sup>[7]</sup>。

1.3 胃上皮异型增生的流行病学 不同文献中引证的胃上皮异型增生的流行病学数据存在很大差异。其原因, 一方面是由于研究的种群不同, 另一方面则是由于对异型增生的概念上持有不同的理解, 对异型增生的定义不一致。据报道, 西方国家异型增生的发病率在0.5%-3.75%之间, 但在胃癌高发的国家如哥伦比亚和中国, 发病率介于9%-20%之间; 慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡以及胃切除术后患者的胃上皮异型增生的发病率则介于4%-30%之间, 而有恶性贫血的患者其发病率可达40%<sup>[1]</sup>。尽管异型增生发病率的报道不尽相同, 但是应用组织学分类方法对异型增生发病率进行研究或许可以解释存在这种差异的原因。在一项针对异型增生发病率为20%的人群调查中, 92%的胃上皮异型增生患者被划归为轻度异型增生, 而有学者认为这只是一细胞再生过程, 并非是细胞异型增生。尤其是对肠化生(完全性和不完全性)中所出现的再生改变与异型增生的区别, 医学界对此表述不清, 认识也不够<sup>[8]</sup>。

胃上皮异型增生患者以男性多见, 女性与男性比率介于1:3到1:3.9之间<sup>[1]</sup>。发病年龄多在50-70岁。一项调查研究显示<sup>[9]</sup>, 年龄<60岁、男性、重度萎缩性胃炎, 是异型增生进程中的独立危险因素。

各种胃上皮异型增生皆好发于胃窦和胃角, 内镜下可见异型增生的各种异常改变<sup>[1]</sup>。

1.4 胃上皮异型增生的东西方分歧问题 多年来, 胃上皮异型增生一直被视为胃癌前病变, 一种镜下直观可见并能进行分级的胃黏膜表型变化。然而, 欧洲和北美的研究者注意到, 日本胃癌患者的生存率要比西方国家高很多。通过对二者诊断标准上的对比研究后发现, 西方与日本的诊断体系在概念、术语、定义上存在着很大的差异<sup>[10-16]</sup>。日本病理学家广泛接受由日本胃癌研究学会所制定的异型增生分类标准, 欧美各国由于缺乏异型增生的统一分类标准, 因而造成了诊断上的混乱局面。日本通常把西方病理学界所诊断的异型增生视为腺癌。在一大规模胃镜活检调查研究中发现, 由日本确诊为腺癌的患者中, 有16%被西方病理学界报道为异型增生<sup>[10]</sup>。而在同一个调查研究中发现, 由西方国家确诊为高级别异型增生的患者中, 有90%被日本病理学界视为癌。

Schlemper *et al*<sup>[11]</sup>的研究清楚地显示了日本病理学家是基于细胞形态学改变(胞核大小

## ■创新盘点

关于胃上皮异型增生的相关研究报道和综述屡见不鲜, 但针对胃上皮异型增生与胃癌的界定及诊断标准问题进行的专题报道则较少。有鉴于此, 本文从胃上皮异型增生的概念、流行病学、东西方诊断分歧到国际上最新采用的诊断标准和分级等诸方面进行系统阐述, 以期让读者能够全面了解这一研究领域的最新进展。

不均一、极性丢失、核仁明显)和腺体结构改变(分枝增多、出芽、腺体背对背生长)作为诊断癌的依据。东西方国家对异型增生的诊断产生分歧的原因可归纳如下:(1)日本病理学家通常使用“黏膜癌(mucosal carcinoma)”这一术语,而不考虑是否存在黏膜固有层的浸润。而在这种情况下,西方病理学家则可能对此作出异型增生(低级别或者高级别)的诊断,他们诊断癌症的必要条件是要观察病变侵犯到黏膜固有层或以下;(2)日本在较低级别异型增生与周围正常组织的分界和压迫特征的认识上也与西方存在分歧;(3)一些日本病理学家认同上皮内癌(intraepithelial carcinoma)这一概念,而西方病理学家则不接受这一提法<sup>[1]</sup>。

## 2 胃上皮异型增生的维也纳诊断标准

由于东西方各国病理学家采用不同的形态学标准诊断异型增生而引发的分歧,对异型增生与癌的界定造成了很大的麻烦。鉴于此,1998-04在意大利帕达瓦召开了关于胃肠道肿瘤分级与分类标准的国际共识会议。该会议共由8位全球知名专家进行标准的拟定<sup>[17-18]</sup>。同年9月,来自亚、欧、北美12国的31位胃肠病理学家(其中包括参与制订帕达瓦标准的7位专家)在维也纳举行了规模庞大的第二次国际共识会议<sup>[18-19]</sup>,进一步完善了新、旧悉尼标准对异型增生的认识<sup>[20-21]</sup>。会议指出,所拟定的任何一种分类系统都必须适用于整个胃肠道体系,并且具有能够潜在解决临床和研究中实际问题的能力。该会议所设计的维也纳标准,一方面保持了目前各国仍在沿用的分类体系,同时也体现出存在于组织学以及临床征象上的变化。

维也纳分类标准的一个显著特点在于把高级别异型增生、非浸润性原位癌[上皮内癌(intraepithelial carcinoma)]和可疑浸润性癌作为三个亚型列于同一个大型即非浸润性肿瘤(高度)之下<sup>[19]</sup>。这种分层方法并没有减少参照生物学可疑变化进行诊断所提供的价值。相反,将原位癌再次引入形态学,与高级别异型增生归属于同一类型,这样可以大大降低临床上由于对原位癌的理解偏差而造成的漏诊机会。因此,按照帕达瓦<sup>[17]</sup>和维也纳<sup>[19]</sup>分类标准得出的结论是:异型增生不是癌前病变,而是癌瘤最早的直观可见阶段,只是尚未发生浸润而已<sup>[22]</sup>。2000年版的WHO肿瘤新分类中是在维也纳分类标准的基础上,引入了上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia)

的名称。其实上皮内瘤变是异型增生的同义词。主张对低级别上皮内瘤变患者应当进行随访,必要时行内镜下切除;而对高级别上皮内瘤变患者应进行内镜下切除或手术切除。

## 3 胃上皮异型增生(腺瘤型)的分级

根据组织学异常的严重程度,胃上皮异型增生分级包括轻度、中度、重度异型增生的三级分级法和低级别、高级别异型增生的两级分级法两种<sup>[6,23]</sup>。1984年Ming和一个国际专家小组鉴于中度和重度异型增生难以区分,提议将两者合二为一,划归同一级。而这种情况同样存在于轻度和中度异型增生上,若采用低级别异型增生这一概念取代轻、中度异型增生似乎更具合理性<sup>[1]</sup>。鉴于两级分级法具有较好的可重复性,且使用更加简便,故目前国际上对异型增生的分级多倾向于采用此种方法。

**3.1 低级别异型增生** 其形态学特点表现为核变长圆,位于细胞基底侧,排列较密集,浓染,若有假分层现象,核仍可具有极性。此型细胞核局限于细胞基底1/2或2/3处,而“中度”异型增生的胞核位于基底上2/3。因此,将中度异型增生划归为低级别异型增生是具有说服力的。低级别异型增生较难准确地与非典型再生上皮细胞相区别开来。后者为发育未成熟的上皮细胞,形似立方形,胞质呈嗜碱性,核增大呈囊泡状,黏液分泌减少或缺如,大小一致或不同,位于基底侧或中央,细胞可排成一行。由于低级别异型增生与反应性增生/再生在组织学上具有相似性,这一现象或许提示,低级别异型增生可能具有可逆性。一个真正需要解释的问题是,关于“非确定性异型增生(indefinite for dysplasia)”这一概念。实际上,“非确定性异型增生”是基于对以下两个问题之一作出否定回答而得出的排除性诊断:“该上皮确定是非异型增生吗?”“该上皮就是异型增生吗?”<sup>[1-2]</sup>。

**3.2 高级别异型增生** 其形态学在腺瘤样异型增生中表现为胞核排列紊乱,位于细胞的腔面。可见增大的核仁以及有丝分裂,极性部分或完全丧失。高级别异型增生与原位癌均为非浸润性变,因为真正的浸润性变只见于浸润性癌。较少有文献报道胃上皮异型增生能直接导致形态学意义上的浸润性癌,而这种可能性发生在低级别异型增生中的几率则更小。另外,有时区分高级别异型增生与黏膜内癌瘤并非易事。大量的小腺体从黏膜固有层以出芽形式生长出,这很

### ■名词解释

胃黏膜上皮异型增生:又称为不典型增生,系指胃黏膜的结构和上皮偏离了正常状态,形态学上表现为细胞的异性和腺体结构的紊乱,但尚不具备恶性特征。异型增生可发生于肠化生或非肠化生的胃黏膜,故有肠型和胃型之分。



### ■同行评价

本文题目较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容,作者在参阅多篇文献的基础上综述胃上皮异型增生诊断新进展。文章的科学性、创新性和可读性能较好的反映我国胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

难与浸润相鉴别。先前提出的“突破基底膜”这一概念,理论上讲得通,但是很难甚至不可能在苏木青-伊红染色切片上加以识别,而实际上多以细胞轮廓不规则和黏膜固有层不规则浸润作为判断标准而使用<sup>[1,24]</sup>。

总之,胃上皮异型增生是与胃癌的发生紧密联系的病理改变。随着对其研究的逐渐深入,胃上皮异型增生作为胃癌前病变这一描述已不准确,国际上最新制定的维也纳诊断标准已明确把胃上皮异型增生(高级别)作为胃癌最早期镜下可见阶段。胃上皮异型增生的两级分级法由于简便易行、可重复性好,国际上多采用此种分级。维也纳诊断标准亦采用的是两级分级方法。目前我国对于胃上皮异型增生无论是在概念界定,还是在诊断分级上,都滞后于国际上对其研究的更新与认识,这无疑会延误胃上皮异型增生与胃癌的诊断和治疗。因此,深化对胃上皮异型增生的认识与理解,加强对其形成机制、可逆性和治疗方面的研究,是当前重要的研究课题。

### 4 参考文献

- 1 Lauwers GY, Riddell RH. Gastric epithelial dysplasia. *Gut* 1999; 45: 784-790
- 2 Dong B, Xie YQ, Chen K, Wang T, Tang W, You WC, Li JY. Differences in biological features of gastric dysplasia, indefinite dysplasia, reactive hyperplasia and discriminant analysis of these lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3595-3600
- 3 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 4 Siddiqui NH. Tumors of the esophagus and stomach (CD-ROM). *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1242
- 5 Oehlert W, Keller P, Henke M, Strauch M. Gastric mucosal dysplasia: what is its clinical significance? *Front Gastrointest Res* 1979; 4: 173-182
- 6 Sarela AI, Scott N, Verbeke CS, Wyatt JL, Dexter SP, Sue-Ling HM, Guillou PJ. Diagnostic variation and outcome for high-grade gastric epithelial dysplasia. *Arch Surg* 2005; 140: 644-649
- 7 Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 60-69
- 8 You WC, Blot WJ, Li JY, Chang YS, Jin ML, Kneller R, Zhang L, Han ZX, Zeng XR, Liu WD. Precancerous gastric lesions in a population at high risk of stomach cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1317-1321
- 9 Rugge M, Leandro G, Farinati F, Di Mario F, Sonogo F, Cassaro M, Guido M, Ninfo V. Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. *Cancer* 1995; 76: 376-382
- 10 Lauwers GY, Shimizu M, Correa P, Riddell RH, Kato Y, Lewin KJ, Yamabe H, Sheahan DG, Lewin D, Sipponen P, Kubilis PS, Watanabe H. Evaluation of gastric biopsies for neoplasia: differences between Japanese and Western pathologists. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 511-518
- 11 Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H, Takahashi H, Fujita R. Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and western pathologists. *Lancet* 1997; 349: 1725-1729
- 12 Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 60-69
- 13 Schlemper RJ, Dawsey SM, Itabashi M, Iwashita A, Kato Y, Koike M, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H. Differences in diagnostic criteria for esophageal squamous cell carcinoma between Japanese and Western pathologists. *Cancer* 2000; 88: 996-1006
- 14 Riddell RH, Iwafuchi M. Problems arising from eastern and western classification systems for gastrointestinal dysplasia and carcinoma: are they resolvable? *Histopathology* 1998; 33: 197-202
- 15 Rugge M, Cassaro M, Di Mario F, Leo G, Leandro G, Russo VM, Pennelli G, Farinati F. The long term outcome of gastric non-invasive neoplasia. *Gut* 2003; 52: 1111-1116
- 16 Genta RM. Dysplasia east and west. *Curr Gastroenterol Rep* 2000; 2: 465-470
- 17 Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 167-176
- 18 Dixon MF. Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. *Gut* 2002; 51: 130-131
- 19 Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Flejou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000; 47: 251-255
- 20 Aruin LI. A new international morphologic classification of gastritis (modification of the Sydney system). *Arch Patol* 1997; 59: 3-7
- 21 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 22 Genta RM. One more dysplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1411-1414
- 23 de Dombal FT, Price AB, Thompson H, Williams GT, Morgan AG, Softley A, Clamp SE, Unwin BJ. The British Society of Gastroenterology early gastric cancer/dysplasia survey: an interim report. *Gut* 1990; 31: 115-120
- 24 Rubio CA. Gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2003; 52: 455-456

电编 张敏 编辑 张焕兰

# P2X受体对豚鼠胃窦环行肌自发性收缩运动的影响

黄旭, 张杨, 高玲, 赵鹏, 韩燕飞, 许文燮

黄旭, 张杨, 高玲, 赵鹏, 韩燕飞, 许文燮, 上海交通大学医学院生理学教研室 上海市 200240

黄旭, 2004年上海交通大学医学院硕士生, 主要从事消化生理学的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30360031

通讯作者: 许文燮, 200240, 上海市东川路800号, 上海交通大学医学院文选医学楼328室. wenxiexu@sjtu.edu.cn

电话: 021-34205639

收稿日期: 2006-10-30 接受日期: 2006-12-18

## Effect of P2X receptor on the spontaneous contraction of gastric antral circular muscle in guinea pigs

Xu Huang, Yang Zhang, Ling Gao, Peng Zhao, Yan-Fei Han, Wen-Xie Xu

Xu Huang, Yang Zhang, Ling Gao, Peng Zhao, Yan-Fei Han, Wen-Xie Xu, Department of Physiology, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30360031

Correspondence to: Professor Wen-Xie Xu, Shanghai Jiao Tong University, Room 328, Wenxuan Medical Building, 800 Dongchuan Road, Shanghai, 200240, China. wenxiexu@sjtu.edu.cn

Received: 2006-10-30 Accepted: 2006-12-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of alpha, beta-methylene ATP ( $\alpha, \beta$ -MeATP) on gastric smooth muscle motility and its ionic channel mechanism in guinea pigs.

**METHODS:** EWG/B guinea pig was used in this study. Gastric antral smooth muscle strips ( $10 \times 1.5$  mm) were prepared and then fixed in the organ bath system ( $37^\circ\text{C}$ ) which were perfused with sodium bicarbonate buffer solution and aerated ( $950 \text{ mL/L O}_2$ ,  $50 \text{ mL/L CO}_2$ ). The spontaneous contraction of gastric antral circular muscle was recorded by SMUP-E bioelectric signal-processing system. The single gastric myocyte was dispersed with type II collagenase, and the ionic current and membrane potential were recorded using whole-cell patch clamp technique in freshly dispersed smooth muscle cells, including calcium-activated potas-

sium current, delayed rectifier potassium current, and voltage-dependent calcium current.

**RESULTS:**  $\alpha, \beta$ -MeATP, a P2X receptor agonist, significantly inhibited the spontaneous contraction of gastric antral circular muscle in a dose-dependent manner, and the contraction extent were decreased from 100% to  $90\% \pm 2\%$ ,  $81\% \pm 4\%$ ,  $68\% \pm 4\%$ ,  $59\% \pm 7\%$  and  $29\% \pm 4\%$  when  $\alpha, \beta$ -MeATP was used at the concentrations of 5, 10, 20, 40 and  $100 \mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ). Tetrodotoxin, a blocker of neural transduction, did not affect  $\alpha, \beta$ -MeATP-induced inhibition of the spontaneous contraction. Under conventional whole-cell patch clamp configuration,  $500 \mu\text{mol/L}$   $\alpha, \beta$ -MeATP did not change membrane potential and affect either delayed rectifier or calcium-activated potassium currents.  $500 \mu\text{mol/L}$  and  $1 \text{ mmol/L}$   $\alpha, \beta$ -MeATP did not influence voltage-dependent calcium currents either.

**CONCLUSION:**  $\alpha, \beta$ -MeATP, a P2X receptor agonist, induces relaxation of gastric antral circular muscle and this effect depend on neither the enteric nerve nor hyperpolarizing membrane potential as well as changing ionic channel activity in guinea pig.

**Key Words:** Alpha, beta-methylene ATP; P2X purinoceptor; Gastric antral circular muscle; Guinea pig

Huang X, Zhang Y, Gao L, Zhao P, Han YF, Xu WX. Effect of P2X receptor on the spontaneous contraction of gastric antral circular muscle in guinea pigs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1185-1190

## 摘要

**目的:** 探讨P2X受体激动剂 $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\alpha, \beta$ -MeATP)对豚鼠胃窦环行肌运动的影响及其离子通道机制。

**方法:** 采用EWG/B豚鼠, 制备去黏膜胃窦环行肌条( $10 \times 1.5$  mm), 并将其固定于恒温灌流槽内( $37^\circ\text{C}$ ), 用碳酸氢钠缓冲液连续灌流并通氧( $950 \text{ mL/L O}_2$ ,  $50 \text{ mL/L CO}_2$ )。利用SMUP-E生物信号处理系统记录胃窦平滑肌自发性收缩

## ■背景资料

ATP是非肾上腺能非胆碱能神经递质之一, 在胃肠道中主要通过P2X及P2Y受体在平滑肌运动中起重要作用。但是, 很多研究表明, 不同物种, 在胃肠道不同部位, ATP所起的作用差异非常大。本文主要研究了P2X受体激动剂 $\alpha, \beta$ -MeATP对豚鼠胃窦环行肌运动的影响及其离子通道机制。

## ■研究前沿

胃肠动力障碍性疾病在临床上非常常见,其原因还不甚明了,而嘌呤递质在胃肠道也有广泛的分布,且对胃肠道平滑肌的运动亦有影响。因此,了解和掌握嘌呤递质在胃肠运动中的作用规律,对研究胃肠动力学以及临床防治胃动力障碍性疾病是一项重要的课题之一。

活动,Ⅱ型胶原酶消化法分离豚鼠胃窦环行肌单细胞,传统全细胞膜片钳技术记录急性分离的胃窦平滑肌细胞膜电位和离子电流,包括钙激活钾电流、延迟整流型钾电流及电压依赖性钙电流。

**结果:**嘌呤能P2X受体激动剂 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP明显抑制豚鼠胃窦环行肌自发性收缩,并有明显的量效倚赖关系;5, 10, 20, 40, 100  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP作用下,环行肌收缩幅度分别由对照组的100%下降到 $90\% \pm 2\%$ ,  $81\% \pm 4\%$ ,  $68\% \pm 4\%$ ,  $59\% \pm 7\%$ 和 $29\% \pm 4\%$  ( $P < 0.05$ )。用神经阻断剂Tetrodotoxin (TTX)预处理后, $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对胃窦环行肌自发性收缩的抑制作用仍不受影响;在传统全细胞膜片钳电流钳模式下,500  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP不影响细胞膜电位,也对两种外向钾电流,即延迟整流型钾电流和钙激活钾电流没有影响;不同浓度的 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对电压依赖性钙电流没有影响。

**结论:** P2X受体激动剂抑制豚鼠胃窦环行肌自发性收缩,其作用机制不依赖内在神经,也不依赖细胞膜离子通道以及膜电位改变。

**关键词:**  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP; P2X嘌呤受体; 胃窦环行肌

黄旭, 张扬, 高玲, 赵鹏, 韩燕飞, 许文曼. P2X受体对豚鼠胃窦环行肌自发性收缩运动的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1185-1190  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1185.asp>

## 0 引言

非肾上腺能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)神经广泛分布在胃肠道,他们在胃肠道平滑肌运动的调节中起着重要作用<sup>[1]</sup>。1970年, Burnstock *et al*<sup>[2]</sup>首次提出ATP为非肾上腺能非胆碱能(NANC)神经递质,自此,许多证据支持这一假设<sup>[3-4]</sup>。用阿的平染色技术<sup>[5]</sup>已经在很多物种小肠肌间神经丛几种神经元中定位了ATP,并且已经证实了神经刺激引起肌间神经丛释放ATP<sup>[6]</sup>。在体内,ATP主要通过激活G蛋白偶联的P2Y受体及配体门控的P2X受体起作用<sup>[7-9]</sup>。因为P2X受体为配体门控的非选择性阳离子通道<sup>[10-13]</sup>,而这种通道的激活通常会导致内向电流和去极化<sup>[13-15]</sup>,所以,P2X通常介导兴奋性反应。但是,在胃肠道,不同物种,不同部位的P2X受体,其作用不同。在小鼠胃及豚鼠回肠平滑肌<sup>[16-17]</sup>,P2X嘌呤受体激动剂 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP通过位于突触前的P2X受体介导肌肉收缩,而在小鼠

和犬类结肠平滑肌<sup>[18-19]</sup>,嘌呤激动剂直接激活位于平滑肌上的P2X受体,使平滑肌收缩。但是,在大鼠胃平滑肌<sup>[20]</sup>、大鼠回肠<sup>[21]</sup>P2X受体介导平滑肌舒张。可见,在胃肠道,P2X受体的作用比较复杂并且P2X受体介导平滑肌舒张的机制还不清楚。为此,我们主要观察了P2X受体激动剂 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对豚鼠胃窦环行肌自发性收缩的影响并其离子通道机制进行初步探讨。

## 1 材料和方法

1.1 材料 EWG/B豚鼠,雌雄不拘,体质量250  $\pm$  50 g,由上海中国科学院实验动物中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 离体胃平滑肌条的制备及自发性收缩的观察 将豚鼠击头致昏,颈静脉放血后,平铺于实验台上,沿腹中线开腹取出胃窦部,放入PSS缓冲液中清洗后,移入氧饱和的PSS缓冲液中,去除黏膜层,露出环行肌层,沿环行肌走向剪取1.5 mm宽,10 mm长的肌条,置于含有氧饱和重碳酸盐缓冲台氏液的垂直灌流槽内,肌条一端固定于玻璃小钩上,另一端与SMUP-E生物信号处理系统连接的张力换能器相连。灌流槽内的液体通过恒温装置(WC/09-05)使温度保持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。每次实验时,肌条先在上述情况下孵育约1 h左右,当出现稳定的自发性收缩后开始实验。收缩活动用SMUP-E生物信号处理系统记录及分析。

1.2.2 单细胞制备及电生理实验 仍然将豚鼠击头致昏,颈静脉放血后取胃窦部放入氧饱和和无钙PSS缓冲液中,同上述方法分离得到1 mm  $\times$  4 mm左右的环行肌条。将其放入K-B液中保存约15 min,然后在由5 mg Ⅱ型胶原酶,2 mg胰蛋白酶抑制剂,1.4 mg  $\text{Na}^+$ -ATP及12 mg牛血清白蛋白溶于4 mL无钙PSS缓冲液中制成的消化液中,于36-37 $^\circ\text{C}$ 水浴箱中消化25-35 min后取出,用无钙PSS溶液冲洗后,移入K-B液中,用管口圆滑的滴管反复吹打,制成细胞悬浮液后放入4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存。实验时,取一滴细胞悬浮液(约0.1 mL),平铺于倒置显微镜(IX-70 Olympus, Japan)镜台上的灌流槽底部,待10-15 min细胞贴壁后,用PSS溶液灌流(2-3 mL/min),然后用电阻为2-5 M $\Omega$ 的玻璃电极进行5-10 G $\Omega$ 的千兆封接。膜电位根据所记录的电流不同钳制在所需水平,全细胞电流是通过膜片钳放大器EPC-10型膜片钳放大器记录,用IGOR Pro软件(version5.0, USA)分析处理。



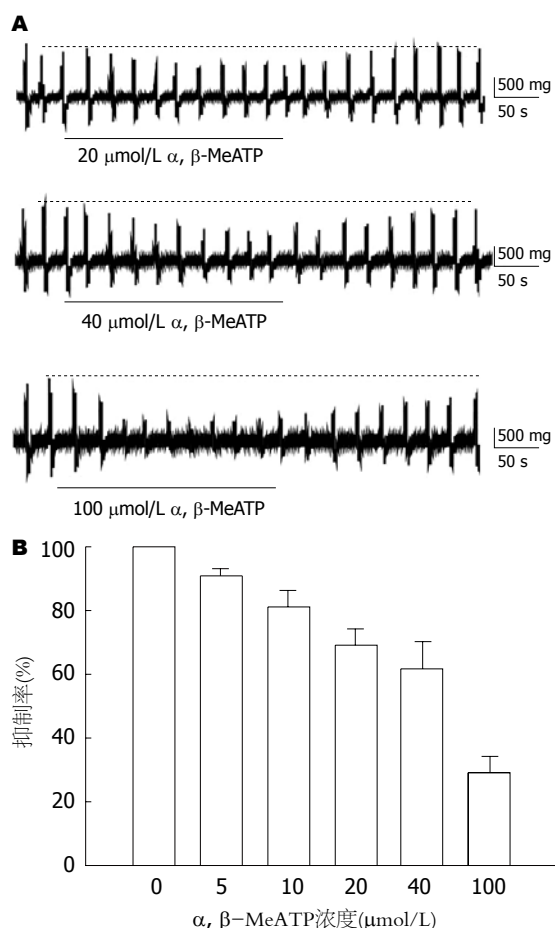


图 1  $\alpha, \beta$ -MeATP对豚鼠胃窦环形肌自发性收缩的影响。

**统计学处理** 所有统计数据用均数±标准误差表示。实验结果采用同体对照的 $t$ 检验, 具有显著性差异的标准为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1  $\alpha, \beta$ -MeATP对豚鼠胃窦环形肌自发性收缩的影响** 在豚鼠离体胃窦环形肌平滑肌上观察了嘌呤能P2X激动剂 $\alpha, \beta$ -MeATP对平滑肌自发性收缩的影响。在肌条出现稳定的自发性收缩后, 分别给予5, 10, 20, 40, 100  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha, \beta$ -MeATP均可抑制肌条收缩幅度(图1A), 其收缩幅度分别由对照组的100%下降到90%±2%, 81%±4%, 68%±4%, 59%±7%和29%±4%(图1B,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ )具有明显的量效关系。

**2.2 TTX对 $\alpha, \beta$ -MeATP抑制自发性收缩的影响** 在用0.2  $\mu\text{mol/L}$  TTX预处理后再给予100  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha, \beta$ -MeATP, 仍然可以抑制胃窦平滑肌自发性收缩(图2A), 在TTX预处理后 $\alpha, \beta$ -MeATP可以使胃窦平滑肌收缩幅度下降到29%±5%, 与单独给予 $\alpha, \beta$ -MeATP的降低收缩幅度29%±4%相比, 没有显著性差异(图2B,  $n = 5$ ,  $P > 0.05$ )。

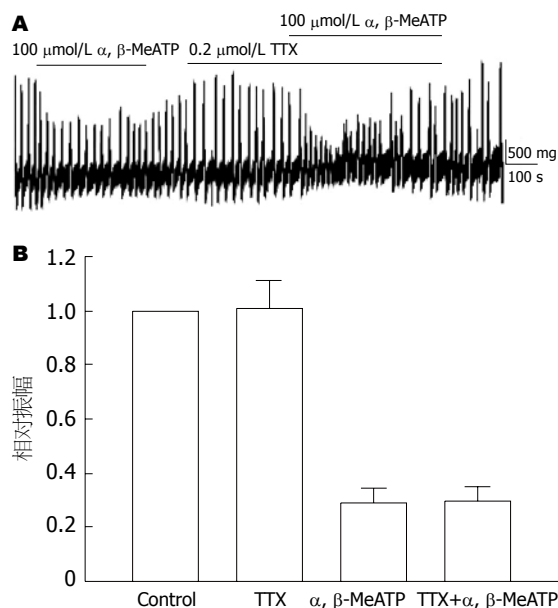


图 2 神经阻断剂TTX对 $\alpha, \beta$ -MeATP舒张胃窦环形肌作用的影响。

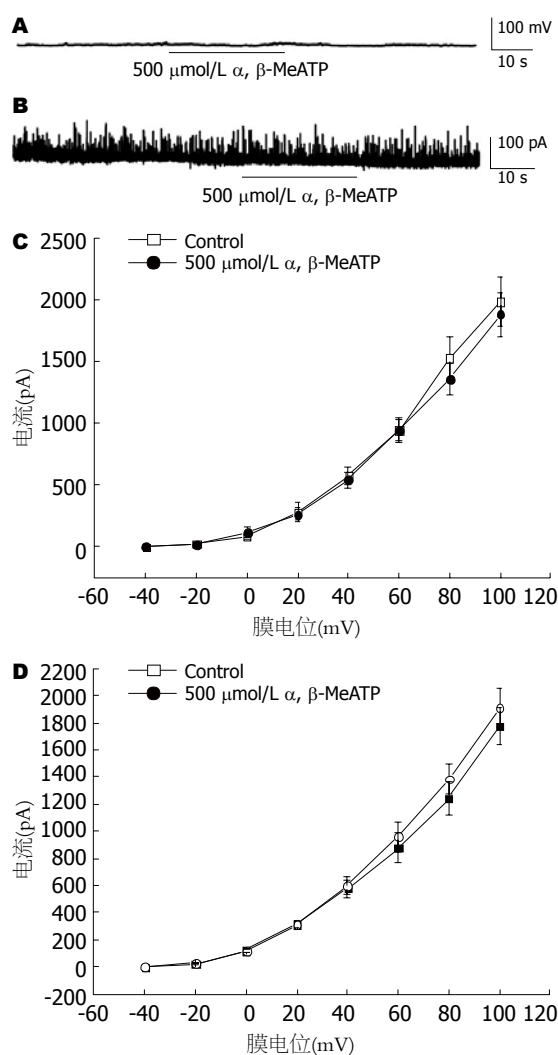


图 3  $\alpha, \beta$ -MeATP对豚鼠胃平滑肌细胞膜电位以及外向钾电流的影响。

### ■ 创新盘点

嘌呤能受体在胃肠平滑肌功能调节方面, 在不同动物、不同部位平滑肌差异很大。本文研究证实, 豚鼠胃窦P2X受体激动剂抑制自发性收缩, 其机制不依赖内在神经, 也不依赖细胞膜离子通道以及膜电位改变。

### ■应用要点

嘌呤能P2X受体一般认为是促离子性受体,但本研究表明,P2X受体并不影响豚鼠胃窦环行肌细胞膜电位,说明P2X受体的舒张作用不依赖离子通道。这对今后研究P2X受体作用机制有一定的理论意义。

2.3  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对膜电位的影响 采用全细胞膜片钳技术的电流钳模式下,用含EGTA 0.1 mmol/L电极内液的电极记录膜电位,并将膜电位调到-60 mV使其接近平滑肌静息电位。当给予500  $\mu$ mol/L  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP时,给药前后膜电位水平没有明显变化(图3A,  $n=6$ )。

### 2.5 $\alpha$ , $\beta$ -MeATP对外向钾电流的影响

2.5.1  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对钙激活钾离子电流的影响 在全细胞电压钳模式下,使用电极内液含EGTA 0.1 mmol/L的电极,将膜电位钳制在-20 mV,可以记录到胞内游离钙激活的自发瞬间外向钾电流(spontaneous transient outward currents, STOCs)<sup>[22]</sup>。如图3B所示,在给予500  $\mu$ mol/L  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP前后,STOC的频率和振幅几乎没有发生改变( $n=6$ )。

为了进一步观察 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对钙敏感钾电流(calcium-activated potassium current, IKCa)的影响,把膜电位钳制在-60 mV,从-40 mV开始,用时间间隔10 s、阶跃增幅20 mV持续400 ms的阶跃电压刺激依次去极化到+100 mV,得到了胃窦平滑肌细胞IKCa的电压-电流曲线。如图3C所示,在每个膜电位水平 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP不影响IKCa幅度,当去极化到+60 mV时,给药前后电流大小分别为 $944.9 \pm 88.3$  pA和 $946.2 \pm 101.3$  pA,两者之间没有显著性差异( $n=6$ ,  $P>0.05$ )。

2.5.2  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对电压依赖性钾电流的影响 当电极内液中含有10 mmol/L EGTA使细胞内游离钙充分被螯合的情况下,将膜电位钳制在-60 mV,采用同记录IKCa相同的刺激模式可以记录到延迟整流性钾电流(delayed rectifying potassium currents, IKV)。I-V曲线如图3D所示,在各膜电位水平500  $\mu$ mol/L  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对IKV没有明显的影响,当去极化到+60 mV的电流大小为 $876.2 \pm 108.5$  pA,与对照组 $962.5 \pm 109.6$  pA比较,没有显著性差异( $n=6$ ,  $P>0.05$ )。

2.6  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对电压依赖性钙电流的影响 将膜电位钳制在-80 mV,从-40 mV开始,用时间间隔10 s、阶跃增幅10 mV持续400 ms的阶跃电压刺激依次去极化到+60 mV,记录了L-型钙电流(图4A)。在给予500  $\mu$ mol/L  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP前后,根据所记录的电流大小,制成I-V曲线如图4B所示。结果表明,在每个电压水平 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP不改变电流大小,当去极化到0 mV时,对照组和给药组电流大小分别为 $-390.6 \pm 64.7$  pA和 $-391.4 \pm 57.7$  pA,两者之间没有显著性差异( $n=6$ ,  $P>0.05$ )。

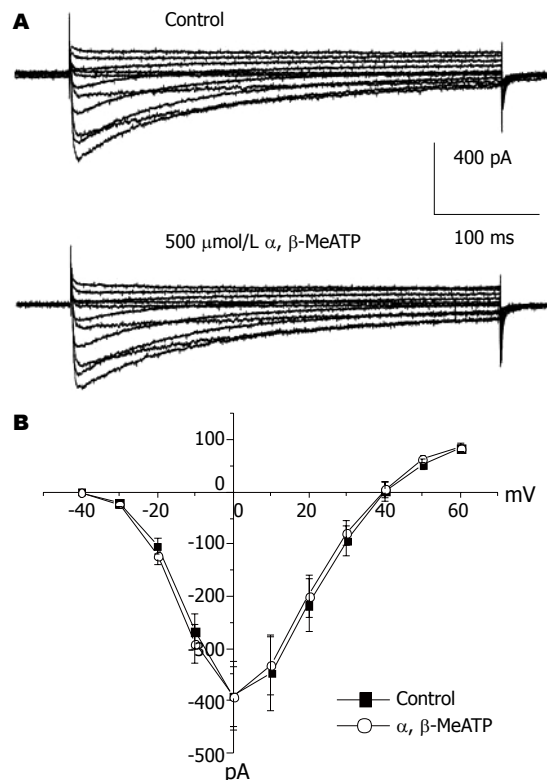


图4  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对豚鼠胃平滑肌细胞L-型钙电流的影响。

### 3 讨论

嘌呤能P2受体根据其对受体激动剂反应的强弱顺序可分为P2X及P2Y受体,其中,2-MeSATP是P2Y受体的强激动剂,而 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP是P2X受体的强激动剂<sup>[23-25]</sup>。在不同物种,胃肠道不同部位,P2X受体介导的反应不同,例如,在小鼠胃及豚鼠回肠平滑肌<sup>[16-17]</sup>,嘌呤能激动剂通过位于突触前的P2X受体介导平滑肌收缩,而在小鼠和犬类结肠平滑肌<sup>[18-19]</sup>,则是通过直接激活位于平滑肌上的P2X受体介导收缩。然而,本实验结果显示,在豚鼠胃平滑肌P2X受体激动剂 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP引起舒张平滑肌的作用。

在本实验中,P2X受体激动剂 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对豚鼠胃窦环行肌具有舒张作用,而这种作用不被神经阻断剂TTX所阻断。这一结果说明,在豚鼠的胃平滑肌P2X受体介导平滑肌的舒张反应,而这种舒张反应不是通过肠神经实现的。在大鼠胃平滑肌,P2X受体介导平滑肌舒张,并且,这种作用可能通过激活小电导 $\text{Ca}^{2+}$ 敏感 $\text{K}^{+}$ 通道实现<sup>[20]</sup>。既然在平滑肌的运动中细胞膜电位的改变直接控制平滑肌的舒缩状态,在本实验中,为了进一步探讨P2X受体激动剂对豚鼠胃窦环行肌的舒张作用,在新鲜分离的单细胞上观察了 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对平滑肌细胞膜电位的影响以及主要

影响细胞膜电位的两种外向钾电流的影响. 实验结果表明,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP不仅低或高浓度都不影响豚鼠胃平滑肌膜电位水平也不影响钙敏感钾电流和延迟整流性钾电流. 我们也在组织水平观察到高浓度的非特异性钾离子通道阻断剂四乙基胺不能阻断 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP的舒张作用(结果没有显示). 这些结果说明,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对豚鼠胃平滑肌的舒张作用并不是通过增加外向钾电流使膜电位超极化实现的. 在平滑肌收缩过程中起重要作用的另一个可以考虑的因素是细胞内游离钙水平, 而影响细胞内游离钙浓度变化的重要因素是电压依赖性L-型钙通道. 因此, 在本实验中观察了 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对L-型钙电流的影响, 结果表明,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP并不改变钙电流. 这一结果说明,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对胃平滑肌的舒张作用并不是通过抑制L-型钙电流来实现.

平滑肌收缩是由细胞内游离钙浓度及胞内收缩装置对钙离子的敏感度两方面来调节的<sup>[26]</sup>. 在平滑肌收缩过程中细胞内的游离钙首先与钙调蛋白结合, 激活肌球蛋白轻链激酶, 使肌球蛋白轻链磷酸化, ATP酶活性增加, 横桥和肌动蛋白结合, 最终导致肌丝滑行即平滑肌收缩. 既然 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对胃平滑肌的舒张作用并不是通过改变细胞膜离子通道活性最终引起膜电位超极化来实现, 就可以推测 $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP可能通过P2X受体降低钙离子对钙调蛋白的敏感性即降低其亲和力或抑制肌球蛋白磷酸化过程有关. 总之,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP对胃平滑肌的舒张作用的详细机制还不清楚, 有待于进一步研究.

功能性消化不良是在临床常见的征候群, 常表现为胃排空障碍<sup>[27-28]</sup>, 但其发病机制还不清楚. 既然是功能性疾病, 胃肠道内分泌激素和局部体液因素以及自主神经和肠神经功能的紊乱肯定与之有关. 嘌呤能神经在胃肠功能调节中即有兴奋作用也有抑制性作用, 而且在不同的动物和胃肠道不同部位的作用有着明显的差异. 因此, 阐明嘌呤能神经递质及其受体在胃肠功能调节中的作用及其机制具有消化生理学理论意义也有潜在临床意义.

#### 4 参考文献

- 1 Bennett MR. Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 159-195
- 2 Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J*

- Pharmacol* 1970; 40: 668-688
- 3 Xue L, Farrugia G, Sarr MG, Szurszewski JH. ATP is a mediator of the fast inhibitory junction potential in human jejunal circular smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: G1373-1379
- 4 Crist JR, He XD, Goyal RK. Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J Physiol* 1992; 447: 119-131
- 5 Crowe R, Burnstock G. Comparative studies of quinacrine-positive neurones in the myenteric plexus of stomach and intestine of guinea-pig, rabbit and rat. *Cell Tissue Res* 1981; 221: 93-107
- 6 Su C, Bevan JA, Burnstock G. [3H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 1971; 173: 336-338
- 7 Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-492
- 8 North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-1067
- 9 Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 67-70
- 10 Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; 328: 275-278
- 11 Friel DD. An ATP-sensitive conductance in single smooth muscle cells from the rat vas deferens. *J Physiol* 1988; 401: 361-380
- 12 von Kugelgen I, Starke K. Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 319-324
- 13 Koh SD, Dick GM, Sanders KM. Small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channels activated by ATP in murine colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 1997; 273: C2010-2021
- 14 Droogmans G, Callewaert G, Declercq I, Casteels R. ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Cl}^{-}$  current in cultured smooth muscle cells from pig aorta. *J Physiol* 1991; 440: 623-634
- 15 Molleman A, Nelemans A, Den Hertog A. P2-purinoreceptor-mediated membrane currents in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1989; 169: 167-174
- 16 Mule F, Naccari D, Serio R. Evidence for the presence of P2y and P2x receptors with different functions in mouse stomach. *Eur J Pharmacol* 2005; 513: 135-140
- 17 Matsuo K, Katsuragi T, Fujiki S, Sato C, Furukawa T. ATP release and contraction mediated by different P2-receptor subtypes in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1744-1748
- 18 Giaroni C, Knight GE, Ruan HZ, Glass R, Bordini M, Lecchini S, Frigo G, Burnstock G. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1313-1323
- 19 Lee HK, Ro S, Keef KD, Kim YH, Kim HW, Horowitz B, Sanders KM. Differential expression of P2X-purinoreceptor subtypes in circular and longitudinal muscle of canine colon. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 575-584
- 20 Lefebvre RA, de Beurme FA, Sas S. Effect of apamin on the responses to VIP, ATP and NANC neurone stimulation in the rat and cat gastric fundus. *J Auton Pharmacol* 1991; 11: 73-83
- 21 Storr M, Franck H, Saur D, Schusdziarra V,

#### ■同行评价

本文研究了P2X受体对豚鼠胃窦环形肌自发性收缩运动的影响, 方法可信, 结果准确, 但讨论中推论的内容似乎不够严谨, 总体水平较高.



- Allescher HD. Mechanisms of alpha,beta-methylene atp-induced inhibition in rat ileal smooth muscle: involvement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in purinergic inhibition. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 771-779
- 22 Zhuge R, Fogarty KE, Tuft RA, Walsh JV Jr. Spontaneous transient outward currents arise from microdomains where BK channels are exposed to a mean  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the order of 10 microM during a  $\text{Ca}^{2+}$  spark. *J Gen Physiol* 2002; 120: 15-27
- 23 Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985; 16: 433-440
- 24 Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 1993; 324: 219-225
- 25 Jury J, Jager LP, Daniel EE. Unusual potassium channels mediate nonadrenergic noncholinergic nerve-mediated inhibition in opossum esophagus. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 107-112
- 26 Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 157-230
- 27 唐海英, 王英德, 张延军, 解静慧. 功能性消化不良患者的胃排空和胃内食物分布. 世界华人消化杂志 2006; 14: 350-353
- 28 何美蓉, 宋于刚, 何春容. 功能性消化不良患者胃排空障碍与胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1814-1816

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

#### 1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

#### 2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编: 210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话: 025-83472831, 86086091.

# 受体骨髓间质干细胞在大鼠原位肝移植中对免疫排斥的影响

谭浩翔, 高毅, 张会迎, 王琼

谭浩翔, 高毅, 张会迎, 王琼, 南方医科大学珠江医院普外科  
广东省广州市 510280  
谭浩翔, 医学博士, 主要从事肝移植及相关的基础研究.  
广东省科技计划项目, No. 2002A3020206  
通讯作者: 高毅, 510280, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院普外科. gaoyi6146@163.com  
电话: 020-61643210 传真: 020-61643291  
收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-02-08

## Effect on immunological rejection by recipient-derived bone marrow mesenchymal stem cells after orthotopic liver transplantation

Hao-Xiang Tan, Yi Gao, Hui-Ying Zhang, Qiong Wang

Hao-Xiang Tan, Yi Gao, Hui-Ying Zhang, Qiong Wang,  
Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of  
Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guang-  
dong Province, China  
Supported by the Science and Technology Project of  
Guangdong Province, No. 2002A3020206  
Correspondence to: Yi Gao, Department of General Sur-  
gery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University,  
Guangzhou 510280, Guangdong Province,  
China. gaoyi6146@163.com  
Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-02-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the distribution and effect of recipient-derived bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) after orthotopic liver transplantation.

**METHODS:** The model of orthotopic liver transplantation was established using two-cuff method. Wistar rats were used as donors while Sprague Dawley rats were selected as recipients. The BM-MSCs were isolated by the combination of gradient density centrifugation and adhesion separation. The collected BM-MSCs were labeled with 5, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and then infused into livers via portal vein after the operation. The distributions of BM-MSCs in liver, spleen, lung, and kidney were detected by fluorescence microscope 1, 2 weeks and 1 month after the operation. Hepatic

functions and immunological rejection in liver tissues were also detected.

**RESULTS:** BM-MSCs collected by gradient density centrifugation grew in an adhesion mode on the wall and had a ball-like appearance. The cells viability detected by trypanblau staining was about 98%. BM-MSCs were purified at the 3<sup>th</sup> generation. The method of labeling BM-MSCs with CFSE had high efficiency. After infusion, most BM-MSCs congregated in liver and reduced a little after one month. However, only few of them existed in spleen, lung and kidney. Liver function of group C, which received BM-MSCs infusion, was remarkably improved as compared with that of group B, which didn't received BM-MSCs infusion ( $F = 63.179, P < 0.01$ ). The liver function was also statistically different between B and C group at various time points ( $F = 221.026, P < 0.01$ ). Immunohistochemistry showed that the acute immunological rejection was dramatically alleviated in group C.

**CONCLUSION:** Infusion of recipient-derived BM-MSCs can alleviate acute immunological rejection after orthotopic liver transplantation.

**Key Words:** Mesenchymal stem cells; Immunological rejection; Orthotopic liver transplantation

Tan HX, Gao Y, Zhang HY, Wang Q. Effect on immunological rejection by recipient-derived bone marrow mesenchymal stem cells after orthotopic liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1191-1197

## 摘要

**目的:** 观察受体骨髓间质干细胞(BM-MSCs)在大鼠原位肝移植后体内的分布与作用。

**方法:** 以Wistar大鼠为供体, SD大鼠为受体采用双袖套法制作原位肝移植模型, 密度梯度离心法分离与贴壁法富集受体BM-MSCs. CFSE标记术后经门静脉注入, 荧光显微镜分别观测术后1 wk, 2 wk, 1 mo肝脾肺肾组织中BM-

## ■背景资料

肝移植术是治疗中末期肝病的重要方法, 免疫排斥反应是术后主要并发症, 骨髓间充质干细胞的多向分化能力与免疫特性可以为肝移植术后治疗提供新途径。

## ■研究前沿

骨髓间充质干细胞的分化方向与其所处微环境有关,体外实验已经证实骨髓间充质干细胞可以向肝细胞分化,供体移植肝环境是否诱导受体骨髓间充质干细胞向肝细胞分化并发挥作用是目前该领域的研究热点。

MSCs的分布及各时间点检测肝功能及肝组织免疫排斥情况。

**结果:** 密度梯度离心所得到的BM-MSCs为比较一致的球形单个核细胞,台盼蓝染色细胞活力达98%左右,其他细胞少见。BM-MSCs体外分离培养扩增至第3代后较为纯化。应用CFSE可快速高效的标记贴壁BM-MSCs。移植的BM-MSCs主要在受体肝脏中聚集,1 mo后略有减少,而脾肺肾组织内BM-MSCs在1 mo后仅有极少分布。B组无BM-MSCs输入与C组有BM-MSCs输入肝功能比较,C组肝功能有明显好转,B,C组间差异有显著意义( $F = 63.179$ ,  $P < 0.01$ ),B,C组各时段肝功能差异有显著性意义( $F = 221.026$ ,  $P < 0.01$ )。C组肝组织免疫排斥反应明显减轻。

**结论:** 原位肝移植术后输注受体BM-MSCs可有效缓解免疫排斥反应。

**关键词:** 骨髓间质干细胞; 原位肝移植术; 免疫排斥

谭浩翔,高毅,张会迎,王琼. 受体骨髓间质干细胞在大鼠原位肝移植中对免疫排斥的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1191-1197

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1191.asp>

## 0 引言

肝移植是治疗中末期肝病的主要方法,但移植后的免疫排斥反应大大影响了疗效与预后。骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)属于多功能干细胞,体外实验发现,BM-MSCs与淋巴细胞关系密切,为了解BM-MSCs在肝移植后对机体的影响,本实验将受体BM-MSCs标记后移植入受体大鼠体内,观测他的分布与作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF级SD大鼠与Wistar大鼠各60只,雌雄不拘,体质量150-250 g,购自南方医科大学动物中心, Percoll细胞分离液购自美国Pharmacia公司、L-DMEM购自美国Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物公司、CFSE染色剂购自美国Molecular Probes Invitrogen公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 BM-MSCs的获取** 取SD大鼠股骨内骨髓,密度梯度离心法分离与贴壁法分离培养BM-MSCs。第3天换液,第10天传代。

**1.2.2 动物分组** 随机分为3组,每组SD与Wistar大鼠各10只,A组:假手术+BM-MSCs;B组:原位肝

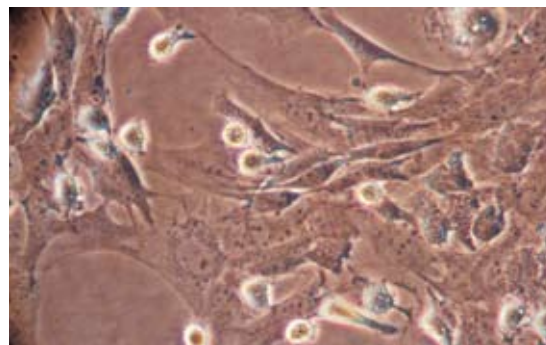


图1 BM-MSCs原代培养48-72 h以圆形和短梭形为主( $\times 400$ )。

移植术;C组:原位肝移植术+BM-MSCs。Kamada双袖套法制作原位肝移植模型<sup>[1]</sup>。

**1.2.3 CFSE标记BM-MSCs体内示踪** 取第3代BM-MSCs约 $1 \times 10^7$ 个,用浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的CFSE标记10 s,100 mL/L胎牛血清终止,DMEM约1 mL重悬,荧光显微镜观测确认染色,于原位肝移植术后经门静脉注入各组,于术后1 wk,2 wk,1 mo取肝脾肺肾组织,冰冻切片 $5 \mu\text{m}$ ,荧光显微镜下观测分布情况。

**1.2.4 肝功能检测** 各组于术后1 wk,2 wk,1 mo取尾静脉血1 mL测谷丙转氨酶(ALT),总胆红素(TBil)值。

**1.2.5 肝组织免疫排斥反应检测** 各组于术后1 wk,2 wk,1 mo取肝组织,石蜡包埋,免疫组化采用sABC法,行HE染色。按照Williams *et al*<sup>[2]</sup>的方法,根据移植肝的组织病变情况,将急性排斥反应的程度分为4级。

## 2 结果

**2.1 BM-MSCs的原代培养与标记** BM-MSCs密度梯度离心所得到的细胞为比较一致的球形单个核细胞,台盼蓝染色细胞活力达98%左右,其他细胞少见。应用CFSE可快速高效的标记贴壁BM-MSCs(图1-2)。

**2.2 CFSE标记BM-MSCs体内肝脾肺肾组织示踪** A组:术后1 wk肝脾肺肾组织内未见BM-MSCs分布;B组未输注BM-MSCs;C组术后1 wk,2 wk,1 mo肝脾肺肾组织内BM-MSCs分布如图3-6所示:肝脏为其主要分布部位且有较长的聚集期,脾肺肾组织有少量分布,聚集时间短暂。

**2.3 肝功能检测** 各组术后各时间点肝功能比较,C组有BM-MSCs注入肝功能损害轻微,恢复较为迅速(表1)。

**2.4 肝组织免疫排斥变化** B组呈重度急性排斥反



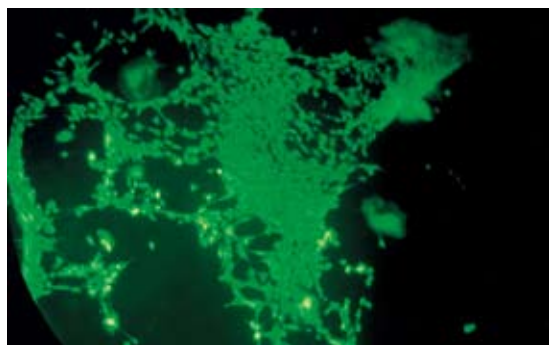


图 2 第三代BM-MSCs贴壁生长呈漩涡状盘旋排列, CFSE标记细胞后, 胞膜呈绿色( $\times 100$ ).

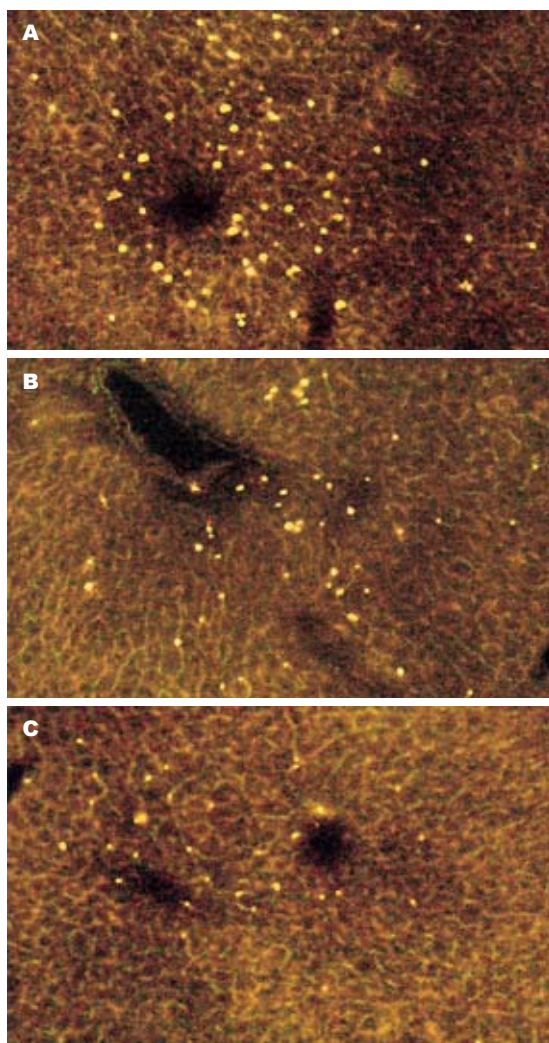


图 3 BM-MSCs肝内分布. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

应, 表现为肝细胞索状排列紊乱, 可见气球样变, 汇管区大量炎性细胞浸润, 血管内膜损伤, 有明显出血, 可见肝细胞坏死, 术后1 mo恢复缓慢. C组呈轻度急性排斥反, 术后1 wk可见汇管区中等量单核细胞浸润, 肝细胞轻度浊肿、气球样变, 血管轻度扩张充血; 术后2 wk细胞浸润减少; 术

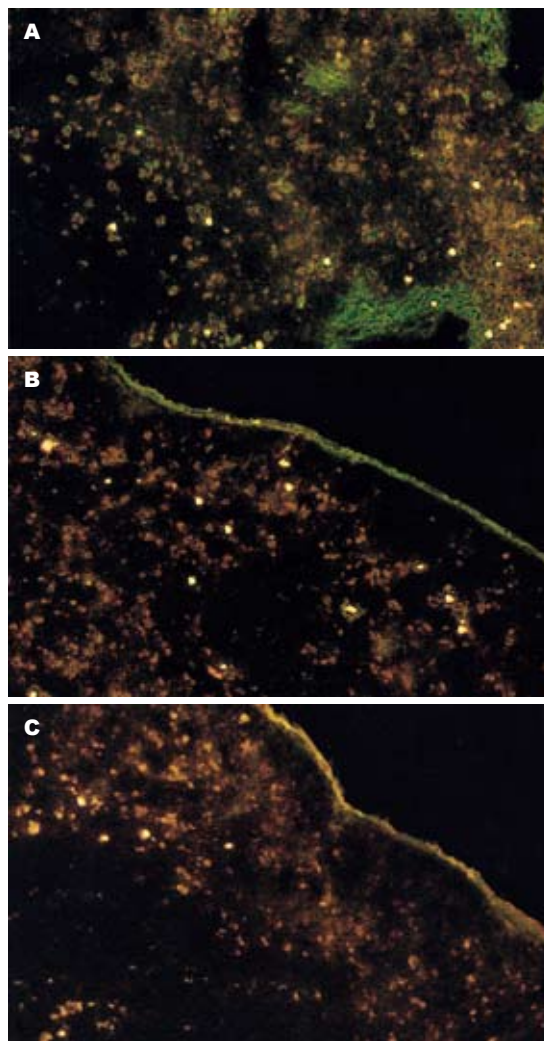


图 4 BM-MSCs脾内分布. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

后1 mo肝细胞索状排列整齐, 小叶结构清晰, 基本恢复正常(图7-8).

### 3 讨论

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是由Gao *et al*<sup>[3]</sup>参考Friedenstein *et al*<sup>[4]</sup>在骨髓基质中通过Percoll密度离心后得到的一类贴壁纺锤形SH2, SH3抗体阳性细胞而正式命名. MSCs体内分布比较广泛, 有关研究发现MSCs可以存在于脐带<sup>[5]</sup>、骨髓<sup>[6]</sup>、肌肉皮肤<sup>[7]</sup>、脂肪<sup>[8]</sup>、关节软骨<sup>[9]</sup>、血管<sup>[10]</sup>、胰脏<sup>[11]</sup>等组织内. Tuli *et al*<sup>[12]</sup>认为骨髓(bone marrow, BM)是MSCs含量最丰富与最易于获取的组织, 此后MSCs被视为体内无组织特异性的修复性细胞库. 机体受损后可以通过多种信号途径直接激活MSCs增殖分化为相应组织细胞, 最终使损伤得到修复. 这些信号途径包括外伤、炎症、肿瘤、趋化因子与微环境等<sup>[13-15]</sup>. MSCs通过这些途径激活后可向多种

### ■ 相关报道

BM-MSCs的定向分化与免疫特性目前均有研究. 王愠芳 *et al*将BM-MSCs植入肝损伤鼠体内后, 发现BM-MSCs可以向肝细胞分化, Zhou *et al*证实异体BM-MSCs可减轻Fisher344大鼠心脏移植过程中的T细胞反应并可能诱导免疫耐受.



### ■创新盘点

本实验应用CFSE将受体骨髓间充质干细胞标记后体内示踪,发现了受体骨髓间充质干细胞在原位肝移植术后的分布规律与可能治疗效果。

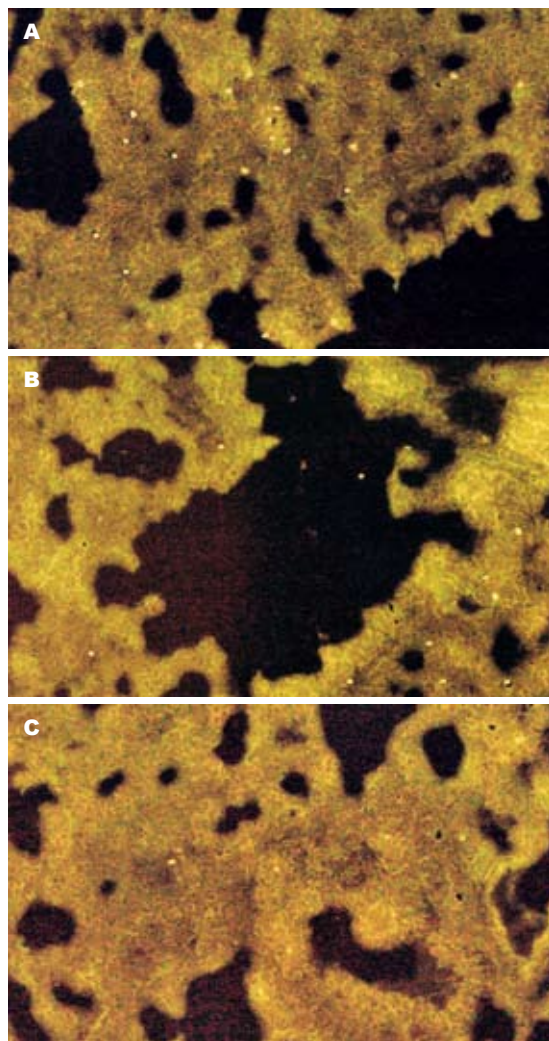


图 5 BM-MSCs肺内分布. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

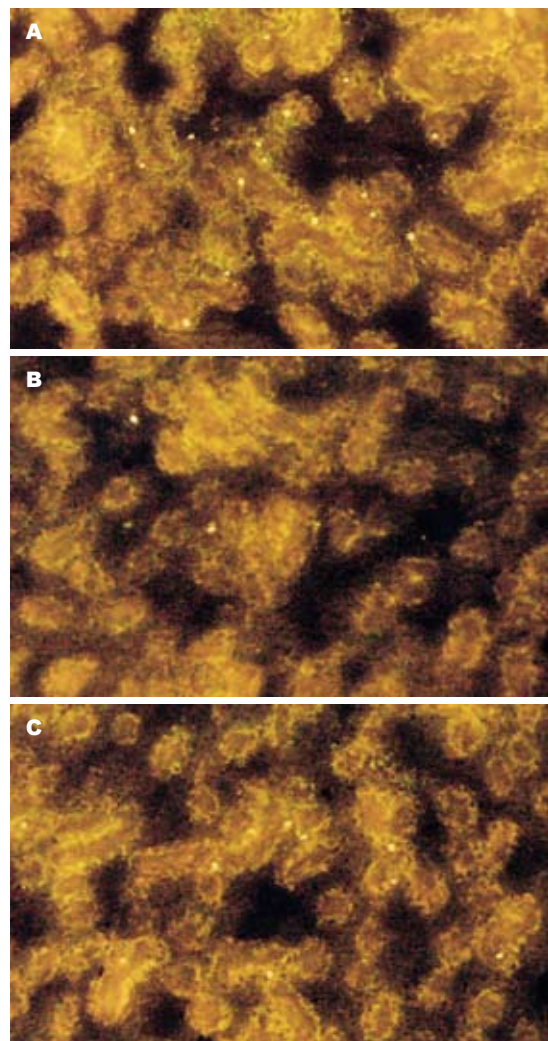


图 6 BM-MSCs肾内分布. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

表 1 各组不同时段ALT与TBil值(mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	ALT(nkat/L)			TBil( $\mu$ mol/L)		
	术后1 wk	术后2 wk	术后1 mo	术后1 wk	术后2 wk	术后1 mo
A	655.29 $\pm$ 5.84	604.94 $\pm$ 2.84	664.9 $\pm$ 1.67	6.52 $\pm$ 1.31	7.22 $\pm$ 1.15	6.48 $\pm$ 2.09
B	4750.77 $\pm$ 4.51	2993.25 $\pm$ 8.85	2501.75 $\pm$ 1.85	32.06 $\pm$ 1.62	28.06 $\pm$ 2.98	23.06 $\pm$ 1.13
C	3246.97 $\pm$ 1.84	2169.85 $\pm$ 3.32	1045.33 $\pm$ 5.29	23.43 $\pm$ 2.91	17.15 $\pm$ 3.44	12.66 $\pm$ 1.74

B, C组间差异有显著性意义( $F = 63.179$ ,  $P < 0.01$ ), B, C组各时段差异有显著性意义( $F = 221.026$ ,  $P < 0.01$ ).

细胞分化,如可以向软骨细胞<sup>[16]</sup>、成骨细胞、脂肪细胞<sup>[17]</sup>、神经细胞<sup>[18]</sup>和心肌细胞<sup>[19]</sup>等细胞分化.新近研究认为BM-MSCs还可以向肝细胞分化,如周一鸣 *et al*<sup>[20]</sup>在体外利用肝细胞生长因子诱导小鼠BM-MSCs向肝细胞分化,汤志华 *et al*<sup>[21]</sup>利用人BM-MSCs也得到了同样的结论.而王韞芳 *et al*<sup>[22]</sup>、吴雄志 *et al*<sup>[23]</sup>进一步将BM-MSCs植入肝损伤鼠体内后,发现BM-MSCs在第

3天即有卵圆细胞的标记物出现,第5天即有AFP的表达.

此外由于BM-MSCs还可以分泌白介素-6、-7、-8、-11、干细胞生长因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、转化生长因子等多种细胞因子及黏附分子,细胞表面还存在多种相关细胞因子受体等特性<sup>[24-25]</sup>,使得BM-MSCs还具有免疫调节效应.目前有关BM-MSCs的免疫抑制作



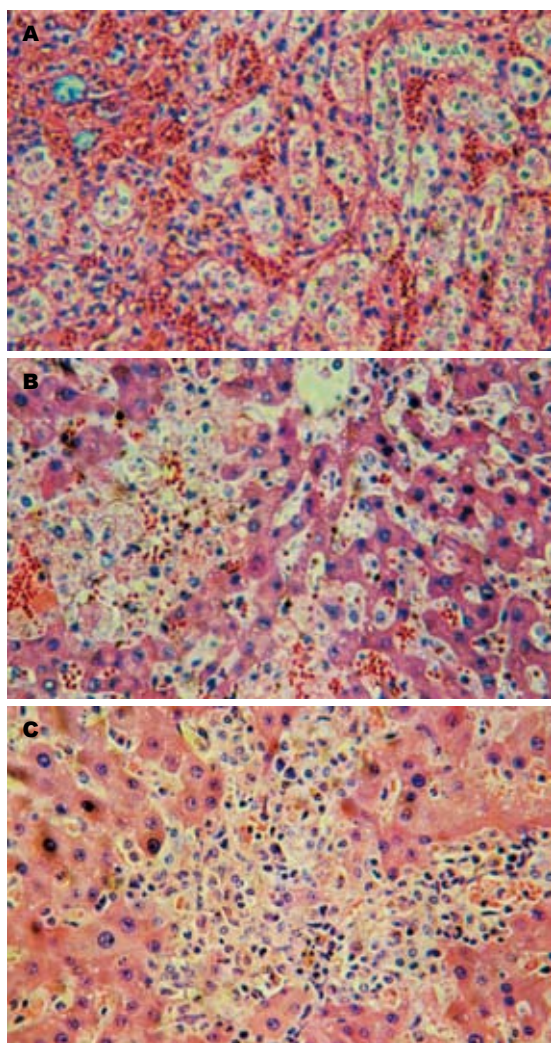


图 7 B组未行BM-MSCs移植术后肝组织免疫排斥反应强烈. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

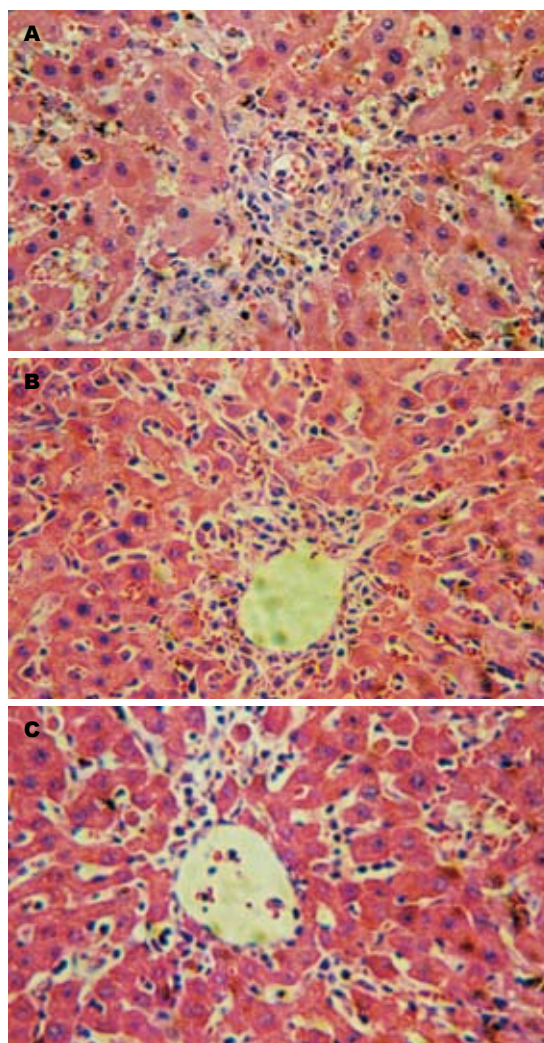


图 8 C组受体BM-MSCs移植供肝后肝组织免疫排斥反应减轻. A: 1 wk; B: 2 wk; C: 1 mo.

#### ■应用要点

利用骨髓间充质干细胞的多分化潜能,加之受体骨髓间充质干细胞具有取材方便、可重复及不受自身免疫攻击等优势,骨髓间充质干细胞可能会在移植领域得到广泛应用.

用已有不少研究. Di Nicola *et al*<sup>[26]</sup>的实验发现, BM-MSCs可以抑制协同刺激分子CD80对同种异体T淋巴细胞增殖效应, Rasmusson *et al*<sup>[27]</sup>的实验也显示, BM-MSCs能够抑制T细胞增殖, 同时认为BM-MSCs的免疫抑制具有可逆性, 将BM-MSCs去除T细胞增殖应答又可恢复, 其程度与BM-MSCs数量呈正相关. 在体内实验中Zhou *et al*<sup>[28]</sup>证实, 异体BM-MSCs可减轻Fisher344大鼠心脏移植过程中的T细胞反应并可能诱导免疫耐受, Bartholomew *et al*<sup>[29]</sup>在狒狒异体皮肤移植中使用 $1 \times 10^7$ - $2 \times 10^7$ /kg个BM-MSCs, 认为疗效与使用环孢素相当.

肝移植作为治疗肝病的新方法逐渐得到广泛运用, 但免疫排斥是影响术后疗效的主要原因, 免疫排斥导致移植肝脏结构与功能的破坏. 因此利用BM-MSCs可以向肝细胞分化潜能, 将受体BM-MSCs输入术后移植供肝内, 将可能

在这一特定微环境中对损伤供体肝细胞发挥替代效应, 使被破坏的供肝细胞数量得以恢复、肝功能缓解. 同样也可利用受体BM-MSCs的免疫抑制效应减少供体肝术后的移植物抗宿主反应.

我们首先应用CFSE标记BM-MSCs观测其在原位肝移植术后的体内分布. CFSE是一种良好的细胞标记物, 定位于细胞膜、细胞质和细胞核, 以细胞核的荧光染色最强. CFSE不影响细胞的增殖能力, 当细胞分裂时, CFSE标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 从而使荧光强度逐渐减弱<sup>[30]</sup>. 而以SD大鼠为受体, Wistar大鼠为供体的双袖套法原位肝移植则为目前通用的肝移植排斥模型. 实验发现, 当BM-MSCs经门静脉注入后绝大部分长时期聚集于供体肝脏. 在术后1 wk, 2 wk, 1 mo停留在肝脏内的BM-MSCs数量变化不大, 而相对于脾肺肾组织BM-MSCs

# ■同行评价

本文研究了受体骨髓间质干细胞在大鼠原位肝移植中对免疫排斥的作用,提示原位肝移植术后输注受体MSCs可缓解免疫排斥反应,方法可靠,结论可信,具有一定的理论与实践意义。

的分布较少,停留时间也较短。提示供体肝脏为受体BM-MSCs提供了定居微环境,在该模型1-2 wk期间,为免疫排斥较为严重的时期,此时应有大量供肝细胞的坏死与受体淋巴细胞的浸润,但由于受体BM-MSCs在1 wk, 2 wk, 1 mo 3个时间段持续聚集于肝脏,此时各时间点相应肝功能均有不同程度缓解,相应镜下表现为供肝细胞的坏死与受体淋巴细胞的浸润减少,提示免疫排斥反应有明显减轻,肝功能恢复迅速。

我们初步证实了原位肝移植术后输注受体BM-MSCs主要分布部位与作用,对其替代学与免疫学变化将在下一步进行探讨。

## 4 参考文献

- Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- Williams JW, Peters TG, Vera SR, Britt LG, van Voorst SJ, Haggitt RC. Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation in man. *Transplantation* 1985; 39: 589-596
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 12-20
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-110
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3349-3360
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264: 51-62
- De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymakers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160: 909-918
- Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1522-1532
- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* 2004; 95: 671-676
- Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 342-349
- Tuli R, Seghatolislami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003; 23: 37-49
- Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res* 2004; 68: 221-230
- Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol* 2005; 279: 336-344
- Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004; 37: 97-110
- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 1745-1757
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3349-3360
- Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 632-636
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705
- 周一鸣, 胡大荣, 姚鹏, 范公忍. 小鼠骨髓干细胞诱导分化为肝细胞的实验研究. *中华肝病杂志* 2004; 12: 722-725
- 汤志华, 闵军, 陈积圣, 霍景山, 胡孝渠, 殷香保, 陈波. 体外诱导人骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的特征及功能. *中国临床康复* 2005; 9: 79-81
- 王温芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙烯醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝病杂志* 2005; 13: 274-277
- 吴雄志, 赵连三, 许倩, 张怡, 唐红. 骨髓间充质干细胞在肝部分切除模型小鼠体内向肝细胞分化. *生物医学工程杂志* 2005; 22: 1234-1237
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-884
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-896
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 305: 33-41
- Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, Sun GC, Cui Q, Zhu HL, Liu JC, Zhang JZ, Wu TJ. Administration of donor-

- derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. *Transplant Proc* 2006; 38: 3046-3051
- 29 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* 2002; 30: 42-48
- 30 陈蕾蕾, 陈军浩, 孙雪梅, 施广飞. 荧光染料CFSE作为细胞标记的特性研究. *细胞与分子免疫学杂志* 2004; 20: 140-141

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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<sup>1</sup>

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	

<sup>1</sup>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



# 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺

## ■背景资料

IBS发病机制研究多集中于脑-肠轴的改变, 其中重点又放在诸如5-HT信号过程等的研究。但对肠道局部的变化迄今未予重视, 还有待加强。近年来, 探讨微生物感染与IBS的关系成为该领域的一个热点, 本文在此基础上探讨肠道菌群生长状态的改变是否与IBS发病有关。

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系生物波研究室 重庆市 400038  
刘俊康, 医学博士, 副教授, 主要从事临床检验及生物复杂性等方面的研究。

重庆市自然科学基金计划资助项目, No. 2006BB5068  
通讯作者: 徐启旺, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系生物波研究室. biowave2000@163.com  
收稿日期: 2006-12-04 接受日期: 2007-02-08

## Colonization of bacterial cryptic growth cells and its influence on the local cellular activity

Jun-Kang Liu, Yu-Fang Liao, Jun-Chen Hu, Xiao-Lan Wu, Qi-Wang Xu

Jun-Kang Liu, Yu-Fang Liao, Jun-Chen Hu, Xiao-Lan Wu, Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. 2006BB5068

Correspondence to: Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. biowave2000@163.com

Received: 2006-12-04 Accepted: 2007-02-08

## Abstract

**AIM:** To explore the predominant location and the influence of bacterial cryptic growth cell (CGC) colonization on the activity of local enterocytes.

**METHODS:** The bacterial CGC was induced by the antibiotics Cefuroxime, and the colonized status was detected by the techniques of local colonization *in vivo*. After the establishment of irritable bowel syndrome (IBS) model, the energy charge (EC) of adenosine triphosphate (ATP) and the ratio of ATP to the total amount of adenylic acid pool in colonic epithelial cells at the ileocecum with better colonization were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

**RESULTS:** Normal rats had just a few bacterial CGC, but a great number of bacterial CGC were

detected in model rats. The bacterial CGC colonized mainly at the ileocecum and ascending colon and fewer at the other parts; the energy charge of ATP and the ratio of ATP to the total amount of adenylic acid pool in the three parts of ileocecal colon of IBS rats were significantly lower than those in the normal control groups, respectively (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** CGC colonization causes a down-regulation of the cellular activity, which may help to explore the mechanism of IBS pathogenesis.

**Key Words:** Irritable bowel syndrome; Intestinal bacterial cryptic growth cell; Ileocecum; Mitochondrion

Liu JK, Liao YF, Hu JC, Wu XL, Xu QW. Colonization of bacterial cryptic growth cells and its influence on the local cellular activity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1198-1201

## 摘要

**目的:** 探讨肠道细菌CGC在体内定植分布的主要位置及这种定植对局部细胞活性的影响。

**方法:** 采用头孢呋辛钠诱导CGC产生, 以体内细菌定植的原位检测方法对结肠各段CGC定植情况进行检测。在建立了IBS动物模型基础上, 采用高效液相色谱法对CGC定植较多的回盲部肠黏膜上皮细胞的腺苷酸能荷及ATP与腺苷酸库比值进行测定, 以反映细胞活性状态。

**结果:** 正常大鼠检测未见大量细菌CGC, 在模型鼠标本的连续检测结果中检出大量CGC。通过肠道细菌定植检测, 细菌CGC主要定植在回盲部和升结肠段; 与正常组相比, IBS模型组回盲部三个肠段的细胞线粒体ATP能荷值以及ATP与总腺苷酸库比值检测结果明显降低, 相应肠段之间数值差异显著(均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 细菌CGC在大鼠体内定植显优势分布, 在局部定植后能引起细胞活性降低。

**关键词:** 肠易激综合征; 肠道细菌潜生体; 回盲部; 线粒体

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺. 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1198-1201

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1198.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种肠道功能性疾病, 严重影响人类生活质量, 缺乏特效治疗药物, 原因在于发病机制不清. 当前的研究主要集中在脑-肠轴异常与IBS发病联系方面<sup>[1]</sup>, 而脑肠轴异常的起因尚未阐明. 近年来抗生素应用<sup>[2]</sup>、肠道感染<sup>[3]</sup>及肠道菌群改变<sup>[4]</sup>与IBS的相关性的研究为此提供了颇有价值的线索, 随之产生的一些新的理论认识如: 生物波理论研究提出的肠道细菌潜生体(cryptic growth cell, CGC)是IBS发病原因的新假说等<sup>[5]</sup>, 本文在此基础上研究CGC在肠道内定植分布特点及其对肠黏膜上皮细胞活性的影响, 以期有助于阐明IBS发病的细菌CGC的相关机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar大鼠, 雌雄各半, 体质量200-250 g, 购自第三军医大学动物所, 常规饲养. 头孢呋辛钠, 葛兰素史克公司出品, J100328;  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ 均为分析纯, 美蓝为市售并常规配制, 干辣椒为市售. 光学显微镜, XSZ-4G, 重庆光学仪器厂; 高效液相色谱, 1100, Agilent.

**1.2 方法** 随机抽取10只大鼠作为正常对照, 实验期间常规饲养. 另取50只大鼠每日按10 g/L  $\times 1$  mL的剂量腹腔注射头孢呋辛钠, 连续3 d给药, 停药后检测粪便细菌CGC情况, 并测定粪便含水量. 将粪便含水量明显升高并且粪便标本连续3次检测到细菌CGC的大鼠挑选出来进行下一步实验, 7 d后给辣椒水刺激(100 g干辣椒加1000 mL水煮沸至500 mL), 连续3 d灌胃总量为小鼠体质量的1/8. 检测小鼠粪便含水量, 粪便含水量又显著增高的小鼠即是实验需要的模型鼠.

**1.2.1 大鼠腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值的测定** 取20只模型鼠处死, 立即剪取回盲部, 于0℃的生理盐水中洗净内容物, 从上到下截为三段肠1(近回肠部分)、肠2(中间部分)、肠3(近盲肠部分). 立即加入9倍0℃的分离介质(0.25 mol/L蔗糖、10 mol/L的Tris-HCl、0.5 mol/L的

EDTA), 匀浆, 然后在1250 g离心8 min, 取上层液体, 5000 g离心10 min取沉淀; 再加入适量分离介质, 混匀后, 5000 g离心10 min弃取上清液, 如此清洗数次, 得到较纯的线粒体, 另取1 mL分离介质加入, 振匀, 得线粒体悬液. 取0.2 mL加入0.4 mL 1.6 mol/L的 $\text{HClO}_4$ , 0℃静置5 min后, 12 500 g离心15 min, 取上清液, 加入2.5 mol/L的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液至液体呈中性(pH6.5). 0℃静置10 min, 再次12 500 g离心15 min, 取上清液为待检样品.

用高效液相色谱法检测. 色谱条件: 检测波长254 nm, 碳十八色谱柱, 流动相为磷酸盐缓冲液(pH6.0), 流速1 mL/min, 柱温37℃, 进样量10  $\mu\text{L}$ .

**1.2.2 细菌CGC在定植部位的检测** 取10只模型鼠处死后, 无菌解剖, 分别取直肠, 降结肠, 横结肠, 升结肠, 盲肠, 回肠, 空肠, 十二指肠段, 沿纵向剖开, 去除内容物, 撕去浆膜层和肌层, 然后将肠段沿肠系膜纵向剖开, 在无菌PBS缓冲液中漂洗除去未定植的细菌, 然后将肠片黏膜面向上平铺于玻片上, 自然干燥. 将干燥好的肠组织标本, 加1 g/L美蓝水溶液浸没2 min, 再用蒸馏水洗至无染液流出为止, 加1 g/L高锰酸钾水溶液浸没标本15 s后迅速用蒸馏水冲洗, 此时标本呈黄绿色, 如果颜色偏蓝, 则重复上一步操作, 直到颜色呈黄绿色为止, 酒精灯干燥, 油镜下观察检测各肠段CGC的定植状况. 定植阳性为在黄绿色的背景上可以看到蓝色的CGC密集排列或散在于表面.

**统计学处理** 采用SPSS11.0统计软件分析处理数据.

## 2 结果

**2.1 CGC肠道定植分布测定结果** 正常大鼠检测的粪便连续3 d未见多量CGC(图1A); 在模型鼠粪便标本的连续检测结果中检出大量CGC(图1B). 对模型鼠肠道多部位进行CGC定植情况检测, 结果显示肠道内CGC主要定植在回盲部和升结肠段, 空肠、十二指肠段未曾发现CGC, 而在降结肠、乙状结肠等部位可见, 但数量不多(表1), CGC在模型鼠肠道回盲部定植的原位染色观察结果如图2所示, 回盲部肠黏膜表面定植有大量的呈纤细状密集排列的肠道细菌CGC; 这些细菌的形态与图1B粪便中所见的CGC形态上相似; 而图1A中未见CGC.

**2.2 CGC定植部位肠黏膜细胞线粒体腺苷酸含量变化检测结果** 能荷测定结果: 采用液相色谱

### ■创新盘点

本文认为, 作为IBS主要发病机制的脑-肠轴异常变化中, 不仅要研究肠道黏膜上的介质受体或介质相关调节因素, 还要研究作为介质作用对象的肠道局部细胞的活性变化, 并探讨引起变化的因素, 这样有助于查出IBS的病因.

### ■应用要点

本文认为, CGC在肠道的定植可以引起局部细胞活性降低, 初步表明是引起脑-肠轴异常变化的因素之一. 因此, 寻找减少CGC产生和排除CGC定植的方法和物质将有助于减少IBS发病.

### ■名词解释

细菌CGC: 是生物波研究中定义的一种细菌特殊生长状态, 表现为代谢方式改变, 菌体延长、运动活泼、较强的侵袭力等特征, 可以受抗菌素作用、生存环境变化等影响而产生。

表 1 CGC体内定植测定结果

大鼠编号	粪便	直肠	降结肠	横结肠	升结肠	盲肠	回肠	空肠	十二指肠
1	++	-	-	-	++	+++	-	-	-
2	++	+	+	++	++	++	+	-	-
3	+++	-	+	++	+++	+++	-	-	-
4	+	-	-	++	++	+++	-	-	-
5	++	+	++	+++	++	+++	-	-	-
6	+++	-	-	++	+++	+++	+	-	-
7	+++	+	++	-	+	+++	-	-	-
8	++	-	-	+	+	++	-	-	-
9	+	-	++	+	+	+++	+	-	-
10	+++	+	+	+	+	+++	-	-	-

结果判定标准: 数20个视野中平均每个视野中出现的CGC的量, -: 0-2个; +: 2-5个; ++: 5-10个; +++: >10个。

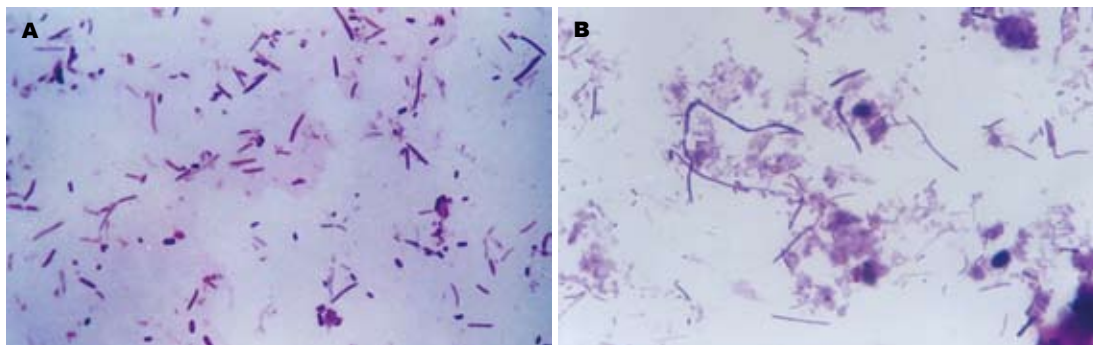


图 1 各组大鼠粪便标本检测结果. A: 正常大鼠; B: 应用头孢夫辛钠后大鼠.

法测定回盲部细胞ATP能荷, 按其计算公式 $EC = (1/2ADP+ATP)/(AMP+ADP+ATP)$ , 分别计算两组大鼠回盲部三肠段的能荷值(图3). 正常鼠回盲部三个肠段肠黏膜细胞ATP能荷值较IBS模型鼠相应各肠段肠黏膜细胞能荷值高, 相应肠段之间数值差异显著( $P<0.05$ ).

ATP与总腺苷酸库比的测定结果: 采用液相色谱法测定ATP与总腺苷酸库比的值(图4). 回盲部三个肠段肠黏膜细胞的ATP与总腺苷酸库比值在正常鼠较IBS模型鼠为高; 数据统计分析表明两者间在个肠段均差异显著( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

IBS的发病机制近年来较多认为与脑肠轴相关, 对其相关的神经递质改变研究较多<sup>[6]</sup>, 对肠动力改变也有较长时间的研究<sup>[7]</sup>, 但对IBS中肠道黏膜细胞的活性研究较少. 较早时候, 在研究肠平滑肌电图的过程中有研究认为肠道组织细胞有活性降低倾向<sup>[8]</sup>. 在此基础上, 本文在抗生素应用后IBS发病率有所上升和抗生素可广泛诱导

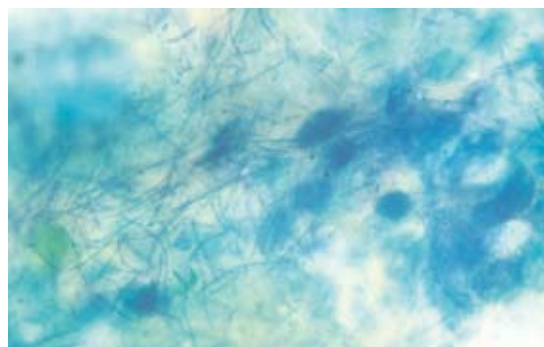


图 2 大鼠回盲部CGC定植观察结果(原位染色,  $\times 1000$ ).

CGC产生的工作基础上, 探讨了抗生素作用下肠道细菌CGC形成后定植情况, 以及定植局部细胞活性情况结果表明, 肠道细菌CGC在产生后主要定植在回盲部, 也有部分分布在升结肠段, 而其余部位则较少或无. 线粒体作为细胞活动的主要供能场所<sup>[9]</sup>, 是物质代谢和能量转化的中心站, 细胞的各种活动所需能量绝大部分由ATP直接提供, 而细胞内80% ATP在线粒体产生. 以HPLC方法检测细胞ATP产生状况, 反映线粒

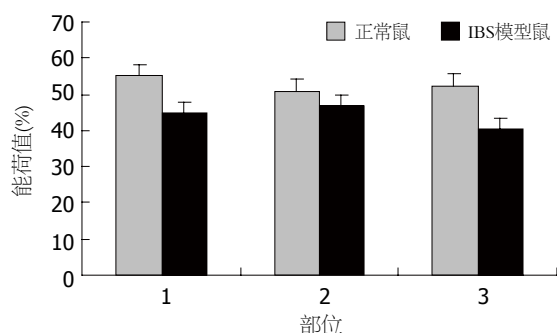


图3 能荷统计直方图.

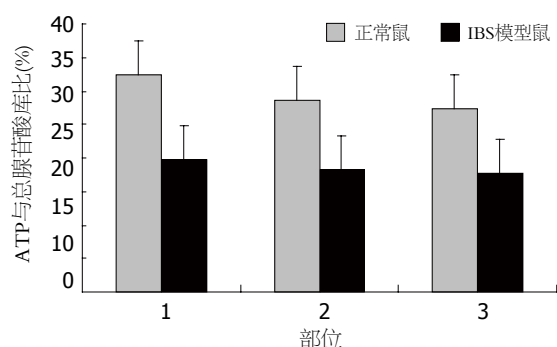


图4 ATP与总腺苷酸库比统计直方图.

体功能, 代表细胞活性, 结果显示, 与正常动物相比, 回盲部有大量CGC定植时其回盲部黏膜细胞的能荷比及ATP与总腺苷酸库的比值均较低, 与正常者相比存在着显著差异. 这提示CGC定植与肠黏膜细胞活性降低之间有联系. 这为

将CGC作为IBS发病的病因的研究和以CGC定植为基础又加上外部刺激进行的IBS动物模型建立研究找到了实验依据. 至于CGC定植引起肠黏膜细胞活性降低的机制初步认为可能与CGC表面存在特殊的化学物质如内毒素等的作用有关, 尚有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Gilkin RJ Jr. The spectrum of irritable bowel syndrome: A clinical review. *Clin Ther* 2005; 27: 1696-1709
- 2 许春娣. 肠易激综合征. 实用儿科临床杂志 2004; 19: 164-165
- 3 Maxwell PR, Rink E, Kumar D, Mendall MA. Antibiotics increase functional abdominal symptoms. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 104-108
- 4 Borgiaonkar MR, Ford DC, Marshall JK, Churchill E, Collins SM. The incidence of irritable bowel syndrome among community subjects with previous acute enteric infection. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1026-1032
- 5 章荣华, 闫国华, 刘俊康, 徐启旺. 肠道细菌潜在体形成的诱导因素实验分析. 实用诊断与治疗杂志 2006; 20: 391-393
- 6 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗, 温淑豪, 张艳萍. 脑-肠互动指向性条件应激肠易激综合征动物模型的建立. 中华消化杂志 2004; 24: 590-593
- 7 邹多武, 许国铭. 内脏高敏感在功能性胃肠病中的作用. 胃肠病学 2006; 11: 451-453
- 8 翟俊山, 李楠. 肠易激综合征患者胃肠激素与免疫细胞变化研究进展. 中国医师杂志 2005; 7: 1295-1296
- 9 Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 246: 21-33

电编 张敏 编辑 张焕兰

#### ■同行评价

本文对肠道细菌CGC定植对肠黏膜上皮细胞的活性变化进行了初步探索, 对IBS的发病机制的研究有一定益处, 而且实验结果可信, 结论比较明确, 为进一步进行IBS机制的深入研究奠定了较好基础.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 消息 •

### 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2006-10-27)



# 壳寡糖及其衍生物对糖尿病大鼠糖耐量及肠道微生态平衡的影响

阎春玲, 刘兵, 刘万顺

## ■背景资料

糖尿病及其并发症是仅次于心脑血管病和癌症的第三大疾病, 糖尿病合并感染是威胁糖尿病患者生命的重要并发症之一。近年来, 糖尿病合并感染的发生率有上升趋势, 感染与糖尿病之间的关系已为人们所重视, 随着医疗技术的发展, 糖尿病并发感染的死亡率虽有所下降, 但其发病率仍居高不下, 达36.8%-55.9%。

阎春玲, 青岛大学医学院病理生理学专业 山东省青岛市 266071

刘兵, 刘万顺, 中国海洋大学海洋生命学院 山东省青岛市 266003

阎春玲, 2006年毕业于中国海洋大学, 海洋生物学博士, 主要从事海洋药物的研究。

国家十五科技攻关资助项目, No. 2001BA708B04-07

通讯作者: 阎春玲, 266071, 山东省青岛市宁夏路308号, 青岛大学医学院, ychl1@163.com

电话: 0532-83780035 传真: 0532-83780029

收稿日期: 2006-12-29 接受日期: 2007-01-20

## Effect of chitooligosaccharides and its derivatives on oral glucose tolerance test and intestinal microecological balance in diabetic rats

Chun-Ling Yan, Bing Liu, Wan-Shun Liu

Chun-Ling Yan, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Bing Liu, Wan-Shun Liu, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by the National Key Technology Research and Development Program of China during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 2001BA708B04-07

Correspondence to: Dr. Chun-Ling Yan, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, 308 Ningxia Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. ychl1@163.com

Received: 2006-12-29 Accepted: 2007-01-20

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of chitooligosaccharides (COS) and N-acetylglucosamine (NAG) at different doses on oral glucose tolerance test (OGTT) and intestinal microecological balance in rats with diabetes induced by streptozotocin (STZ).

**METHODS:** The diabetic model of Wistar rats was duplicated with STZ intraperitoneally (65 mg/kg, once). The rats were randomly divided into 9 groups: normal control, metformin, diabetes, COS-H, COS-M, COS-L, NAG-H, NAG-M, and NAG-L group. The rats in normal control and diabetes group were treated with distilled

water (10 mL/kg), and those in metformin group were treated with metformin (200 mg/kg). The rats in COS-H, COS-M and COS-L group received high-, moderate- and low-dose COS treatment (250, 500, 1500 mg/kg), while those in NAG-H, NAG-M, and NAG-L group received high-, moderate- and low-dose NAG treatment (250, 500, 1500 mg/kg). All the drugs were administered by gastric irrigation. Sixty days later, the general conditions were observed. OGTT was performed and the intestinal flora were cultured, calculated and identified. The value of B/E was also calculated.

**RESULTS:** COS and NAG improved the symptoms such as decrease of body weight, over-drinking and over-eating in diabetic rats, and the effects of high and moderate doses were superior to those of low ones. The glucose tolerance was decreased in all the diabetic rats, but was improved significantly ( $P < 0.05$ ) by different concentrations of COS (moderate dose produced the best effect) and low and moderate concentrations of NAG (low dose produced the best effect). In diabetic rats, the numbers of pathogenetic *E. Coli* and *Enterococcus* were increased while those of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* were decreased. However, after administration with COS and NAG, the numbers of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* increased significantly, while those of pathogenetic *E. Coli* and *Enterococcus* decreased significantly ( $P < 0.01$ ). The effects were increased with the elevation of COS and NAG concentrations. In diabetic rats, the total numbers of aerobes were increased, while those of anaerobes were increased markedly. The ratio of anaerobes to aerobes and the value of B/E were less than one. COS enhanced the value of B/E, while NAG augmented the total numbers of anaerobes ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** COS and NAG have effective effects on the general clinical symptom, disorders of glucose tolerance at different concentrations, and they can modulate the imbalance of intestinal microecology.

**Key Words:** Chitooligosaccharides; N-acetylglucosamine; Diabetes; Mouse; Oral glucose tolerance test; Intestinal microecological balance

Yan CL, Liu B, Liu WS. Effect of chitooligosaccharides and its derivatives on oral glucose tolerance test and intestinal microecological balance in diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1202-1207

## 摘要

**目的:** 研究不同剂量的壳寡糖和N-乙酰氨基单糖对STZ诱导的糖尿病大鼠的糖耐量作用及肠道微生态平衡的影响。

**方法:** 按65 mg/kg体质量一次性ip STZ制备糖尿病大鼠模型。大鼠随机分为9组: 正常对照组, 二甲双胍阳性对照组, 阴性对照组, 壳寡糖高、中、低剂量组, N-乙酰氨基单糖高、中、低剂量组。正常对照组、阴性对照组每天灌胃蒸馏水(10 mL/kg); 二甲双胍阳性对照组每天200 mg/kg灌胃; 壳寡糖、N-乙酰氨基单糖组分别按250, 500, 1500 mg/kg每天灌胃, 连续60 d, 然后观察各组大鼠的一般状况和饮食。按2.5 g/kg体质量葡萄糖水溶液灌胃(ig), 测定各组大鼠0, 0.5, 1, 2 h耐糖血糖值, 并分别对各组大鼠肠道菌群进行培养, 计数并计算B/E值。

**结果:** 不同剂量的壳寡糖和N-乙酰氨基单糖均能不同程度改善糖尿病大鼠的体质量减轻、多饮、多食等症状, 中、高剂量组的效果要优于低剂量组。各模型组的葡萄糖糖耐量均有不同程度受损。壳寡糖各组葡萄糖耐量的显著改善( $P<0.01$ ), 中剂量组效果最好; N-乙酰氨基单糖低剂量和中剂量显著改善葡萄糖耐量( $P<0.05$ ), 低剂量组的效果最好。糖尿病大鼠肠道内大肠杆菌和肠球菌数量升高, 而乳酸杆菌和双歧杆菌的数量明显下降。壳寡糖各剂量组可明显降低大肠杆菌和肠球菌的数量( $P<0.01$ ), 对双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖作用也有显著作用( $P<0.01$ ), 且改善效果随着剂量的增加而增加; N-乙酰氨基单糖各剂量组随着剂量的增加使大肠杆菌和肠球菌的数量降低, 高剂量组乳酸杆菌的增殖作用显著提高( $P<0.01$ )。单纯糖尿病大鼠组需氧菌总数量升高, 而厌氧菌总数量升高明显下降, 厌氧菌与需氧菌之比及B/E值 $<1$ 。壳寡糖各剂量组均可使B/E值显著升高( $P<0.01$ ); N-乙酰氨基单糖高剂量组厌氧菌总数显著改善( $P<0.05$ )。

**结论:** 不同剂量的壳寡糖和N-乙酰氨基单糖均能不同程度的改善糖尿病大鼠的体质量减轻、多饮、多食等症状, 改善葡萄糖耐量, 对

肠道微生态有调节作用。

**关键词:** 壳寡糖; N-乙酰氨基单糖; 糖尿病; 大鼠; 糖耐量; 肠道微生态平衡

阎春玲, 刘兵, 刘万顺. 壳寡糖及其衍生物对糖尿病大鼠糖耐量及肠道微生态平衡的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1202-1207

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1202.asp>

## 0 引言

糖尿病是一种危害人们生命并且难以治愈的顽症。医学统计表明, 糖尿病及其并发症是仅次于心脑血管病和癌症的第三大疾病, 目前我国糖尿病患者约有3500多万人, 每年以75万人的速度增加。目前, 糖尿病及其并发症的病因、发病机制尚未完全阐明。国内外大量研究证实<sup>[1-2]</sup>, 糖尿病患者的肠内细菌群往往结构紊乱, 肠道内有益菌数量低, 特别是双歧杆菌的数量和占有率远远低于正常人, 腐败菌的数量明显高于正常人, 这些状况给患者带来许多十分不利的影响。通过食用一些含双歧因子(bifidusfactor, BF)较高的食物或双歧杆菌制剂, 使肠道内有益菌增加, 短链脂肪酸含量增加, 能够改变这种状况。壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)是BF的一种, 可以调节动物肠道内微生物的代谢活动, 改善肠道微生物区系分布, 促进双歧杆菌生长繁殖, 从而提高机体免疫力。有关壳寡糖作为微生态调节剂的作用, 机制方面的报道, 国内已有相关报道<sup>[3-7]</sup>, 但对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠的肠道微生态的调节作用还未见报道。此外, 不同剂量、分子量的壳寡糖的抑菌效果和促菌增殖能力有所不同<sup>[8-11]</sup>。本文从这个角度对不同剂量壳寡糖及N-乙酰氨基单糖对STZ诱导的糖尿病大鼠改善糖耐量和肠道微生态的作用进行了探讨。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar大鼠89只, 体质量 $200\pm 20$  g。壳寡糖, 本实验室制备, 分子质量2200 Da; N-乙酰氨基单糖(青岛海汇); 盐酸二甲双胍(北京中会药业); 链脲佐菌素(STZ)(Sigma); 血糖测定试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型制作** 80只大鼠禁食12 h, 自由饮水。按65 mg/kg ip STZ。正常对照组注射等量的柠檬酸缓冲液。注射7 d后, 眼眶静脉丛采血检测餐后2

## ■研究前沿

糖尿病患者的肠内细菌群往往结构紊乱, 肠道内有益菌数量低, 腐败菌的数量明显高于正常人, 这给患者带来许多十分不利的影响。双歧杆菌、乳杆菌是肠道内主要的生理性有益菌, 与其他厌氧菌一起形成肠道的生物屏障, 作为一种天然自动免疫, 维持肠道菌群平衡, 在预防、保健医学中是许多学者所关注的热门课题之一。

### ■创新盘点

本文的创新之处在于研究了不同剂量的壳聚糖及其衍生物对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠糖耐量作用及肠道微生态平衡的影响,壳聚糖无毒、无抗原性、资源丰富,开发应用于微生态调节剂具有较广泛的前景。

h血糖(2 h PG),定性尿糖。尿糖在+++以上,血糖>11.11 mmol/L,有多食、多饮、多尿症状者为成模标准,共有72只大鼠达到模型标准。

**1.2.2 动物分组及受试物剂量** 大鼠分为9组:正常对照组(未处理的正常大鼠,  $n = 9$ );阴性对照组(单纯糖尿病模型组, DR,  $n = 9$ )、二甲双胍阳性对照组(Met,  $n = 9$ )、壳寡糖高、中、低剂量组(COS-H, COS-M, COS-L,  $n = 9$ )、N-乙酰氨基单糖高、中、低剂量组(NAG-H, NAG-M, NAG-L,  $n = 9$ )均来自成模大鼠;正常对照组(normal control),二甲双胍阳性对照组(Met),阴性对照组(单纯糖尿病模型组, DR),壳寡糖高、中、低剂量组(COS-H, COS-M, COS-L),N-乙酰氨基单糖高、中、低剂量组(NAG-H, NAG-M, NAG-L);正常对照组、阴性对照组每天灌胃蒸馏水(10 mL/kg);二甲双胍阳性对照组每天200 mg/kg灌胃;壳寡糖、N-乙酰氨基单糖组分别按250, 500, 1500 mg/kg每天灌胃,连续60 d。

**1.2.3 观察指标** (1)一般状态观察:观察各组大鼠的一般状况和饮食。每天定时称质量,灌胃给药,根据体质量调整用药量;(2)糖耐量测定:连续灌胃60 d后,禁食12 h,末次给药2 h后眼眶取血,测空腹血糖(FPG),大鼠灌胃葡萄糖水溶液(2.5 g/kg),分别于给糖后0.5, 1, 2 h眼眶后静脉丛采血,葡萄糖氧化酶法测血糖值,以空腹血糖值作为零时血糖,描制血糖值随时间变化曲线。糖耐量曲线下面积(area under curve, AUC)用几何面积相加法计算<sup>[13]</sup>。以阴性对照组糖耐量曲线下面积为100%,计算糖耐量曲线下面积百分率;(3)肠道菌群检测:以无菌方法取大鼠盲肠内容物0.1-0.2 g,用稀释液稀释至 $10^{-7}$ 。选择适当的稀释度取菌液50  $\mu$ L接种于各种培养基上。EMB平板和Ec平板选用 $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ 三个稀释度,Lbs平板和Bs平板选用 $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ 三个浓度的菌液,37℃培养24-48 h后观察结果;用于乳杆菌培养的LBs平板和用于双歧杆菌培养的BS平板放入采用焦性没食子酸法造成厌氧环境的厌氧袋中37℃培养48-72 h。培养结束后镜检并计算菌落数。并进行大肠杆菌种属、肠球菌种属、乳酸杆菌种属和双歧杆菌种属鉴定<sup>[12-16]</sup>。

**统计学处理** 全部资料用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用SPSS软件进行分析。

## 2 结果

**2.1 一般状态观察** STZ注射后72 h,糖尿病大鼠逐渐出现多饮、多尿、多食、脱毛、消瘦、活

表 1 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠AUC的影响 ( $n = 9$ , mean  $\pm$  SD)

分组	AUC[mmol/(L·h)]	AUC(%)
Control	21.66 $\pm$ 6.18 <sup>b</sup>	17.69
Met	105.33 $\pm$ 3.74 <sup>d</sup>	86.05
DR	122.40 $\pm$ 12.05 <sup>d</sup>	100.00
COS-H	85.79 $\pm$ 23.90 <sup>bd</sup>	70.09
COS-M	84.08 $\pm$ 5.93 <sup>d</sup>	68.69
COS-L	86.07 $\pm$ 8.06 <sup>bd</sup>	70.32
NAG-H	103.86 $\pm$ 19.66 <sup>d</sup>	84.86
NAG-M	98.29 $\pm$ 3.18 <sup>ad</sup>	80.30
NAG-L	94.22 $\pm$ 15.27 <sup>ad</sup>	76.97

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 单纯糖尿病模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

动减少等特征。不同剂量的壳寡糖对STZ诱导的糖尿病大鼠的一般状态都有明显的改善,可以显著的改善糖尿病大鼠体质量减轻、多饮、多食等症状,中、高剂量组的效果要优于低剂量组。

**2.2 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠葡萄糖耐量的影响** 从各时相血糖值可知,壳寡糖各组对0.5 h PG, 1 h PG, 2 h PG均有较大程度降低(图1A)。N-乙酰氨基单糖对0.5 h PG均无降低作用,与阴性对照组比较无显著差异,而对1 h PG, 2 h PG均有较大程度降低(图1B)。

各模型组的葡萄糖糖耐量均有不同程度受损,AUC与正常组比较均有显著差异( $P < 0.01$ )。壳寡糖各组与阴性对照组比较均有极显著差异( $P < 0.01$ ),中剂量组效果最好。N-乙酰氨基单糖低剂量组和中剂量组与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ ),低剂量组效果最好(表1)。

**2.3 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对DM大鼠肠道菌群的影响**

**2.3.1 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠肠道菌群数量的影响** 糖尿病大鼠肠道内大肠杆菌和肠球菌数量升高,而乳酸杆菌和双歧杆菌的数量明显下降,与正常组比较均有极其显著差异( $P < 0.01$ )。壳寡糖各剂量组可明显降低大肠杆菌和肠球菌的数量( $P < 0.01$ ),对双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖作用与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ),且改善效果随着剂量的增加而增加;N-乙酰氨基单糖各剂量组随着剂量的增加使大肠杆菌和肠球菌的数量降低,高剂量组对乳酸杆菌的增殖作用与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ );但各剂量组对双歧杆菌无增殖作用(表2)。

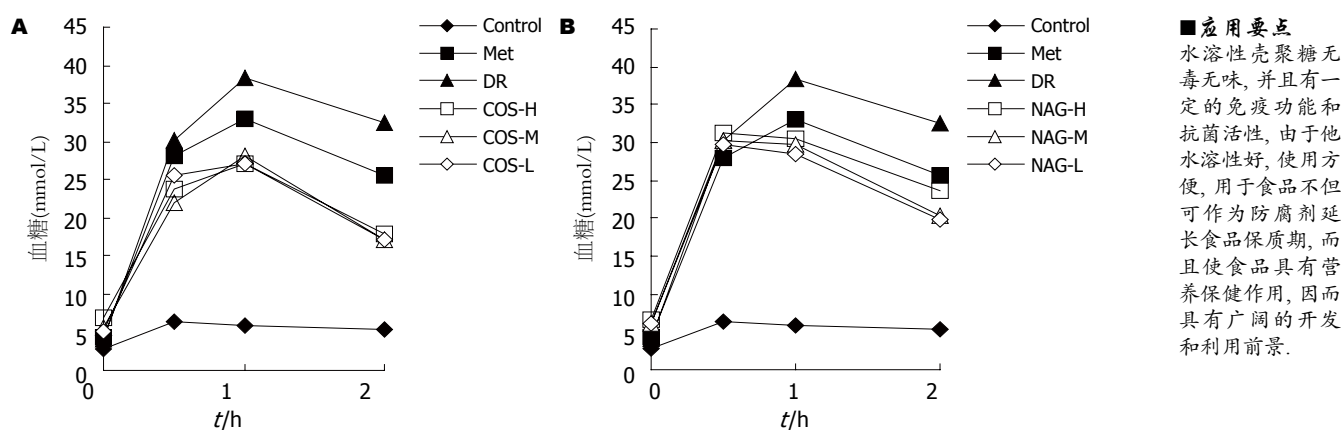


图 1 壳寡糖和N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠葡萄糖耐量的影响. A: 壳寡糖; B: N-乙酰氨基单糖.

**应用要点**  
水溶性壳聚糖无毒无味, 并且具有一定的免疫功能和抗菌活性, 由于他水溶性好, 使用方便, 用于食品不但可作为防腐剂延长食品保质期, 而且使食品具有营养保健作用, 因而具有广阔的开发和利用前景.

表 2 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠60 d后肠道菌群数量的影响(logCFU,  $n = 9$ , mean  $\pm$  SD)

分组	EMB	Ec	Lbs	Bs
Control	7.22 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	7.88 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	10.18 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	9.87 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Met	8.52 $\pm$ 0.31 <sup>bd</sup>	9.40 $\pm$ 0.20 <sup>ad</sup>	9.82 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	8.51 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>
DR	9.76 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	9.96 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	9.17 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	8.25 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>
COS-H	8.43 $\pm$ 0.48 <sup>bc</sup>	8.49 $\pm$ 0.36 <sup>bd</sup>	9.69 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	9.17 $\pm$ 0.06 <sup>bd</sup>
COS-M	8.15 $\pm$ 0.07 <sup>bd</sup>	8.31 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	9.55 $\pm$ 0.34 <sup>d</sup>	9.03 $\pm$ 0.13 <sup>bd</sup>
COS-L	8.86 $\pm$ 0.06 <sup>bd</sup>	7.87 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	8.81 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	9.01 $\pm$ 0.20 <sup>bd</sup>
NAG-H	7.91 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup>	10.02 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>	9.84 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	8.30 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
NAG-M	8.71 $\pm$ 0.81 <sup>bd</sup>	9.07 $\pm$ 0.80 <sup>bd</sup>	9.49 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>	8.34 $\pm$ 0.53 <sup>d</sup>
NAG-L	8.92 $\pm$ 0.11 <sup>bd</sup>	8.83 $\pm$ 0.12 <sup>bd</sup>	9.17 $\pm$ 0.49 <sup>d</sup>	8.14 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 单纯糖尿病模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组.

2.3.2 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对DM大鼠肠道菌群厌氧菌与需氧菌之比和B/E值的影响 单纯糖尿病大鼠组需氧菌总数量升高, 而厌氧菌总数量升高明显下降, 厌氧菌与需氧菌之比和B/E值 $< 1$ , 与正常组比较均有显著差异( $P < 0.01$ ). 壳寡糖各剂量组对需氧菌总数量, 厌氧菌总数量, 厌氧菌与需氧菌之比和B/E值均有改善作用, 与阴性对照组比较差异显著( $P < 0.01$ ); N-乙酰氨基单糖各剂量组对需氧菌总数量有改善, 高剂量组对厌氧菌总数量的改善, 与阴性对照组比较有极显著差异( $P < 0.05$ ), 各剂量组对厌氧菌与需氧菌之比和B/E值均有改善, 改善效果随着剂量的增加而增加(表3).

### 3 讨论

以往评价药物的降血糖作用, 往往采用测定空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)或随机血糖, 来判断药物是否有效, 但这两者均不能真正反映机体的血糖水平. 国内外已有报道反映了

FPG的局限性及不敏感性<sup>[17-19]</sup>. 葡萄糖耐量试验(oralglucosetolerancetest, OGTT), OGTT是一种葡萄糖负荷试验, 用以了解机体对葡萄糖的调节能力, 一直被公认为诊断糖尿病的金标准<sup>[20]</sup>, 而餐后2 h PG是糖尿病慢性并发症的独立高危因素<sup>[21-23]</sup>, 其敏感性要高于空腹血糖. 本实验结果表明, 不同剂量的壳寡糖对糖尿病大鼠60 d前后餐后2 h PG均有不同程度的降低, 壳寡糖中剂量组(500 mg/kg)的降血糖效果最好, 可使血糖降至16.14 mmol/L, 降糖率为47.481%, 与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ). 壳寡糖各组糖耐量曲线下面积(AUC)较低, 与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ), 中剂量组效果最好, 仅为68.694%. 壳寡糖的降血糖作用与壳寡糖可以调节机体的酸碱平衡进而增加胰岛素的敏感性<sup>[24-25]</sup>以及能有效的促进胰岛细胞的增殖, 促进受损胰岛细胞的恢复等方面有关<sup>[26]</sup>. 本研究结果表明, N-乙酰氨基单糖各组也可不同程度降低AUC. 从各时相血糖值可知, 壳寡糖各组对0.5



## ■名词解释

1 葡萄糖耐量 (OGTT) 试验: OGTT 试验是一种口服葡萄糖负荷试验, 用以了解人体对进食葡萄糖后的血糖调节能力。通过 OGTT 试验, 可以早期发现糖代谢异常, 早期诊断糖尿病。

2 肠道微生态: 正常情况下, 肠道微生态处于平衡状态, 正常菌群中的专性厌氧菌如双歧杆菌可形成一层菌膜屏障, 抑制肠道内(主要为肠杆菌科细菌)以及外源性潜在致病菌对肠上皮细胞的黏附, 其功能主要在于防止肠道内细菌及内毒素移位。

表 3 壳寡糖, N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠 60 d 后肠道菌群厌氧菌与需氧菌之比和 B/E 值的影响

分组	Aerobe (log CFU)	Anaerobe (log CFU)	Anaerobe/Aerobe	B/E
Control	15.11 ± 0.17 <sup>b</sup>	20.06 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.04 <sup>b</sup>
Met	17.93 ± 0.45 <sup>bd</sup>	18.3 ± 0.22 <sup>bd</sup>	1.02 ± 0.03 <sup>bd</sup>	0.99 ± 0.05 <sup>bd</sup>
DR	19.36 ± 0.20 <sup>d</sup>	17.24 ± 0.33 <sup>d</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.86 ± 0.02 <sup>d</sup>
COS-H	16.89 ± 0.18 <sup>bd</sup>	18.97 ± 0.2 <sup>bd</sup>	1.12 ± 0.02 <sup>bd</sup>	1.15 ± 0.07 <sup>bd</sup>
COS-M	16.47 ± 0.14 <sup>bd</sup>	18.58 ± 0.3 <sup>bd</sup>	1.13 ± 0.02 <sup>bd</sup>	1.11 ± 0.01 <sup>bd</sup>
COS-L	16.74 ± 0.18 <sup>bd</sup>	17.82 ± 0.35 <sup>d</sup>	1.06 ± 0.01 <sup>bd</sup>	1.02 ± 0.02 <sup>bd</sup>
NAG-H	17.93 ± 0.25 <sup>bd</sup>	18.48 ± 0.49 <sup>bd</sup>	1.03 ± 0.02 <sup>bd</sup>	1.09 ± 0.06 <sup>bd</sup>
NAG-M	17.78 ± 1.38 <sup>bd</sup>	17.83 ± 0.84 <sup>d</sup>	1.00 ± 0.03 <sup>bd</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>bd</sup>
NAG-L	17.75 ± 0.22 <sup>bd</sup>	17.31 ± 0.65 <sup>d</sup>	0.97 ± 0.04 <sup>bd</sup>	0.91 ± 0.03 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 单纯糖尿病模型组; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 正常对照组。

h PG, 1 h PG, 2 h PG 均有较大程度降低。而 N-乙酰氨基单糖对 0.5 h PG 均无降低作用, 而对 1 h PG, 2 h PG 均有较大程度降低。提示 N-乙酰氨基单糖和壳寡糖的降糖机制可能不同。

糖尿病患者由于饮食受到严格的限制, 特别是对碳水化合物的摄入限制很严, 导致肠内细菌群的结构紊乱, 腐败菌以及腐败产物的数和量比普通入高, 而肠道内有益菌数量低, 特别是双歧杆菌的数量和占有率远远低于正常人。且 II 型糖尿病患者、I 型糖尿病患者的肠内菌群变化依次恶化。这些状况给糖尿病患者带来许多十分不利的影响。本研究表明, 壳寡糖各剂量组可以显著降低大肠杆菌, 肠球菌和需氧菌总的数量, 促进双歧杆菌, 乳酸杆菌的增殖, 提高厌氧菌的总数量, 提高厌氧菌与需氧菌之比和 B/E 值, 与任林 *et al*<sup>[6]</sup> 报道相符。而 N-乙酰氨基单糖各剂量对厌氧菌与需氧菌之比和 B/E 值也有升高, 但对乳酸杆菌和双歧杆菌的增殖作用不明显, 其机制可能主要是 N-乙酰氨基单糖可以抑制需氧菌大肠杆菌, 肠球菌的数量, 且随着剂量的增高而效果显著。

壳寡糖降低大肠杆菌, 肠球菌和需氧菌总的数量, 促进双歧杆菌, 乳酸杆菌的增殖, 提高厌氧菌的总数量, 提高厌氧菌与需氧菌之比和 B/E 值的机制可能有以下 3 点: (1) 壳寡糖作为双歧因子 (bifidus factor, BF) 对肠道有益微生物的增殖作用<sup>[27-28]</sup>。动物对碳水化合物的消化主要限于 α-1, 4 糖苷键, 对其他糖苷键的分解能力较弱或不能分解, 因此, 壳寡糖在小肠内不能被分解, 只能以未降解的形式进入后段肠道被有益微生物如乳酸杆菌、双歧杆菌等分解利用, 使肠道有益微生物得到大量繁殖, 成为肠道内优势菌群; (2)

动物消化道内微生物对外源性病原菌存在着竞争性排斥作用。壳寡糖在肠道内占据肠黏膜表面的定植位点, 形成生物学屏障, 构成肠道的定植抗力, 阻止致病菌的定植和侵入, 减轻糖尿病的肠道菌群紊乱程度; (3) 壳寡糖对大肠杆菌的直接抑制作用: 赵玉清 *et al*<sup>[29]</sup> 用圆滤纸片法测定了壳聚糖对大肠杆菌的抑制效果, 证明壳聚糖对大肠杆菌的抑制作用达到极显著差异。此外, 有研究<sup>[30]</sup>发现有一种大肠杆菌能产生胰岛素样物质, 这种物质进入血行后, 先与胰岛素的靶细胞接触封闭了胰岛素受体。当真正的胰岛素与靶细胞接触时已无法发挥作用, 于是血糖不能被吸收和利用而发生糖尿病。此种情况下应用具有扶植双歧杆菌、乳杆菌等的壳寡糖, 使之发挥生物拮抗作用, 排除能产生胰岛素样物质的大肠杆菌, 糖尿病即可得到缓解。因此壳寡糖的降糖机制与其调节肠道菌群, 改善肠道微生态的作用有这必然联系。

## 4 参考文献

- Hansen AK, Ling F, Kaas A, Funda DP, Farlov H, Buschard K. Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 220-225
- 姚君厘, 杨永年, 付华, 付东波. 糖尿病并发感染及其危险因素分析. *中华医院感染杂志* 1998; 8: 216-218
- 陈超群, 任林, 吴移谋, 薛金花. 壳寡糖对小鼠肠道菌群的影响. *实用预防医学* 2000; 7: 413-414
- 任林, 李邦良, 高仕瑛, 陈超群, 薛金花. 甲壳低聚糖对抗生素脱污染小鼠肠道菌群的影响. *实用预防医学* 2001; 8: 21-22
- 竺国芳, 赵鲁杭. 几丁寡糖和壳寡糖的研究进展. *中国海洋药物* 2000; 19: 43-46
- 任林, 李邦良, 高仕瑛, 陈超群, 李木兰. 甲壳低聚糖对糖尿病小鼠血糖和肠道菌群的影响. *中国生化药物杂志* 2001; 22: 227-229
- 任林, 陈超群, 李邦良, 薛金华, 刘小军, 高仕瑛. 甲壳

- 低聚糖对小鼠肠道正常菌群的影响. 南华大学学报·医学版 2001; 29: 4-5
- 8 魏新林, 夏文水. 甲壳低聚糖的生理活性研究进展. 中国药理学通报 2003; 19: 614-617
- 9 Tsai GJ, Wu ZY, Su WH. Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J Food Prot* 2000; 63: 747-752
- 10 Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL. Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *J Food Prot* 2004; 67: 396-398
- 11 Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 553-557
- 12 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992: 438-439
- 13 甘肃农业大学. 兽医微生物学实验指导. 北京: 农业出版社, 1991: 23-26
- 14 肖干雄. 微生物学与微生物检验. 天津: 天津科技出版社, 1991: 481-482
- 15 李影林. 临床微生物学及检验. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 83-85
- 16 杨洁彬, 郭兴华. 乳酸菌. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 43-44
- 17 Sorkin JD, Muller DC, Fleg JL, Andres R. The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature. *Diabetes Care* 2005; 28: 2626-2632
- 18 Haeckel R, Raber R, Wosniok W. Prevalence-dependent decision limits for the early detection of type 2 diabetes mellitus in venous blood, venous plasma and capillary blood during glucose challenge. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1462-1471
- 19 Anand SS, Razak F, Vuksan V, Gerstein HC, Malmberg K, Yi Q, Teo KK, Yusuf S. Diagnostic strategies to detect glucose intolerance in a multiethnic population. *Diabetes Care* 2003; 26: 290-296
- 20 蒋国彦. 糖尿病学. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 105
- 21 Kondo Y, Nakatani A, Hayashi K, Ito M. Low molecular weight chitosan prevents the progression of low dose streptozotocin-induced slowly progressive diabetes mellitus in mice. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 1458-1464
- 22 Streja D. Metabolic syndrome and other factors associated with increased risk of diabetes. *Clin Cornerstone* 2004; 6 Suppl 3: S14-29
- 23 Bonora E, Muggeo M. Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in Type II diabetes: the epidemiological evidence. *Diabetologia* 2001; 44: 2107-2114
- 24 史奎雄. 糖尿病与膳食纤维. 中国食物与营养 1998; 33-34
- 25 艾永循, 王胜男, 杨德森, 周国勇. 几丁质降血糖作用的实验研究. 武汉市职工医学院学报 2000; 28: 21-22
- 26 乔新惠, 宋岚, 李邦良, 周弟先, 刘四春. 甲壳低聚糖对非肥胖性糖尿病小鼠胰岛细胞生长及胰岛素分泌量的影响. 医学临床研究 2003; 20: 259-263
- 27 蒋国彦. 糖尿病学. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 1-2
- 28 李晓卉. 肠道有益菌对低聚糖的利用及应用效果. 动物科学与动物医学 2001; 19: 48-50
- 29 赵玉清, 部金凤, 海华, 权春善, 边海涛, 安晓雯. 壳聚糖复合物的抑菌性作用. 中国生物工程杂志 2005; 25: 67-70
- 30 马淑霞, 杨景云, 施忠凯, 李丽秋, 李俭, 刘君星, 形德刚, 吕密凯. 黄芪复方制剂对实验性糖尿病大鼠及肠道菌群的影响. 中国微生态学杂志 2000; 12: 69-70

## ■同行评价

本文通过动物模型研究壳寡糖和N-乙酰氨基单糖对糖尿病大鼠的糖耐量作用及肠道微生态平衡的影响, 取题新颖, 实验设计合理, 内容充分, 实验结果对临床有一定的指导意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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\临床科学\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].

# TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的诱导作用

王峻, 郭德玉

## ■背景资料

尽管TNF- $\alpha$ 被认为能够导致肿瘤发生溶血性坏死, 然而更多的证据却显示TNF- $\alpha$ 在促进肿瘤发生、发展的过程中起到重要作用。另有研究显示, 基质金属蛋白酶家族中部分成员与多种恶性肿瘤的侵袭性和转移性增强有关。

王峻, 郭德玉, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院病理科 重庆市 400038  
王峻, 2003级在读硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究。

通讯作者: 郭德玉, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院病理科. gdy007@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68765455

收稿日期: 2007-01-09 接受日期: 2007-01-27

## Induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in gastric cancer cells by tumor necrosis factor- $\alpha$

Jun Wang, De-Yu Guo

Jun Wang, De-Yu Guo, Department of Pathology, Southwest Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: De-Yu Guo, Department of Pathology, Southwest Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. gdy007@mail.tmmu.com.cn

Received: 2007-01-09 Accepted: 2007-01-27

## Abstract

**AIM:** To investigate the inductive effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gastric cancer cells.

**METHODS:** Gastric cancer cells were stimulated by exogenous TNF- $\alpha$  and the cells without stimulation served as controls. The contents of MMP-2 and MMP-9 in the supernatant fluid of gastric cancer cells were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blot was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 protein in gastric cancer cells.

**RESULTS:** Following stimulation with 1, 10 and 100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ , the contents of MMP-2 ( $8.24 \pm 1.36$ ,  $23.65 \pm 3.45$ ,  $14.83 \pm 2.54$  ng/L) and MMP-9

( $12.47 \pm 2.66$ ,  $34.12 \pm 6.78$ ,  $23.31 \pm 4.45$  ng/L) in the supernatant fluid of gastric cancer cells were increased significantly as compared with those in the control group (MMP-2:  $1.56 \pm 0.23$  ng/L;  $5.25 \pm 0.89$  ng/L; all  $P < 0.01$ ). After 16 hours of stimulation with TNF- $\alpha$ , the contents of MMP-2 and MMP-9 in the supernatant fluid reached the peak values, which were  $23.65 \pm 3.45$  and  $34.12 \pm 6.78$  ng/L, respectively. MMP-2 and MMP-9 expression were up-regulated both at mRNA and protein level.

**CONCLUSION:** TNF- $\alpha$  can up-regulate the expression of MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer cells.

**Key Words:** Gastric cancer; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9; Enzyme-linked immunosorbent assay; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Wang J, Guo DY. Induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in gastric cancer cells by tumor necrosis factor- $\alpha$ . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1208-1212

## 摘要

**目的:** 探讨肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )对胃癌细胞基质金属蛋白酶2(MMP-2)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达的诱导作用。

**方法:** 以外源性TNF- $\alpha$ 作用于胃癌细胞。未经TNF- $\alpha$ 作用的胃癌细胞作为对照。采用ELISA法检测胃癌细胞培养上清液中MMP-2和MMP-9蛋白的含量。采用RT-PCR检测胃癌细胞MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA的表达状况。采用Western blot检测胃癌细胞内MMP-2蛋白和MMP-9蛋白含量。

**结果:** 不同浓度(1, 10和100  $\mu$ g/L)的TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞后, 胃癌细胞上清液中MMP-2的含量分别为 $8.24 \pm 1.36$ ,  $23.65 \pm 3.45$ 和 $14.83 \pm 2.54$  ng/L, 均显著高于对照组( $1.56 \pm 0.23$  ng/L,  $P < 0.01$ ); MMP-9的含量分别为 $12.47 \pm 2.66$ ,  $34.12 \pm 6.78$ 和 $23.31 \pm 4.45$  ng/L, 亦均明显高

于对照组( $5.25 \pm 0.89$  ng/L,  $P < 0.01$ ), 其中以10  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ 作用时升高最为显著. TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞16 h后, 上清液中MMP-2和MMP-9含量达到峰值, 分别为 $23.65 \pm 3.45$ 和 $34.12 \pm 6.78$  ng/L. 胃癌细胞MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA表达明显增强, 胃癌细胞内MMP-2和MMP-9蛋白表达亦明显增多.

**结论:** TNF- $\alpha$ 可上调胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达.

**关键词:** 胃癌; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 基质金属蛋白酶2; 基质金属蛋白酶9; 酶链免疫吸附试验; 逆转录-聚合酶链反应; 蛋白印迹

王峻, 郭德玉. TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的诱导作用. 世界华人消化杂志. 2007;15(11):1208-1212  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1208.asp>

## 0 引言

胃癌作为人类最常见的肿瘤之一, 常于诊断前侵入肌层并发生转移<sup>[1]</sup>, 因此患者的5 a生存率较低, 具有较高的死亡率. 基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员中的MMP-9和MMP-2能有效的分解基底膜的主要成分IV型胶原蛋白, 两者的过度表达常引起胃癌的转移侵袭能力增强<sup>[2-3]</sup>. 众多的研究显示, TNF- $\alpha$ 参与了部分胃癌的发生、发展过程<sup>[4-5]</sup>, 与胃癌的侵袭转移能力具有相关性. 我们采用外源性TNF- $\alpha$ 刺激胃癌细胞, 同时对MMP-2和MMP-9表达情况进行检测, 分析TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的影响, 以探讨TNF- $\alpha$ 在胃癌进展过程中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人类胃癌细胞系SGC-7901由中国医科大学肿瘤研究所惠赠. 细胞培养于RPMI1640培养基中, 其中含有100 mL/L胎牛血清, 青霉素(100 IU/mL)及链霉素(100 mg/L). TNF- $\alpha$ 购买于美国Sigma公司. MMP-2和MMP-9 ELISA试剂盒购自英国Biotrak Amersham公司. RNA PCR3.0试剂盒及TRIzol试剂均购自于TaKaRa公司. 所有检测均重复4次.

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA提取** 采用TRIzol法, 具体方法按其说明进行.

**1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)** 取1  $\mu$ g SFRP1 RNA, 采用随机9引物法和AMV逆转录酶合成cDNA. 循环条件为: 30 $^{\circ}$ C, 10 min; 42 $^{\circ}$ C,

表 1 不同浓度TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9含量的影响(mean  $\pm$  SD, ng/L)

TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	MMP-2	MMP-9
0(对照)	$1.56 \pm 0.23$	$5.25 \pm 0.89$
1	$8.24 \pm 1.36^b$	$12.47 \pm 2.66^b$
10	$23.65 \pm 3.45^b$	$34.12 \pm 6.78^b$
100	$14.83 \pm 2.54^b$	$23.31 \pm 4.45^b$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

25 min; 99 $^{\circ}$ C, 5 min; 5 $^{\circ}$ C, 5 min, 共1个循环. MMP-2的PCR引物序列分别为: 上游5'-GTGCCAAGGTGGAAATCAGAG-3'; 下游5'-AAGGTTGAAGGAAACGAGCGA-3'. 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min, 1个循环. 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 共30个循环. MMP-9的PCR引物序列分别为上游5'-GTCTTCCCCTTCGTCTTCCT-3', 下游5'-ACCCCACTTCTTGTCAGCGT-3'. 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min, 1个循环. 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 共30个循环.

**1.2.3 ELISA测定培养胃癌细胞上清中MMP-2和MMP-9蛋白的含量** 具体操作按其说明书进行.

**1.2.4 蛋白印迹(Western blot)** 取蛋白20  $\mu$ g, 100 g/L SDS-PAGE凝胶电泳, 常规转膜, 加抗MMP-2, MMP-9的多克隆抗体(1:1000), 4 $^{\circ}$ C过夜后, 加辣根过氧化物酶标记兔抗羊II抗(1:1000). 放射自显影后凝胶成像分析系统分析.

**统计学处理** 用SPSS11.0统计软件进行方差分析和 $t$ 检验.

## 2 结果

**2.1 不同浓度TNF- $\alpha$ 作用下胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9含量变化** 分别采用1, 10和100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞, 未经TNF- $\alpha$ 作用的细胞作为对照. 16 h后, 采用ELISA法检测胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9的含量. 结果显示, 在不同浓度的TNF- $\alpha$ 作用下, 胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9含量均显著增加( $P < 0.01$ ), 其中以10  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞时, MMP-2和MMP-9增加最为显著(表1).

**2.2 TNF- $\alpha$ 作用下不同时间胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9含量变化** 以10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞, 在1, 4, 16和24 h后分别收集上清. 采用ELISA法对上清液中MMP-2和MMP-9含量进行检测. 结果显示, TNF- $\alpha$ 作用后, 随着时间的推移, MMP-2和MMP-9的含量增加显著

### ■创新盘点

本文首次分析了TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的影响. 结果发现, TNF- $\alpha$ 能够上调MMP-2和MMP-9表达, 提示TNF- $\alpha$ 在胃癌发生、发展过程中具有重要作用.



### ■同行评价

本文研究了TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的诱导作用,方法尚可,结论可信,有一定实际价值。

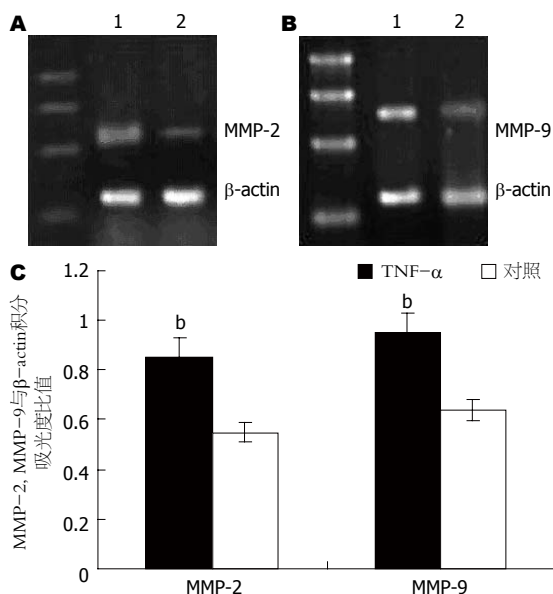


图1 TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA表达的影响. A: TNF- $\alpha$ 对MMP-2 mRNA表达的影响; B: TNF- $\alpha$ 对MMP-9 mRNA表达的影响; C: MMP-2, MMP-9与 $\beta$ -actin积分吸光度比值; 1: TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞; 2: 对照胃癌细胞; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

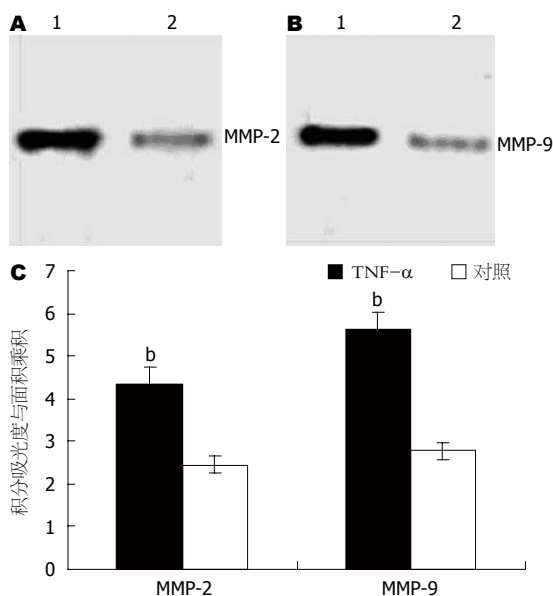


图2 TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2蛋白和MMP-9蛋白表达的影响. A: TNF- $\alpha$ 对MMP-2蛋白表达的影响; B: TNF- $\alpha$ 对MMP-9蛋白表达的影响; C: MMP-2和MMP-9积分吸光度与条带面积乘积; 1: TNF- $\alpha$ 作用胃癌细胞; 2: 对照胃癌细胞; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

( $P < 0.01$ ), 而峰值出现在16 h后.

**2.3 TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA表达的影响** 采用浓度为10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用于胃癌细胞, 于16 h后收集细胞并采用RT-PCR对MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA表达进行检测. 同时, 对未经TNF- $\alpha$ 作用的胃癌细胞

表2 不同时间胃癌细胞上清液中MMP-2和MMP-9含量的变化(mean  $\pm$  SD, ng/L)

时间(h)	MMP-2	MMP-9
1	2.21 $\pm$ 0.46	3.76 $\pm$ 0.88
4	11.33 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>	18.55 $\pm$ 3.26 <sup>b</sup>
16	23.65 $\pm$ 3.45 <sup>b</sup>	34.12 $\pm$ 6.78 <sup>b</sup>
24	14.44 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	20.57 $\pm$ 4.46 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 1 h组.

MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA进行检测, 以作为对照. 运用凝胶成像分析系统进行半定量分析, 以MMP-2, MMP-9与 $\beta$ -actin的条带积分吸光度比值表示MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA的表达水平. 结果显示, 经TNF- $\alpha$ 作用后, 胃癌细胞MMP-2 mRNA和MMP-9 mRNA表达均明显增强(图1).

**2.4 TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响** 采用浓度为10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用于胃癌细胞, 于16 h后收集细胞并采用Western blot对MMP-2蛋白和MMP-9蛋白表达进行检测. 同时, 对未经TNF- $\alpha$ 作用的胃癌细胞MMP-2蛋白和MMP-9蛋白进行检测, 以作为对照. 凝胶成像分析系统对条带进行积分吸光度分析. 用积分吸光度与条带面积的乘积对蛋白表达进行半定量分析. 结果显示, 经TNF- $\alpha$ 作用后, 胃癌细胞MMP-2蛋白和MMP-9蛋白表达均明显增强(图2).

### 3 讨论

目前, 越来越多的证据显示炎症反应是肿瘤发生过程中的一个重要因素<sup>[6-7]</sup>. 作为I类致癌原, 幽门螺杆菌感染导致的慢性炎症则被认为是胃癌发病的重要原因之一. 幽门螺杆菌常诱导胃内黏膜TNF- $\alpha$ 表达增多<sup>[8-10]</sup>, 后者可有效抑制胃酸的分泌<sup>[11]</sup>, 进一步促进幽门螺杆菌生长, 导致炎症的发生. 尽管TNF- $\alpha$ 被认为能够导致肿瘤发生溶血性坏死, 然而更多的证据却显示, TNF- $\alpha$ 在促进肿瘤发生、发展的过程中起到重要作用. 例如, 在动物实验中, 肿瘤诱导剂TPA等可诱导多个器官出现TNF- $\alpha$ 基因表达增加<sup>[12]</sup>. TNF- $\alpha$ 本身也是一个肿瘤诱导剂, 他能诱导BALB/3T3细胞出现恶性转化<sup>[13]</sup>. 此外亦有实验证明, TNF- $\alpha$ 缺乏小鼠可抵抗TPA等诱导的小鼠皮肤肿瘤出现<sup>[14]</sup>. 这些证据均表明, TNF- $\alpha$ 是促进胃癌发生、发展的一个重要的细胞因子.

作为一种常见的恶性肿瘤,胃癌致死率在癌症中占第2位。其较高的致死率常与其较早发生侵袭转移有关。研究显示,基质金属蛋白酶家族中部分成员与多种恶性肿瘤的侵袭性和转移性增强有关<sup>[15-23]</sup>。金属基质蛋白酶能够降解基底膜和细胞外基质中的主要成分胶原,从而使肿瘤细胞可以浸润到周围组织并向远处转移。因此胃癌常于诊断前侵入肌层并发生转移,患者的5 a生存率较低,具有较高的死亡率。有证据显示, TNF- $\alpha$ 可诱导多种细胞表达MMPs, 参与了多种疾病的发病过程。例如, TNF- $\alpha$ 能诱导肺上皮细胞<sup>[24]</sup> MMP-9表达, 参与了肺结核的发病过程。周围神经损伤, TNF- $\alpha$ 亦可调节施旺细胞表达MMP-9。TNF- $\alpha$ 也可促进支气管平滑肌细胞和小肠上皮细胞<sup>[25]</sup>表达MMP-9。肺上皮细胞、血管内皮细胞<sup>[26]</sup>及成纤维细胞<sup>[27-28]</sup>在TNF- $\alpha$ 作用下MMP-2表达亦增加。有证据显示, TNF- $\alpha$ 对MMPs的诱导作用主要是通过MAPK信号系统介导的NF- $\kappa$ B激活, 例如TNF- $\alpha$ 即可通过该通路上调血管平滑肌细胞MMP-9的表达<sup>[29-30]</sup>。

本实验结果显示, TNF- $\alpha$ 可上调胃癌上皮细胞MMP-2和MMP-9的表达, 且在10  $\mu$ g/L时MMP-2和MMP-9表达达到峰值。实验结果亦显示, 在TNF- $\alpha$ 作用后16 h左右, MMP-2和MMP-9表达最多。由于在胃癌患者中, TNF- $\alpha$ 高表达常引起肿瘤早期出现侵袭和转移, 其机制亦可能与MMPs表达上调有关。我们实验的结果进一步证实, TNF- $\alpha$ 参与了胃癌的进展过程。关于TNF- $\alpha$ 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9的诱导作用的具体机制则有待于进一步研究。

#### 4 参考文献

- Correa P. Is gastric cancer preventable? *Gut* 2004; 53: 1217-1219
- Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2941-2944
- Dicken BJ, Graham K, Hamilton SM, Andrews S, Lai R, Listgarten J, Jhangri GS, Saunders LD, Damaraju S, Cass C. Lymphovascular invasion is associated with poor survival in gastric cancer: an application of gene-expression and tissue array techniques. *Ann Surg* 2006; 243: 64-73
- Macri A, Versaci A, Loddo S, Scuderi G, Travagliante M, Trimarchi G, Teti D, Famulari C. Serum levels of interleukin 1beta, interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha as markers of gastric cancer. *Biomarkers* 2006; 11: 184-193
- Fei BY, Xia B, Deng CS, Xia XQ, Xie M, Crusius JB, Pena AS. Association of tumor necrosis factor genetic polymorphism with chronic atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma in Chinese Han population. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1256-1261
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7: 211-217
- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995; 73: 760-770
- Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991; 32: 1473-1477
- Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, Yamaoka Y. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2002; 123: 1793-1803
- Beales IL, Calam J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998; 42: 227-234
- Fujiki H, Suganuma M. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res* 1993; 61: 143-194
- Komori A, Yatsunami J, Suganuma M, Okabe S, Abe S, Sakai A, Sasaki K, Fujiki H. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res* 1993; 53: 1982-1985
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 1999; 5: 828-831
- Kim SH, Choi HY, Lee J, Son DS, Lee HS, Song IS, Lim YS, Hong YS, Kim J, Choi YS. Elevated activities of MMP-2 in the non-tumorous lung tissues of curatively resected stage I NSCLC patients are associated with tumor recurrence and a poor survival. *J Surg Oncol* 2007; 95: 337-346
- Hu XX, Li L, Li DR, Zhang W, Tang BJ. Inhibitory effects of antisense MMP-9 oligodeoxynucleotides on invasiveness and adherence of ovarian. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 662-665
- Kang HG, Kim HS, Kim KJ, Oh JH, Lee MR, Seol SM, Han I. RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. *J Orthop Res* 2007; 25: 696-702
- Ip YC, Cheung ST, Fan ST. Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2007; 46: 225-230
- Ko HM, Kang JH, Jung B, Kim HA, Park SJ, Kim KJ, Kang YR, Lee HK, Im SY. Critical role for matrix metalloproteinase-9 in platelet-activating factor-induced experimental tumor metastasis. *Int J Cancer* 2007; 120: 1277-1283
- Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular

- carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007; 120: 1208-1214
- 21 Zhang Y, Wang C, Mizukami H, Itoh H, Kusama M, Ozawa K, Jinbu Y. Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 417-423
- 22 Sahin A, Kiratli H, Tezel GG, Soylemezoglu F, Bilgic S. Expression of vascular endothelial growth factor a, matrix metalloproteinase 9 and extravascular matrix patterns in iris and ciliary body melanomas. *Ophthalmic Res* 2007; 39: 40-44
- 23 Petrella BL, Brinckerhoff CE. Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Cancer* 2006; 5: 66
- 24 Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* 2006; 61: 259-266
- 25 Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Diaz-Gonzalez F, Farre E, Salas A, Radomski MW, Quintero E. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6464-6472
- 26 Lin R, Liu JT, Gan WJ, Wang WR, Han CJ, Liu Y, Fang ZY. Fenofibrate inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of CD40 and matrix metalloproteinase in human vascular endothelial cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 1383-1387
- 27 Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod* 2006; 32: 853-861
- 28 Braundmeier AG, Nowak RA. Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56: 201-214
- 29 Lee SO, Jeong YJ, Yu MH, Lee JW, Hwangbo MH, Kim CH, Lee IS. Wogonin suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 expression by blocking the NF-kappaB activation via MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 118-125
- 30 Suh SJ, Jin UH, Kim SH, Chang HW, Son JK, Lee SH, Son KH, Kim CH. Ochnaflavone inhibits TNF-alpha-induced human VSMC proliferation via regulation of cell cycle, ERK1/2, and MMP-9. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1298-1307

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

**本刊讯** 为推动期刊出版事业的繁荣和发展,中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作.此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊,其中,社科期刊110种、科技期刊86种.评估结果如下:一级(优秀)期刊共88种,其中社科期刊42种,科技期刊46种,包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志;二级期刊共103种,其中社科期刊64种,科技期刊39种;三级期刊共5种,其中社科期刊4种,科技期刊1种.(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅 2007-01-30)

## 软脉灵对大鼠非酒精性脂肪肝的预防作用

卢明芳, 王雯

卢明芳, 第一军医大学福州临床医学院, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科 福建省福州市 350025  
王雯, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科 福建省福州市 350025

卢明芳, 第一军医大学2007届硕士研究生, 主要从事脂肪肝的基础与临床研究。

通讯作者: 卢明芳, 350025, 福建省福州市西环北路156号, 南京军区福州总医院消化科. lumingfangdoc@163.com  
电话: 0591-24937074

收稿日期: 2007-03-04 接受日期: 2007-04-12

### Preventive effect of Ruanmailing on non-alcoholic fatty liver disease in rats

Ming-Fang Lu, Wen Wang

Ming-Fang Lu, Fuzhou Clinical Medical College of the First Military Medical University; Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Wen Wang, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Ming-Fang Lu, Fuzhou Clinical Medical College of the First Military Medical University; Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. lumingfangdoc@163.com  
Received: 2007-03-04 Accepted: 2007-04-12

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Ruanmailing in preventing nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.

**METHODS:** Rat models of NAFLD were established by high-fat diet. A total of 90 male Sprague Dawley rats were randomly divided into group A, B and C, fed with high-fat diet, high-fat diet plus Ruanmailing (ig), and normal basic food. Ten rats of each group were sacrificed at the 8<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> week, and meanwhile, the liver index, biochemical indicators in serum and liver tissues and the hepatic pathological changes were observed.

**RESULTS:** At the 16<sup>th</sup> week in group B, the liver index was decreased significantly in comparison with that in group A ( $F = 51.626$ ,  $P = 0.000$ ); the serum levels of cholesterol (CHOL),

triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were reduced markedly ( $2.27 \pm 0.38$  mmol/L vs  $3.09 \pm 0.45$  mmol/L;  $0.83 \pm 0.13$  mmol/L vs  $1.03 \pm 0.18$  mmol/L;  $0.41 \pm 0.06$  mmol/L vs  $1.09 \pm 0.27$  mmol/L;  $52.0 \pm 6.50$  U/L vs  $79.0 \pm 4.72$  U/L;  $182.9 \pm 26.43$  U/L vs  $326.5 \pm 28.21$  U/L; all  $P < 0.01$ ), while the level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was elevated ( $0.76 \pm 0.17$  mmol/L vs  $0.55 \pm 0.11$  mmol/L,  $P < 0.01$ ); the tissue content of malondialdehyde (MDA) was decreased evidently ( $167.2 \pm 14.00$  mmol/g vs  $263.6 \pm 26.84$  mmol/g,  $P < 0.01$ ), while the activity of superoxide dismutase (SOD) was enhanced notably ( $9.95 \pm 0.33$  U/g vs  $4.36 \pm 0.46$  U/g,  $P < 0.01$ ); the degree of fatty degeneration ( $\chi^2 = 19.828-20.470$ , all  $P = 0.000$ ) and inflammation ( $F = 10.170$ ,  $P = 0.000$ ) were relieved dramatically.

**CONCLUSION:** Ruanmailing is effective in preventing NAFLD in rats.

**Key Words:** Ruanmailing; Nonalcoholic fatty liver disease; Liver index; Pathological examination; Blood biochemistry; Antioxidants

Lu MF, Wang W. Preventive effect of Ruanmailing on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1213-1218

### 摘要

**目的:** 观察软脉灵对非酒精性脂肪性肝病大鼠模型的预防作用。

**方法:** 采用高脂膳食喂养方式建立大鼠非酒精性脂肪性肝病模型。♂SD大鼠90只, 随机分为模型组、药物组与空白对照组, 每组30只。模型组应用高脂饲料喂养, 药物组在高脂饲料喂养同时应用软脉灵灌胃, 空白对照组应用基础饲料喂养。每组均于8、12及16 wk时各处死10只, 观察肝脏指数, 血清与肝组织生化指标及肝组织病理改变。

**结果:** 16 wk时与模型组相比较, 药物组肝脏指数显著降低( $F = 51.626$ ,  $P = 0.000$ ); 血清胆

### ■背景资料

随着人群饮食结构改变及B超等检查的普及, 脂肪肝的发病率及检出率日益上升。其发病机制至今未完全明确。文献报道, 脂肪肝是肝纤维化及肝硬化的前期病变, 部分患者还可能进一步发展成为肝功能衰竭。因此, 防治脂肪肝对阻止慢性肝病的进展及改善预后具有重要意义。



## ■研发前沿

非酒精性脂肪肝至今尚无完全有效的药物治疗方法。一般选用保肝、抗氧化、增加胰岛素敏感性等药物,使肝酶正常化,降低肝内脂肪含量,改善肝脏组织学结构。其中,利用中药多靶点、多环节、多途径作用的特点,从现代医学发病机制出发、结合现代药理研究,有针对性的选用中药防治非酒精性脂肪肝是当前医学研究的一个热门课题。

固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、丙氨酸转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)水平明显降低( $2.27 \pm 0.38$  mmol/L vs  $3.09 \pm 0.45$  mmol/L;  $0.83 \pm 0.13$  mmol/L vs  $1.03 \pm 0.18$  mmol/L;  $0.41 \pm 0.06$  mmol/L vs  $1.09 \pm 0.27$  mmol/L;  $52.0 \pm 6.50$  U/L vs  $79.0 \pm 4.72$  U/L;  $182.9 \pm 26.43$  U/L vs  $326.5 \pm 28.21$  U/L; 均 $P < 0.01$ ),但血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)水平提高( $0.76 \pm 0.17$  mmol/L vs  $0.55 \pm 0.11$  mmol/L,  $P < 0.01$ );肝组织丙二醛(MDA)水平降低明显( $167.2 \pm 14.00$  mmol/g vs  $263.6 \pm 26.84$  mmol/g,  $P < 0.01$ ),超氧化物歧化酶(SOD)活力增加显著( $9.95 \pm 0.33$  U/g vs  $4.36 \pm 0.46$  U/g,  $P < 0.01$ ),肝组织脂肪变性程度( $\chi^2 = 19.828-20.470$ , 均 $P = 0.000$ )和炎症活动度( $F = 10.170$ ,  $P = 0.000$ )明显减轻。

**结论:** 软脉灵具有预防大鼠非酒精性脂肪性肝病的作用。

**关键词:** 软脉灵; 非酒精性脂肪性肝病; 肝脏指数; 病理学检查; 血液生化; 抗氧化剂

卢明芳, 王雯. 软脉灵对大鼠非酒精性脂肪肝的预防作用. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1213-1218  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1213.asp>

## 0 引言

脂肪肝(fatty liver)是常见肝病之一,随着人们饮食结构的改变以及B超等检查的普及,其发病率及检出率日益上升。肝脏脂肪变性可影响肝功能,使其代偿能力不足,对缺氧、中毒等耐受性降低。文献报告,本病是肝纤维化及肝硬化的前期病变,其肝纤维化发生率高达25%,约1.5%-8.0%的患者可进展为肝硬化,若其致病因子持续作用,部分患者还可能进一步发展成为肝功能衰竭<sup>[1-4]</sup>。因此,积极预防及治疗脂肪肝对阻止慢性肝病的进展及改善预后具有重要意义。流行病学研究显示,我国脂肪肝患者以非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)者居多<sup>[5-7]</sup>;高脂血症是NAFLD重要的致病因素之一<sup>[8-9]</sup>。NAFLD至今尚无完全有效的药物治疗方案,中外学者就此做了大量研究,其中中药验方及中成药治疗不乏效果良好者<sup>[10]</sup>。中成药软脉灵口服液具有滋补肝肾、益气活血、扩冠调脂功能,主要用于心脑血管疾病的治疗<sup>[11-12]</sup>,药理实验及临床观察发现该药对脂肪肝有一定干预作用。我们旨在通过观察其对高脂膳食复制的大鼠脂肪肝模型的影响,揭示其在NAFLD

预防中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF级♂SD大鼠90只,由中科院上海实验动物中心提供,鼠龄6-8 wk,体质量140-160 g。胆固醇购自武汉亚法生物技术有限公司;软脉灵为福建新大陆药业有限公司提供的3倍浓缩液;丙二醛、超氧化物歧化酶测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 方法** 90只大鼠随机分成3组,每组30只。模型组采用高脂饲料喂养;药物组高脂饲料喂养,同时予软脉灵灌胃;空白对照组采用基础饲料喂养;每组均于8, 12, 16 wk各处死10只。高脂饲料配方: 880 g/L基础饲料+100 g/L猪油+20 g/L胆固醇<sup>[13]</sup>。各组自由饮水进食。

软脉灵3倍浓缩液以蒸馏水稀释还原后使用。定期测定大鼠体质量,按体质量计算软脉灵给药量。如大鼠初始体质量147.7 g,计算软脉灵用量:软脉灵成人用量为10 mL,口服3次/d;mg/kg-mg/m<sup>2</sup>转换因子成人36.9,大鼠为5.8<sup>[14]</sup>;成人以60 kg计;则30 mL/60 kg $\times$ 36.9/5.8 = 3.1810 mL/kg, 3.1810 mL/kg $\times$ 0.1477 kg = 0.4698 mL,按0.5 mL/d灌胃。

术前隔夜禁食;称取体质量;麻醉后开胸穿刺心脏采血处死;迅速摘取肝脏并称得湿质量;观察肝脏大体标本;取肝右叶同部位组织1.0 g, 4℃研磨制备成100 g/L的肝组织匀浆;取肝右叶同部位组织1块, 40 g/L中性甲醛溶液固定。

**1.2.1 肝脏指数** 按以下公式计算:肝脏指数 = 肝湿质量/体质量 $\times$ 100%。

**1.2.2 生化指标检测** 血样经离心,取血清,使用全自动生化分析仪测定谷丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等指标。肝组织匀浆按试剂盒方法测定丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活力。

**1.2.3 病理学检查** 大体标本先行肉眼观察;肝组织石蜡切片行苏木精-伊红染色(HE染色)及苦味酸染色(VG染色);HE染色光镜下观察肝细胞脂肪变性程度及炎症活动度,前者按“脂滴细胞数所占面积/总细胞数所占面积”值0,  $\leq 1/3$ ,  $\leq 2/3$ 和 $> 2/3$ 分为(-)-(++)4级,达到++或以上者诊断为脂肪肝<sup>[13]</sup>,后者积分标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)和桥接坏死(BN)4级,依次计为1-4分,因为碎屑样坏死和

## ■创新盘点

中成药软脉灵口服液,主要用于心脑血管疾病的治疗,药理实验及临床观察中发现其对脂肪肝有一定干预作用。本实验通过研究其对高脂膳食复制的大鼠脂肪肝模型的影响,证实了该药有预防脂肪肝形成的作用。

桥接坏死严重度与预后直接相关, 计分公式为  $P+L+2PN+2BN^{[13]}$ . VG苦味酸染色光镜下观察肝脏纤维化程度.

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计学处理, 计量资料以均数±标准差表示, 多组间比较用单因向方差分析, 组间多重比较用LSD方法; 等级资料行非参数检验.

## 2 结果

实验期间对照组动物精神充沛, 灵活好动, 饮食正常, 皮毛整洁有光泽, 体质量持续小幅增长; 药物组大鼠一般情况也较好; 模型组大鼠身体肥胖, 体毛凌乱, 精神萎靡, 迟缓懒动; 喂食高脂饲料的大鼠生长均较空白对照组大鼠为快. 模型组大鼠在13 wk与15 wk各死亡1只, 解剖发现脂肪肝已形成, 具体死因未明. 其余大鼠进入结果分析.

**2.1 肝脏指数** 肝脏指数经单因向方差分析, 显示不同组间有差异(8 wk,  $F = 45.578$ ,  $P = 0.000$ ; 12 wk,  $F = 52.602$ ,  $P = 0.000$ ; 16 wk,  $F = 51.626$ ,  $P = 0.000$ ). 经用LSD方法对各组间进行多重比较, 结果显示药物组8 wk与模型组8 wk差异无显著性( $P>0.05$ ), 与空白对照组8 wk差异有显著性( $P<0.01$ ); 药物组12 wk与模型组12 wk及空白对照组12 wk差异均有显著性(均 $P<0.01$ ); 药物组16 wk与模型组16 wk及空白对照组16 wk差异均有显著性(均 $P<0.01$ )(表1).

### 2.2 生化指标

**2.2.1 血清生化指标** 药物组血清CHOL, TG, LDL-C, ALT及AST水平低于模型组( $P<0.01$ ), 其中CHOL, ALT, AST高于空白对照组( $P<0.01-0.05$ ); HDL-C水平提高( $P<0.01$  vs 模型组,  $P<0.05$  vs 空白对照组); 模型组CHOL, TG, LDL-C, ALT及AST水平高于空白对照组( $P<0.01$ ), HDL-C水平与空白对照组无差异(表2).

**2.2.2 肝组织抗氧化指标** 模型组大鼠肝组织MDA含量显著升高、SOD活力显著降低( $P<0.01$  vs 空白对照组); 药物组MDA水平显著低于模型组( $P<0.01$ ), 高于空白对照组( $P<0.01-0.05$ ); 药物组SOD活力属模型组与空白对照组之间( $P<0.01$  vs 模型组, 空白对照组)(表3).

**2.3 病理学结果** 肉眼观察, 对照组肝脏呈鲜红色, 边缘锐利, 表面光滑; 模型组大鼠随造模时间增加, 肝脏体积明显增大, 边缘变钝, 颜色转黄, 切面油腻; 药物组肝脏体积较空白对照组增大, 但油腻程度较模型组明显减轻. 光镜下, 对

表 1 大鼠肝脏指数

	<i>n</i>	肝脏指数		
		8 wk	12 wk	16 wk
模型组	10	3.28±0.12	3.40±0.04	3.54±0.14
药物组	10 <sup>e</sup>	3.30±0.12 <sup>d</sup>	3.26±0.18 <sup>bd</sup>	3.25±0.09 <sup>bd</sup>
对照组	10	2.89±0.08	2.91±0.05	2.92±0.15
<i>F</i> 值	—	45.578	52.602	51.626
<i>P</i> 值	—	0.000	0.000	0.000

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 空白对照组; <sup>e</sup> 药物组16 wk,  $n = 8$ .

照组大鼠肝组织形态学正常. HE染色光镜下, 模型组大鼠肝组织出现中-重度的脂肪变性, 肝细胞肿胀, 大小不均, 胞质内出现大小不一的脂滴, 病变以中央静脉周围最为明显; 脂肪变程度随造模时间延长而加重. 药物组肝组织轻度脂肪变性为主, 肝内脂肪滴少, 散在分布. 各组的脂肪变性程度, 经多个独立样本的非参数检验, 用Kruskal-Wallis H方法分析, 差异有显著性(8 wk:  $\chi^2 = 19.828$ ,  $P = 0.000$ ; 12 wk:  $\chi^2 = 20.470$ ,  $P = 0.000$ ; 16 wk:  $\chi^2 = 20.264$ ,  $P = 0.000$ )(表4).

模型组肝组织可见程度不等的汇管区炎症及小叶内炎症, 少数出现汇管区变性及点状坏死, 个别见坏死灶融合成小片状, 炎症细胞主要以单核细胞、淋巴细胞为主, 也有一些中性粒细胞, 炎症活动度随造模时间延长而加重; 药物组肝脏存在汇管区炎症及小叶内炎症, 未见肝细胞水样变性及坏死, 炎症细胞浸润较轻. 依据公式 $P+L+2PN+2BN$ 计算各组的炎症活动度积分, 行单向方差分析, 显示不同组间差异有显著性( $F = 10.170$ ,  $P = 0.000$ ). 经LSD方法行各组间多重比较, 模型组12 wk与空白对照组12 wk比较差异有显著性( $P<0.01$ ); 模型组16 wk与空白对照组16 wk比较差异有显著性( $P<0.01$ ); 药物组16 wk与模型组16 wk及空白对照组16 wk比较差异均有显著性( $P$ 均 $<0.01$ )(表5).

VG染色光镜下, 模型组16 wk有2只大鼠出现轻度肝细胞窦周纤维化, 余组大鼠未见肝组织纤维化(表5).

## 3 讨论

NAFLD是一个疾病谱, 病变由轻到重依次为脂肪肝变、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化和肝硬化4个不同的病理阶段. 其相关病因很多, 如营养不良、药物、代

### ■应用要点

软脉灵口服液是国家基本药物, 已进入临床使用, 原用于心脑血管疾病, 现可推荐应用于非酒精性脂肪肝的预防. 进一步行大规模、多中心试验研究后, 在脂肪肝防治中将较大应用前景.

## ■名词解释

“二次打击”学说：在非酒精性脂肪肝发病过程中，由肥胖、糖尿病、高脂血症、瘦素等因素，引起肝内游离脂肪酸增加，肝细胞脂肪变性，为“第一次打击”；病变继续，通过多种反应途径引起肝细胞氧化应激和脂质过氧化反应，导致肝细胞损伤、脂肪性肝炎、肝硬化等，为“第二次打击”。

表 2 大鼠血清生化指标

分组	n	CHOL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
模型组8 wk	10	2.37 ± 0.36 <sup>d</sup>	0.95 ± 0.20 <sup>d</sup>	0.62 ± 0.06	0.59 ± 0.06 <sup>d</sup>	58.6 ± 6.52 <sup>d</sup>	193.0 ± 21.59 <sup>d</sup>
药物组8 wk	10	1.73 ± 0.26 <sup>bd</sup>	0.85 ± 0.17 <sup>d</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>acd</sup>	52.4 ± 7.85 <sup>ad</sup>	158.1 ± 16.21 <sup>bd</sup>
对照组8 wk	10	1.08 ± 0.13	0.47 ± 0.07	0.56 ± 0.07	0.30 ± 0.06	41.4 ± 6.22	107.3 ± 15.70
模型组12 wk	10	2.52 ± 0.22	1.06 ± 0.10 <sup>d</sup>	0.62 ± 0.06	0.80 ± 0.08 <sup>d</sup>	63.5 ± 5.95 <sup>d</sup>	233.0 ± 19.24 <sup>d</sup>
药物组12 wk	10	2.11 ± 0.19 <sup>bd</sup>	0.81 ± 0.08 <sup>bd</sup>	0.76 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>bd</sup>	50.1 ± 4.73 <sup>bd</sup>	180.8 ± 13.39 <sup>bd</sup>
对照组12 wk	10	1.21 ± 0.10	0.53 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.32 ± 0.03	39.5 ± 3.34	116.7 ± 11.06
模型组16 wk	8	3.09 ± 0.45 <sup>d</sup>	1.03 ± 0.18 <sup>d</sup>	0.55 ± 0.11	1.09 ± 0.27 <sup>d</sup>	79.0 ± 4.72 <sup>d</sup>	326.5 ± 28.21 <sup>d</sup>
药物组16 wk	10	2.27 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.13 <sup>bc</sup>	0.76 ± 0.17 <sup>bc</sup>	0.41 ± 0.06 <sup>b</sup>	52.0 ± 6.50 <sup>bd</sup>	182.9 ± 26.43 <sup>bd</sup>
对照组16 wk	10	1.29 ± 0.28	0.68 ± 0.17	0.56 ± 0.12	0.37 ± 0.10	40.1 ± 6.42	121.5 ± 15.01

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 空白对照组。

表 3 大鼠肝组织抗氧化指标

	n	模型组		药物组		空白对照组	
		MDA (mmol/g)	SOD (U/g)	MDA (mmol/g)	SOD (U/g)	MDA (mmol/g)	SOD (U/g)
8 wk	10	204.4 ± 18.62 <sup>d</sup>	5.74 ± 0.23 <sup>d</sup>	178.7 ± 16.48 <sup>bd</sup>	8.28 ± 0.44 <sup>bd</sup>	150.4 ± 14.94	11.31 ± 0.55
12 wk	10	229.2 ± 19.21 <sup>d</sup>	5.18 ± 0.43 <sup>d</sup>	175.4 ± 16.38 <sup>bd</sup>	9.40 ± 0.52 <sup>bd</sup>	152.44 ± 13.93	10.87 ± 0.10
16 wk	10 <sup>e</sup>	263.6 ± 26.84 <sup>d</sup>	4.36 ± 0.46 <sup>d</sup>	167.2 ± 14.00 <sup>bc</sup>	9.95 ± 0.33 <sup>bd</sup>	148.0 ± 25.43	11.09 ± 0.41

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 空白对照组; <sup>e</sup>药物组16 wk, *n* = 8。

表 4 大鼠肝脏脂肪变性程度

分组	n	脂肪变性程度(只)				Mean rank
		-	+	++	+++	
模型组8 wk	10	0	4	5	1	24.05
药物组8 wk	10	5	4	1	0	14.45
对照组8 wk	10	10	0	0	0	8.00
模型组12 wk	10	0	2	5	3	22.45
药物组12 wk	10	1	4	4	1	18.05
对照组12 wk	10	10	0	0	0	6.00
模型组16 wk	8	0	1	2	5	21.63
药物组16 wk	10	0	3	5	2	17.60
对照组16 wk	10	9	1	0	0	5.70

谢和遗传等因素，临床上主要指与肥胖、糖尿病和高脂血症相关的因素<sup>[15]</sup>。发病机制复杂，涉及细胞内的生化代谢，具体环节尚不完全清楚，一般认为与脂肪代谢异常、激素影响、环境因素、遗传因素、氧应激及脂质过氧化损伤、免疫反应、肝筛改变等有关<sup>[16]</sup>。1998年Day *et al*<sup>[17]</sup>提出的“二次打击学说”，近年来已得到公认：第一次打击为各种原因导致的肝脏脂肪沉积，肝细胞变性；第二次打击为各种原因导致体内氧自由基增多，引起脂质过氧化；某些细胞因子

可直接损伤肝细胞，引起炎症坏死<sup>[3]</sup>。

高脂饮食使肝脏摄取游离脂肪酸增加，通过多种反应途径造成肝细胞的氧化应激和脂质过氧化反应<sup>[15-16]</sup>。例如，肝脏微粒体细胞色素P450(CYP)酶系统受到激活催化，CYP 2E1蛋白和mRNA增强表达，使自由基产生增多。自由基产生脂质过氧化物，其中最主要的是MDA，MDA可形成蛋白加合物，刺激机体产生抗体，介导免疫损伤<sup>[18-20]</sup>。SOD是广泛存在于需氧代谢细胞中的一种自由基清除剂，在自由基的产生与

表 5 大鼠肝组织炎症活动度

分组	n	肝组织炎症活动度(只)				计分 (mean ± SE)	纤维化(只)
		汇管区炎症(P)	小叶内炎症(I)	碎屑样坏死(PN)	桥接坏死(BN)		
模型组8 wk	10	10	2	0	0	1.40 ± 0.41	0
药物组8 wk	10	7	0	0	0	0.70 ± 0.30	0
对照组8 wk	10	0	0	0	0	0.00 ± 0.00	0
模型组12 wk	10	10	5	1	0	2.30 ± 0.39 <sup>d</sup>	0
药物组12 wk	10	9	2	0	0	1.30 ± 0.37	0
对照组12 wk	10	0	0	0	0	0.00 ± 0.00	0
模型组16 wk	8	8	8	3	1	6.25 ± 0.44 <sup>d</sup>	2
药物组16 wk	10	9	4	1	0	2.00 ± 0.35 <sup>bc</sup>	0
对照组16 wk	10	1	0	0	0	0.10 ± 0.04	0

<sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 空白对照组.

清除平衡中起着重要作用. 测定MDA、SOD水平常可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反映细胞受损的程度.

中成药软脉灵口服液, 主要成分为熟地黄、五味子、枸杞、怀牛膝、茯苓、制何首乌、白芍、柏子仁、远志、黄芪(炙)、陈皮、淫羊藿、当归、川芎、丹参及人参, 主治早期动脉硬化、冠心病、中风后遗症等. 药理实验证实该药能显著降低高脂膳食喂养的鹌鹑血中CHOL、TG水平, 升高HDL-C值, 具有较好的调血脂效果<sup>[12]</sup>, 实验过程中观察到, 药物对模型动物的脂肪肝形成有一定防治效果, 与临床观察相符. 因而, 本研究将之应用于预防大鼠非酒精性脂肪性肝病实验.

实验成功复制了高脂膳食造成大鼠脂肪性肝病的模型<sup>[12]</sup>, 大鼠脂肪肝程度随造模时间延长而加重. 在高脂膳食的同时, 应用软脉灵灌胃干预脂肪肝, 结果用药后肝脏指数及血中CHOL, TG, LDL-C水平下降, HDL-C水平升高, 肝功能、抗氧化能力改善; 说明软脉灵具有预防大鼠血脂增高, 减少肝脏对游离脂肪酸的吸收, 清除肝内甘油三酯作用; 有清除机体自由基, 增强抗氧化能力的作用, 可以调节和改善自由基代谢平衡, 保护肝细胞; 能降低肝细胞膜的通透性, 减少胞质中的ALT, AST溢入血中, 保持肝功能的正常; 病理检查进一步证实肝组织脂肪变性及炎症活动程度减轻. 本实验为软脉灵在预防脂肪肝的临床应用中提供了依据.

#### 4 参考文献

1 曾民德. 脂肪肝——肝病领域的新挑战. 中华肝脏病

- 杂志 2000; 8: 69
- Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2714-2724
- 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1038-1040
- Te Sligte K, Bourass I, Sels JP, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 10-21
- 范建高, 朱军, 李新建, 李锐, 戴菲, 宋晓敏, 陈兰, 李锋, 陈世耀. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 83-88
- 张国梁. 脂肪肝研究的思考. 安徽中医学院学报 2003; 22: 5-9
- 张华捷, 庄辉, 刘学恩. 脂肪肝的流行病学研究进展. 中华流行病学杂志 2004; 25: 630-632
- Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N, Tsuneyama K, Cheng C, Takano Y, Terasawa K, Shimada Y. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 971-980
- Yoneda M, Fujita K, Iwasaki T, Maeyama S, Terauchi Y, Nakajima A. Treatment of NASH: nutritional counseling and physical exercise. *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1139-1145
- 王凤珍, 杨钦河, 王强, 龚理. 中医药治疗脂肪肝临床研究进展. 安徽中医学院学报 2006; 25: 53-55
- 刘庆贺. 软脉灵的药理与临床应用. 首都医药 1998; 5: 51
- 谢振家, 顾洛, 刘拥国. 软脉灵口服液对实验性高脂血症鹌鹑动脉粥样硬化的影响. 中西医结合心脑血管病杂志 2007; 5: 32-33
- 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2002; 10: 392-396
- 施新猷. 医用实验动物学. 第1版. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 421
- 李继昌. 非酒精性脂肪肝病. 中国医刊 2006; 41: 7-8
- 张英霞, 李震坤. 脂肪肝的研究现状. 内蒙古医学杂志 2006; 38: 459-461
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two

#### ■同行评价

本文通过建立大鼠脂肪肝模型, 研究中成药软脉灵对大鼠实验性脂肪肝的预防作用, 目的明确, 方法科学, 结论可靠. 对中成药防治脂肪肝的研究提供了有力的实验证据, 对开发防治脂肪肝的中药具有理论和现实意义.



- "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 18 高鑫. 非酒精性脂肪性肝病与代谢综合征. 国际内分泌代谢杂志 2006; 26: 73-79
- 19 Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Fukui H, Morimoto H, Tamagawa Y. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: S61-66
- 20 Kolwankar D, Vuppalanchi R, Ethell B, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD, Chalasani N. Association between nonalcoholic hepatic steatosis and hepatic cytochrome P-450 3A activity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 388-393

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届 消化介入新技术研讨会会议及征文通知

**本刊讯** 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会是卫生部“十年百项”适宜技术推广、上海市重大医学成果转化及国家级继续医学教育项目, 为进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入诊治的技术水平, 我们联合上海同仁医院、山东省立医院和山东省医学影像研究所, 定于2007-09-21/25在山东省济南市举办第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会, 参会者可获得国家级一类继续医学教育学分12分. 会议将以专题讲座、论文交流、操作演示及研讨沙龙多种形式相结合, 安排相关学科的著名专家着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗的新理论、新技术和新方法.

### 1 征文内容

包括消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等. 消化系良性病变如门静脉高压、胆道结石、消化道出血等的内镜及介入新技术应用. 消化病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件.

### 2 征文要求

专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文, 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. 所有稿件一律要求电脑打印(WORD格式), 邮寄者需附光盘; 特别鼓励用E-mail投稿(用附件WORD格式). 截稿日期: 2007-07-31. 征集疑难病例: 会议将安排专门时间研讨疑难病例, 欢迎与会代表将临床中遇到的疑难病例带到会上讨论. 通信地址: 山东省立医院消化科张春清收, 济南市经五路纬七路324号, 邮编: 250021. 联系电话: 0531-85186350, 86701337; 传真: 0531-87902348; E-mail: zhchqing@medmail.com.cn.

# 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进

王倩, 管小琴

王倩, 管小琴, 重庆医科大学病理教研室 重庆市 400016  
王倩, 医学硕士, 主要从事肝胆病理研究。  
通讯作者: 管小琴, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学病理教研室. guanxiaogin2003@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2006-12-27 接受日期: 2007-01-20

## Improvement of induction method of non-alcoholic fatty liver model in rats

Qian Wang, Xiao-Qin Guan

Qian Wang, Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, 1 Yuzhong Road, Yuzhong District, Chongqing 400016, China. guanxiaogin2003@yahoo.com.cn

Received: 2006-12-27 Accepted: 2007-01-20

## Abstract

**AIM:** To establish a rapid rat model of non-alcoholic fatty liver.

**METHODS:** Twenty-four male Sprague Dawley rats were averagedly and randomly divide into group A, B and C, fed with normal diet, routine high-fat diet and routine high-fat diet plus sucrose, propylthiouracil, and sodium cholate, respectively. The general conditions and weight changes were dynamically observed for 5 weeks, and then all the rats were killed. The pathological changes of liver tissues were observed by HE staining, and Sudan IV staining and electron microscopy were used to investigate the presence status of cytoplasmic lipid droplets in liver cells. The following indexes were compared between the three groups, including serum levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD), and tissue contents of TG and TC.

**RESULTS:** Starting from the fourth week, the weights of rats were significantly decreased in group A and C as compared with those in group

B ( $249.63 \pm 34.25$ ,  $241.88 \pm 20.75$  vs  $275.38 \pm 6.59$ ,  $P < 0.05$ ), but there was no marked difference between group A and C ( $P > 0.05$ ). In the fifth week, light microscopy showed a great number of fatty vacuoles in liver cells, and electron microscopy confirmed the presence of abundant lipid droplets. Different degrees of hepatic fatty degeneration (+~++) was observed in group C ( $H = 13.36$ ,  $P = 0.0003$ ), but not in group A and B. The serum levels of TG, TC, ALT and MDA were markedly higher in group C than those in group A and B (TG:  $1.28 \pm 0.61$  mmol/L vs  $0.72 \pm 0.12$ ,  $0.76 \pm 0.04$  mmol/L; TC:  $12.78 \pm 1.47$  mmol/L vs  $1.71 \pm 0.03$ ,  $2.31 \pm 0.49$  mmol/L; ALT:  $1518.64 \pm 186.04$  nkat/L vs  $1181.57 \pm 37.84$ ,  $1262.92 \pm 159.20$  nkat/L; MDA:  $13.40 \pm 4.24$   $\mu$ mol/L vs  $5.89 \pm 1.05$ ,  $7.23 \pm 1.15$   $\mu$ mol/L; all  $P < 0.05$ ), but the activity of SOD was lower in group C ( $5.21 \pm 0.81$  nkat/mL vs  $11.91 \pm 2.69$ ,  $11.19 \pm 0.78$  nkat/mL,  $P < 0.05$ ). There were no notable differences between group A and B ( $P > 0.05$ ). The tissue contents of TG and TC were dramatically higher both in group B and C than those in group A (TG:  $2.14 \pm 0.26$ ,  $5.83 \pm 1.42$  mmol/L vs  $1.20 \pm 0.16$  mmol/L,  $P < 0.05$ ; TC:  $3.19 \pm 0.23$ ,  $9.63 \pm 1.12$  mmol/L vs  $2.13 \pm 0.16$  mmol/L,  $P < 0.05$ ), and there was also statistical difference between group B and C ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The rat model of non-alcoholic fatty liver can be successfully established within five weeks by the improved method, which needs less time and cost during the construction, and basically simulating the occurrence and progression of non-alcoholic fatty liver in human beings.

**Key Words:** Non-alcoholic fatty liver; Animal model; Propylthiouracil; Rat

Wang Q, Guan XQ. Improvement of induction method of non-alcoholic fatty liver model in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1219-1224

## 摘要

**目的:** 快速建立一种非酒精性脂肪肝大鼠模型。

## ■背景资料

近年来, 由于生活水平的提高, 饮食结构的变化, 我国由高脂血症、高血压、肥胖、糖尿病和药物损害等引起的非酒精性脂肪肝发病率呈上升趋势, 现已成为危害人类健康的三大肝病之一, 并与失代偿期肝硬化、肝功能衰竭、原发性肝癌的发生密切相关。非酒精性脂肪肝是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 与胰岛素抵抗及其相关的代谢综合征和遗传易感性有关。

## ■研究前沿

许多学者对利用实验动物复制非酒精性脂肪肝的模型进行了大量的研究,非酒精性脂肪肝大鼠模型现有的建模方法可分为两类,一类是利用转基因技术建模,另一类是利用药物和饮食诱导建模。选择一种建模时间短、实验成本低、符合人类自然发病规律的模型,能更有利于科学实验研究,因此寻求建立这种模型的方法是现在亟待研究的问题。

**方法:** 24只♂SD大鼠随机平均分为正常组、常规组和改良组,分别喂普通基础饲料、常规用高脂饲料及常规高脂饲料+蔗糖+丙基硫氧嘧啶+胆酸钠。5 wk内动态观察三组大鼠的一般情况、体质量变化,均5 wk处死,观察大鼠肝脏病理形态变化,苏丹IV染色和电镜检测了解大鼠肝细胞胞质内脂滴存在情况,并比较三组大鼠血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力及肝组织甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)含量的变化。

**结果:** 第4周开始正常组和改良组两组大鼠与常规组体质量之间有显著性差异( $249.63 \pm 34.25$ ,  $241.88 \pm 20.75$  vs  $275.38 \pm 6.59$ ,  $P < 0.05$ ),改良组与正常组之间体质量无显著性差异( $P > 0.05$ )。第5周在光镜下见改良组大鼠肝细胞内弥漫大量的脂肪空泡,电镜和苏丹IV染色证实肝细胞内有大量脂滴。肝脂肪变性程度为+~++++ ( $H = 13.36$ ,  $P = 0.0003$ ),正常组和常规组大鼠肝细胞内未见明显脂肪变性。改良组大鼠血清TG, TC, ALT水平和MDA含量均高于正常组和常规组(TG:  $1.28 \pm 0.61$  mmol/L vs  $0.72 \pm 0.12$ ,  $0.76 \pm 0.04$  mmol/L; TC:  $12.78 \pm 1.47$  mmol/L vs  $1.71 \pm 0.03$ ,  $2.31 \pm 0.49$  mmol/L; ALT:  $1518.64 \pm 186.04$  nkat/L vs  $1181.57 \pm 37.84$ ,  $1262.92 \pm 159.20$  nkat/L; MDA:  $13.40 \pm 4.24$   $\mu$ mol/L vs  $5.89 \pm 1.05$ ,  $7.23 \pm 1.15$   $\mu$ mol/L; 均 $P < 0.05$ ),常规组与正常组比无显著差异( $P > 0.05$ );而改良组血清SOD活力显著低于正常组和常规组( $5.21 \pm 0.81$  nkat/mL vs  $11.91 \pm 2.69$ ,  $11.19 \pm 0.78$  nkat/mL,  $P < 0.05$ )。肝组织TG, TC含量常规组和模型组均比正常组有增高(TG:  $2.14 \pm 0.26$ ,  $5.83 \pm 1.42$  mmol/L vs  $1.20 \pm 0.16$  mmol/L,  $P < 0.05$ ; TC:  $3.19 \pm 0.23$ ,  $9.63 \pm 1.12$  mmol/L vs  $2.13 \pm 0.16$  mmol/L,  $P < 0.05$ ),常规组与改良组也有显著差异( $P < 0.05$ )。

**结论:** 通过与利用常规高脂饲料建模的方法比较,该改良方法5 wk成功地构建了非酒精性脂肪肝大鼠模型,缩短了建模时间,降低了实验成本且模型基本符合人类发病的自然状态,是一种理想的建模方式。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 动物模型; 丙基硫氧嘧啶; 大鼠

王倩, 管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1219-1224

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1219.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪肝大鼠模型现有的建模方法可分为两类,一类是利用转基因技术建模,另一类是利用药物和饮食诱导建模<sup>[1]</sup>。目前,常用的建模方法还是选用超营养饮食方法,这类方法重复性强,较稳定且简单易行,但建模耗时较长,成本高。我们参考国内外建造动物脂肪肝模型的文献[2]及预实验的结果,对大鼠饲料配方进行了改进,采用在常规高脂饲料中加入蔗糖<sup>[3-4]</sup>、丙基硫氧嘧啶<sup>[5]</sup>和胆酸钠<sup>[6]</sup>的方法建立大鼠非酒精性脂肪肝模型,这种方法能缩短建模时间,降低实验成本,基本符合自然疾病发病规律,有利于进行科学实验研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 ♂ 7周龄SD大鼠共24只,体质量200-280 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要药物与试剂 胆固醇,广州天马精细化工厂生产(批号: 050531),猪胆酸钠,北京奥博星生物技术有限责任公司(批号: 20050428),丙硫氧嘧啶片,上海复星朝晖药业有限公司(生产批号: 050606),猪油、蔗糖购自重客隆超市。丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力测定试剂盒,南京建成生物工程研究所(批号分别为20051123和20051212),苏丹IV染色试剂盒,福州迈新生物技术有限公司(批号: 611088023)。

1.1.3 主要仪器 小磅秤,四川大竹衡器厂; RM 2135切片机,德国莱卡公司; 752紫外分光光度计,上海棱光技术有限公司; 康宁560全自动生化分析仪,美国康宁公司; Hitachi-7500透视电镜,日本日立公司。

### 1.2 方法

1.2.1 饲料的制备 (1)常规高脂饲料的制备: 胆固醇2%, 猪油10%, 基础饲料88%; (2)改良高脂饲料的制备: 胆固醇2%, 胆酸钠0.5%, 丙硫氧嘧啶0.2%, 蔗糖5%, 猪油10%, 基础饲料82.3%。

1.2.2 动物模型的制备 SD大鼠按完全随机分组原则分为3组(正常组、常规组和改良组),每组各8只。正常组用基础饲料喂养,常规组给予上述常规高脂饲料喂养,改良组给予改良高脂饲料喂养,自由取食,实验5 wk,处死3组全部大鼠,摘取眼球取血,并迅速取出肝脏,每份大鼠肝脏一部分放置-70℃低温冰箱保存备用,一部分用40 g/L甲醛固定以作病理组织检查用,一部分加生理盐水制成100 g/L的肝组织匀浆以作检测肝

表 1 3组大鼠的体质量变化情况(mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组	0 wk	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk
正常组	246.88 $\pm$ 34.12	247.38 $\pm$ 32.12	248 $\pm$ 32.70	249 $\pm$ 33.87	249.63 $\pm$ 34.25 <sup>a</sup>	249.38 $\pm$ 34.02 <sup>a</sup>
常规组	238.5 $\pm$ 6.39	248.5 $\pm$ 6.38	257.25 $\pm$ 6.58	264.38 $\pm$ 6.74 <sup>c</sup>	275.38 $\pm$ 6.59 <sup>ac</sup>	285.38 $\pm$ 6.68 <sup>ac</sup>
改良组	226.25 $\pm$ 21.34	236.75 $\pm$ 20.03	234.88 $\pm$ 23.12	230.75 $\pm$ 25.69 <sup>a</sup>	241.88 $\pm$ 20.75 <sup>a</sup>	243.63 $\pm$ 17.95 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 改良组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 常规组.

组织TG, TC含量用.

1.2.3 观察指标和测定方法 (1)一般情况. 实验期间每周称大鼠体质量1次, 并观察其毛色、食欲行动、粪便、对外界刺激的反应情况; (2)病理组织学检查. 肉眼观察大鼠肝脏大体变化, 并作病理切片HE染色, 光镜下观察大鼠肝脏脂肪变性情况, 其判断标准详见《非酒精性脂肪肝诊断标准》(2002-10中华肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组制定); 并做苏丹IV染色和电镜检查了解肝细胞内脂滴的存在情况; (3)血清生化指标. 测定各组大鼠血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA)含量和超氧化物化酶(SOD)活力. (4)肝组织甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)含量的测定.

**统计学处理** 用SPSS11.5统计学软件进行数据分析. 体质量的变化分析采用重复测定资料方差分析. 其他指标属多样本均数比较采用单因素方差分析(正态分布)和Kruskal-wallis秩和检验(非正态分布), 等级资料采用Kruskal-wallis秩和检验.

## 2 结果

实验过程中, 各组大鼠均无死亡, 皮毛光泽度好, 进食饮水尚可, 活动自如, 对外界刺激反应迅速.

2.1 大鼠体质量的变化 每周称3组大鼠体质量, 动态观察其体质量的改变情况(表1), 不同时间点的体质量间的差别具有统计学意义( $F = 62.84$ ,  $P < 0.0001$ ); 不同饲料喂养与时间之间有明显的交互作用( $F = 13.68$ ,  $P < 0.0001$ ), 说明3组大鼠体质量的变化趋势不同. 采用LST法进行多样本均数的两两比较, 结果表示前2 wk改良组、常规组和正常组大鼠体质量之间均无显著性差异( $P > 0.05$ ); 第4周开始常规组与正常组和改良组两组大鼠体质量之间均有显著性差异( $P < 0.05$ ), 改良组与正常组之间体质量无显著性差异( $P > 0.05$ ). 提示改良高脂饲料喂养大鼠在实验过程中体质量无明显的变化, 常规高脂饲料喂养

### ■创新盘点

在现有的利用药物和饮食诱导方式建立大鼠非酒精性脂肪肝模型的方法中, 利用常规的用高脂饲料建模的方法虽具简便, 重复性好的优点, 但却存在造模时间长, 病变轻, 成本较高的缺点. 对于已有的一些改良方法, 如用缺乏胆氨酸-胆碱的饲料喂养小鼠建模的方法、注射四氯化碳等药物诱导建模等, 虽然具有简便、快速的特点, 但从发病机制、病程演变过程、以及最终组织学形态改变来看都与人类脂肪肝的发生有较大差异. 本实验的建模方法用时短、死亡率低、成本率低, 建模过程基本符合人类自然发病情况, 较好的避免了其他改良方法的不足.

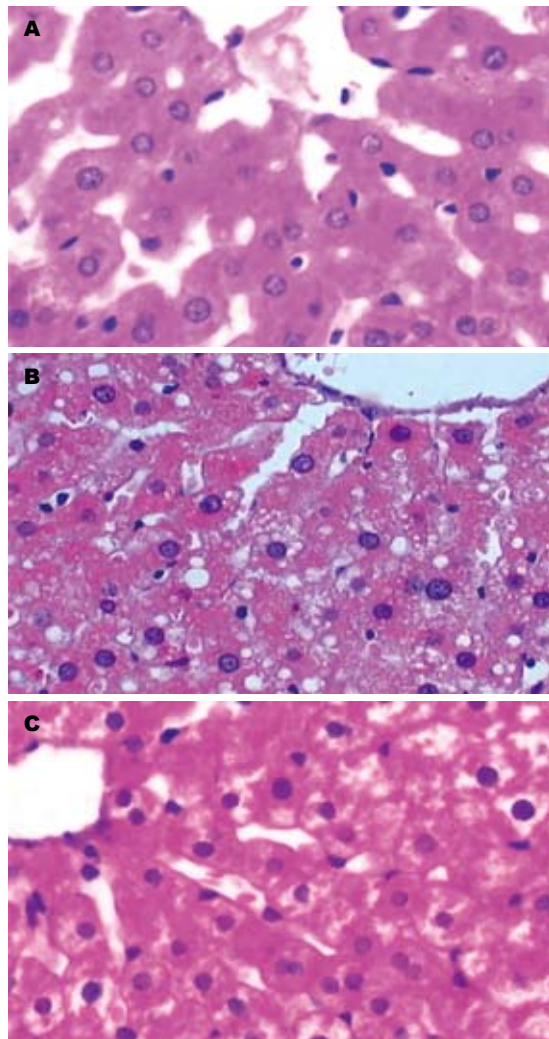


图 1 光镜下大鼠肝脏病理学变化(H&E  $\times 400$ ). A: 正常组; B: 改良组; C: 常规组.

大鼠从第4周开始体质量就有增加.

2.2 肝脏病理学变化 肉眼观察, 5 wk处死的正常组大鼠肝脏颜色呈暗红; 常规组大鼠肝脏颜色仍呈暗红. 体积稍增大; 改良组大鼠肝脏体积增大, 包膜稍紧张, 边缘圆钝, 呈奶黄色, 有油腻感; 光镜下, 正常组大鼠肝脏基本无异常情况, 常规组大鼠肝细胞以浊肿为主, 少量肝细胞可见空泡变性, 改良组均可见以肝腺泡III区为主的弥漫性肝细胞空泡变性, 未见炎症变、坏死灶及



## ■应用要点

本文改进了非酒精性脂肪肝的建模方法,其研究结果为我们深入研究脂肪肝的发病机制,筛选预防和治疗脂肪肝的有效药物,探讨药物的作用机制奠定了基础。

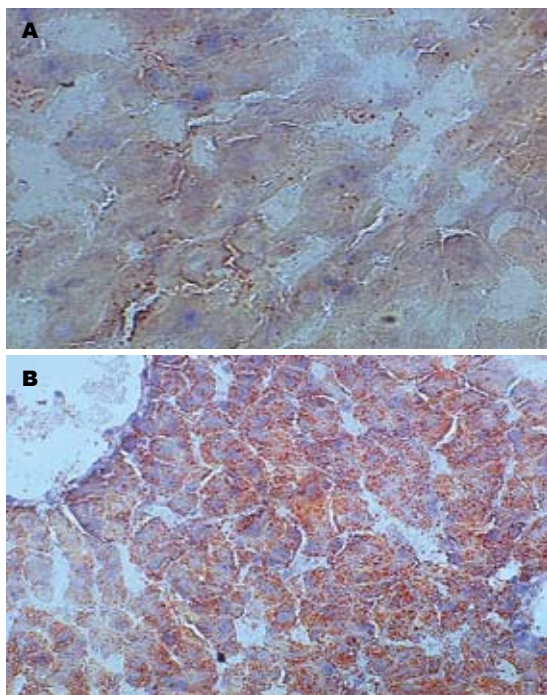


图2 大鼠肝脏苏丹IV染色( $\times 400$ )。A: 常规组; B: 改良组。

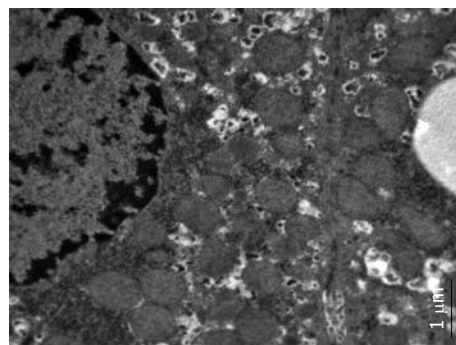


图3 改良组大鼠肝细胞(EM  $\times 15\,000$ )。

表2 2组大鼠肝脏脂肪变性程度表( $n = 8$ )

分组	-	+	++	+++
正常组	8	0	0	0
常规组	8	0	0	0
改良组 <sup>b</sup>	0	1	2	5

<sup>b</sup> $P = 0.0003$  vs 常规组、正常组。

表3 3组大鼠AST, ALT, TC, TG血清生物化学指标的变化(mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组	AST (nkat/L)	ALT (nkat/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
正常组	3364.67 $\pm$ 431.25	1181.57 $\pm$ 37.84	0.72 $\pm$ 0.12	1.71 $\pm$ 0.03
常规组	3201.31 $\pm$ 203.87	1262.92 $\pm$ 159.20	0.76 $\pm$ 0.04	2.31 $\pm$ 0.49
改良组	2407.31 $\pm$ 385.01 <sup>ac</sup>	1518.64 $\pm$ 186.04 <sup>ac</sup>	1.28 $\pm$ 0.61 <sup>ac</sup>	12.78 $\pm$ 1.47 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 常规组。

肝纤维化, 变性肝细胞体积较正常明显增加, 胞质内充满大量脂肪空泡(图1)。做苏丹IV染色见肝细胞内的脂滴染成桔红色, 电镜下发现肝细胞胞质内存在大小不等、电子密度中等的均质性无界膜的脂滴(图2-3)。根据《非酒精性脂肪肝诊断标准》对脂肪变性进行分级评价(表2), 可知改良高脂饲料喂养建模的方法比常规高脂饲料喂养建模的方法更快速有效( $H = 13.36$ ,  $P = 0.0003$ )。

**2.3 血清生化指标的变化** 常规组与正常组间血清生化指标无显著差异( $P > 0.05$ ); 与正常组和常规组比较, 改良组大鼠血清TG, TC和ALT水平均有明显升高( $P < 0.05$ , 表3)。

**2.4 血清SOD活力及MDA含量变化** 常规组与正常组比较血清SOD活力和MDA含量无显著性差异( $P > 0.05$ ); 改良组与正常组和常规组比, 血清SOD活力有明显降低, MDA含量有明显升高( $P < 0.05$ , 表4)。

表4 3组大鼠血清内SOD活力及MDA含量变化(mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组	SOD (nkat/mL)	MDA ( $\mu$ mol/L)
正常组	11.91 $\pm$ 2.69	5.89 $\pm$ 1.05
常规组	11.19 $\pm$ 0.78	7.23 $\pm$ 1.15
改良组	5.21 $\pm$ 0.81 <sup>ac</sup>	13.40 $\pm$ 4.24 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 常规组。

**2.5 大鼠肝组织TC, TG含量的测定** 常规组和改良组大鼠的TC, TG含量均比正常组有明显增高( $P < 0.05$ ); 常规组与改良组大鼠之间TC, TG含量有显著性差异( $P < 0.05$ , 表5)。

### 3 讨论

近年来, 我国由高脂血症<sup>[7]</sup>、高血压<sup>[8]</sup>、肥胖<sup>[9-10]</sup>、糖尿病<sup>[11]</sup>、药物损害<sup>[12]</sup>等引起的非酒精性脂肪肝的发病率呈上升趋势, 为深入研究脂肪肝的

发病机制, 筛选预防和治疗脂肪肝的有效药物, 探讨药物的作用机制, 选择一个符合人类自然发病规律的动物模型极为重要. 目前, 常规的用高脂饲料建立大鼠非酒精性脂肪肝模型的方法<sup>[13]</sup>虽然有简便, 重复性好的优点, 但也存在造模时间长, 病变轻, 实验成本较高的缺点. 现已有了一些改良方法, 如Zou *et al*<sup>[14]</sup>用高脂乳剂给♂SD大鼠灌胃, 6 wk后建模成功, 这种方法建模时间较短, 但每天灌胃较为繁琐且操作不当可引起动物窒息死亡. Leclercq *et al*<sup>[15]</sup>给♂Wistar大鼠高糖饲料2 d后肝细胞脂肪有变性, 但需先禁食, 不符合人类自然发病情况. Dela *et al*<sup>[16]</sup> Ota *et al*<sup>[17]</sup>, Uto *et al*<sup>[18]</sup>给予小鼠缺乏胆氨酸-胆碱的饲料喂养4 wk后出现脂肪变性, 8 wk肝组织内出现炎症改变, 12 wk后可出现肝纤维化, 这方法虽耗时不多, 但其不符合人类膳食情况, 且动物对胆碱缺乏的敏感性取决于胆碱氧化酶的含量, 但人类肝脏不含胆碱氧化酶, 故此类模型与人的自然发病情况大相径庭, 不宜用于发病机制的研究, 而仅能用于药物筛选<sup>[18]</sup>. Cheung *et al*<sup>[19]</sup>给予Wistar ♂大鼠皮下注射CCL<sub>4</sub>来建模, Natarajan *et al*<sup>[20]</sup>连续5 d给予大鼠腹腔内注射丙戊酸钠可出现肝细胞脂肪变性, 这两种方法虽具有简便、快速的优点, 但从发病机制, 病程演变过程, 及最终组织学形态改变来看都与人类脂肪肝有较大差异, 且动物易中毒死亡. Ikejima *et al*<sup>[21]</sup>, Fulop *et al*<sup>[22]</sup>, Rhee *et al*<sup>[23]</sup>采用fa/fa大鼠, ob/ob小鼠, 及BHE大鼠等特殊种系均可形成糖、脂肪代谢相关性的脂肪肝. 但这些特殊种系对品系有一定的要求, 且造模动物死亡较多, 代价较昂贵, 实用性有限.

本建模方法以HE染色、电镜、苏丹IV染色、血清生化指标、血清SOD和MDA、肝组织TG和TC含量检测作为大鼠建模成功的观测指标; 与常规建模方法相比, 该法成功建立大鼠非酒精性脂肪肝模型仅需5 wk. 建模期间大鼠体重质量无明显变化; 改良组肝组织和血清生化指标中TC, TG含量高于正常组和常规组; 改良组血清SOD活力比正常组和常规组有明显降低、MDA含量比正常组和常规组有明显增高. 本建模方法遵循了建立一个理想的动物模型的4条原则: (1)与人类疾病特征相似; (2)病变有一定发展过程; (3)形成率高, 死亡率低, 重复性好; (4)简便易行. 本法建模的机制是: 饲料中加入蔗糖, 可增加长链脂肪酸的合成而使TG的合成增加, 并且当血糖升高时, NADPH供应充分, 使乙酰辅

表 5 3组大鼠肝组织内TG及TC含量变化(mean ± SD, n = 8)

分组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
正常组	1.20 ± 0.16 <sup>c</sup>	2.13 ± 0.16 <sup>c</sup>
常规组	2.14 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.23 <sup>a</sup>
改良组	5.83 ± 1.42 <sup>ac</sup>	9.63 ± 1.12 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 正常组; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 常规组.

酶A转变成的胆固醇也增加<sup>[24-25]</sup>; 饲料中加入少量胆酸盐后, 可增加外源性胆固醇的吸收<sup>[26-27]</sup>; 加入甲状腺抑制药丙基硫氧嘧啶(该药物在安全剂量中使用, 不导致肝毒性)<sup>[28]</sup>, 可诱发高脂血症<sup>[29-31]</sup>, 其具体作用机制为: (1)抑制过氧化酶, 使摄入甲状腺内的碘不能变成活性碘; (2)抑制MIT和DIT缩合成T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>和抑制T<sub>4</sub>转变为T<sub>3</sub>. 而甲状腺素可促进胆固醇在肝转变为胆汁酸, 因此在加入丙基硫氧嘧啶后, 甲状腺素这一作用减弱, 从而使肝内胆固醇增加. 因此, 与常规高脂饲料比, 加入蔗糖、丙基硫氧嘧啶和胆酸盐后可加快建模进程, 使肝内胆固醇堆积形成脂肪肝. 本实验中, 改良组大鼠肝组织和血清生化指标中TC, TG含量均显著高于正常组, 并发现TC含量升高极为显著, 这一现象也许与改良饲料中加入丙基硫氧嘧啶、胆酸钠促进胆固醇的吸收有关.

用此种方法建立非酒精性单纯性脂肪肝大鼠模型, 用时短, 死亡率低, 成本低, 基本符合人类疾病自然发病情况, 避免了其他改良方法的不足, 值得推广.

#### 4 参考文献

- 1 Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1-16
- 2 Ai J, Wang N, Yang M, Du ZM, Zhang YC, Yang BF. Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3675-3679
- 3 Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39: 978-983
- 4 Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40: 434-441
- 5 Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Ragni M, Farina P, Baccari GC, Fallahi P, Antonelli A, Goglia F. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J* 2005; 19: 1552-1554

#### ■名词解释

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease): 是一种无过量饮酒史肝实质细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征. 疾病谱随病程的进展表现不一, 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化.

## ■同行评价

本文改进了大鼠非酒精性脂肪肝的造模方法,具有一定的创新及科研应用价值。

- 6 Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim YK, Park HY, Kwon OD, Kim TH, Jeong KS. Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 235-242
- 7 Ahmed MH, Saad RA, Osman MM. Ezetimibe: effective and safe treatment for dyslipidaemia associated with nonalcoholic fatty liver disease. Response to: Toth PP, Davidson MH: simvastatin and ezetimibe: combination therapy for the management of dyslipidaemia. *Expert Opin. Pharmacother.* (2005) 6(1):131-139. *Expert Opin Drug Saf* 2006; 5: 487-488
- 8 Brookes MJ, Cooper BT. Hypertension and fatty liver: guilty by association? *J Hum Hypertens* 2007; 21: 264-270
- 9 Benjaminov O, Beglaibter N, Gindy L, Spivak H, Singer P, Wienberg M, Stark A, Rubin M. The effect of a low-carbohydrate diet on the nonalcoholic fatty liver in morbidly obese patients before bariatric surgery. *Surg Endosc* 2007
- 10 Cavanilles Walker E, Solar Boga A, Garcia Alonso L, Lorenzo Patino MJ. Effectiveness of weight loss in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in an obese adolescent. *An Pediatr (Barc)* 2007; 66: 184-187
- 11 Yoneda M, Iwasaki T, Fujita K, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Maeyama S, Wada K, Saito S, Terauchi Y, Nakajima A. Hypoadiponectinemia plays a crucial role in the development of nonalcoholic Fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus independent of visceral adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: S15-21
- 12 Grieco A, Forgione A, Miele L, Vero V, Greco AV, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Fatty liver and drugs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 261-263
- 13 Fan JG, Xu ZJ, Wang GL. Effect of lactulose on establishment of a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5053-5056
- 14 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 15 Leclercq I, Horsmans Y, Desager JP, Delzenne N, Geubel AP. Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation. *J Hepatol* 1998; 28: 410-416
- 16 Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-1674
- 17 Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 282-293
- 18 Uto H, Nakanishi C, Ido A, Hasuiki S, Kusumoto K, Abe H, Numata M, Nagata K, Hayashi K, Tsubouchi H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Hepatol Res* 2005; 32: 235-242
- 19 Cheung PY, Zhang Q, Zhang YO, Bai GR, Lin MC, Chan B, Fong CC, Shi L, Shi YF, Chun J, Kung HF, Yang M. Effect of Weijia on carbon tetrachloride induced chronic liver injury. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1912-1917
- 20 Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1240-1249
- 21 Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 151-154
- 22 Fulop P, Derdak Z, Sheets A, Sabo E, Berthiaume EP, Resnick MB, Wands JR, Paragh G, Baffy G. Lack of UCP2 reduces Fas-mediated liver injury in ob/ob mice and reveals importance of cell-specific UCP2 expression. *Hepatology* 2006; 44: 592-601
- 23 Rhee YS, Burnham K, Stoecker BJ, Lucas E. Effects of chromium and copper depletion on lymphocyte reactivity to mitogens in diabetes-prone BHE/cdb rats. *Nutrition* 2004; 20: 274-279
- 24 Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 880-885
- 25 Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005; 87: 81-86
- 26 Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 42774-42784
- 27 Kokkona M, Kallinteri P, Fatouros D, Antimisariaris SG. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. *Eur J Pharm Sci* 2000; 9: 245-252
- 28 Rambaldi A, Glud C. Propylthiouracil for alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD002800
- 29 Varghese S, Shameena B, Sudhakaran PR, Oommen OV. Short-term effects of thyroid hormones on lipogenic enzymes and 14C-acetate incorporation into various lipid classes: *in vivo* and *in vitro* studies. *Indian J Exp Biol* 2001; 39: 431-435
- 30 Hapon MB, Varas SM, Jahn GA, Gimenez MS. Effects of hypothyroidism on mammary and liver lipid metabolism in virgin and late-pregnant rats. *J Lipid Res* 2005; 46: 1320-1330
- 31 Berti JA, Amaral ME, Boschero AC, Nunes VS, Harada LM, Castilho LN, Oliveira HC. Thyroid hormone increases plasma cholesteryl ester transfer protein activity and plasma high-density lipoprotein removal rate in transgenic mice. *Metabolism* 2001; 50: 530-536

电编 张敏 编辑 王晓瑜



# VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提, 新疆医科大学附属医院肝胆胰外科 新疆乌鲁木齐市 830011

李海军, 2005年浙江大学医学院医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事肝胆胰肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者: 庞作良, 830011, 新疆乌鲁木齐市北京南路30号, 新疆医科大学附属医院肝胆胰外科. lhjun3408@163.com

电话: 0991-7819111 传真: 0991-7819096

收稿日期: 2006-12-26 接受日期: 2007-01-27

## Effects of vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and kinase insert domain-containing receptor and vascular endothelial growth factor protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*

Hai-Jun Li, Zuo-Liang Pang, Mao-La-Ai-Sha Mai-Mai-Ti

Hai-Jun Li, Zuo-Liang Pang, Mao-La-Ai-Sha Mai-Mai-Ti, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Zuo-Liang Pang, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lhjun3408@163.com

Received: 2006-12-26 Accepted: 2007-01-27

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of oligofectamine-mediated vascular endothelial growth factor (VEGF) antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) transfection on the mRNA expression of VEGF, fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) and kinase insert domain-containing receptor (KDR) as well as VEGF protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*.

**METHODS:** Gallbladder carcinoma GBC-SD cells were transfected with VEGF ASODN and scrambled oligodeoxynucleotide (SODN) by Oli-

gofectamine mediation. The mRNA expression of VEGF, Flt-1 and KDR in GBC-SD cells of each group were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the excretion of VEGF protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** Semi-quantitative RT-PCR revealed that VEGF, Flt-1 and KDR mRNA expression in groups of ASODN (VEGF165:  $0.686 \pm 0.033$ ,  $0.569 \pm 0.049$ ,  $0.489 \pm 0.036$ ,  $0.716 \pm 0.017$ ; VEGF165:  $0.462 \pm 0.046$ ,  $0.338 \pm 0.034$ ,  $0.219 \pm 0.022$ ,  $0.471 \pm 0.038$ ; Flt-1:  $0.694 \pm 0.019$ ,  $0.562 \pm 0.045$ ,  $0.435 \pm 0.042$ ,  $0.724 \pm 0.026$ ; KDR:  $0.667 \pm 0.063$ ,  $0.490 \pm 0.033$ ,  $0.301 \pm 0.029$ ,  $0.665 \pm 0.068$ ) and ASODN + Oligofectamine (VEGF165:  $0.601 \pm 0.021$ ,  $0.465 \pm 0.042$ ,  $0.416 \pm 0.023$ ,  $0.662 \pm 0.035$ ; VEGF121:  $0.408 \pm 0.014$ ,  $0.286 \pm 0.019$ ,  $0.157 \pm 0.021$ ,  $0.418 \pm 0.037$ ; Flt-1:  $0.609 \pm 0.018$ ,  $0.442 \pm 0.049$ ,  $0.314 \pm 0.015$ ,  $0.614 \pm 0.029$ ; KDR:  $0.523 \pm 0.048$ ,  $0.432 \pm 0.027$ ,  $0.218 \pm 0.036$ ,  $0.524 \pm 0.037$ ) were significantly inhibited 24, 48, 72 and 96 hours after transfection in comparison with those in the control group ( $P < 0.05$ ), and the inhibitory effect of ASODN + Oligofectamine was stronger ( $P > 0.05$ ). ELISA results discovered that VEGF protein excretion was markedly decreased in the culture media of ASODN ( $281.26 \pm 18.62$ ,  $526.44 \pm 34.95$ ,  $791.13 \pm 20.99$ ) and ASODN + Oligofectamine ( $250.7 \pm 14.57$ ,  $506.09 \pm 19.14$ ,  $711.79 \pm 19.91$ ) group ( $P < 0.05$ ) as compared with that in the control group, and ASODN + Oligofectamine was more efficient ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** VEGF ASODN can inhibit VEGF, Flt-1 and KDR mRNA expression and VEGF protein excretion of GBC-SD cells, and the effect may be strengthened by Oligofectamine mediation.

**Key Words:** Gallbladder carcinoma cell line GBC-SD; Vascular endothelial growth factor; Fms-like tyrosine kinase-1; Kinase insert domain-containing receptor; Antisense oligodeoxynucleotide; Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain

### ■背景资料

胆囊癌恶性程度高, 预后差, 目前外科手术疗效不尽人意, 近年来抗血管形成疗法作为一种崭新的抗癌策略已成为研究的焦点, ASODN是目前迅速发展新型的基因治疗药物, 本文利用Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染人胆囊癌细胞, 探讨其对VEGF, Flt-1和KDR在mRNA和蛋白水平表达的影响, 为将来采用VEGF ASODN对胆囊癌进行基因治疗积累理论基础和实验依据。



reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Li HJ, Pang ZL, Mai-Mai-Ti MLAS. Effects of vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and kinase insert domain-containing receptor and vascular endothelial growth factor protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1225-1231

## 摘要

**目的:** 体外研究Oligofectamine介导的VEGF反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)转染对人胆囊癌GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响。

**方法:** 运用Oligofectamine介导的VEGF反义寡核苷酸(ASODN)和错义寡核苷酸(Scrambled Oligodeoxynucleotide, SODN)转染人胆囊癌细胞GBC-SD, 半定量RT-PCR检测转染后各组细胞不同时间的VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达变化, ELISA测定转染后各组细胞培养上清液VEGF蛋白浓度。

**结果:** 半定量RT-PCR发现ASODN组及ASODN+Oligofectamine组24, 48, 72, 96 h VEGF (ASODN组VEGF165:  $0.686 \pm 0.033$ ,  $0.569 \pm 0.049$ ,  $0.489 \pm 0.036$ ,  $0.716 \pm 0.017$ ; ASODN组VEGF121:  $0.462 \pm 0.046$ ,  $0.338 \pm 0.034$ ,  $0.219 \pm 0.022$ ,  $0.471 \pm 0.038$ ; ASODN+Oligofectamine组VEGF165:  $0.601 \pm 0.021$ ,  $0.465 \pm 0.042$ ,  $0.416 \pm 0.023$ ,  $0.662 \pm 0.035$ ; ASODN+Oligofectamine组VEGF121:  $0.408 \pm 0.014$ ,  $0.286 \pm 0.019$ ,  $0.157 \pm 0.021$ ,  $0.418 \pm 0.037$ )、Flt-1 (ASODN组:  $0.694 \pm 0.019$ ,  $0.562 \pm 0.045$ ,  $0.435 \pm 0.042$ ,  $0.724 \pm 0.026$ ; ASODN+Oligofectamine组:  $0.609 \pm 0.018$ ,  $0.442 \pm 0.049$ ,  $0.314 \pm 0.015$ ,  $0.614 \pm 0.029$ )及KDR (ASODN组:  $0.667 \pm 0.063$ ,  $0.490 \pm 0.033$ ,  $0.301 \pm 0.029$ ,  $0.665 \pm 0.068$ ; ASODN+Oligofectamine组:  $0.523 \pm 0.048$ ,  $0.432 \pm 0.027$ ,  $0.218 \pm 0.036$ ,  $0.524 \pm 0.037$ ) mRNA的表达显著低于Control组( $P < 0.05$ ), 且ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN强( $P > 0.05$ )。ELISA测定结果显示ASODN组( $281.26 \pm 18.62$ ,  $526.44 \pm 34.95$ ,  $791.13 \pm 20.99$ )及ASODN+Oligofectamine组( $250.7 \pm 14.57$ ,  $506.09 \pm 19.14$ ,  $711.79 \pm 19.91$ ) 24, 48, 72 h VEGF蛋白的分泌浓度均显著低于Control组( $394.23 \pm 16.26$ ,  $711.6 \pm 26.21$ ,  $933.85 \pm 28.65$ )( $P < 0.05$ ), 且

ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN强( $P > 0.05$ )。

**结论:** Oligofectamine介导的VEGF ASODN能抑制GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌。

**关键词:** 胆囊癌细胞GBC-SD; 血管内皮生长因子; fms样酪氨酸激酶1; 含激酶插入区受体; 反义寡核苷酸; 半定量RT-PCR; 酶链免疫吸附试验

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提. VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1225-1231

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1225.asp>

## 0 引言

VEGF是高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂因子, 在肿瘤的生长和转移中起重要作用. 抑制VEGF及其受体信号转导通路的任何一个环节, 就可防止肿瘤的进展与转移. ASODN有专一序列的寡聚脱氧核苷酸, 能特异阻断靶基因的复制、转录和翻译, 可在基因水平抑制VEGF的分泌, 已成功地运用于神经胶质瘤<sup>[1-2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>、胰腺癌<sup>[4]</sup>和胃癌<sup>[5]</sup>等多种肿瘤<sup>[6-9]</sup>. 本实验体外运用Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染人胆囊癌细胞GBC-SD, 通过RT-PCR和ELISA测定VEGF ASODN对GBC-SD细胞VEGF及其受体Flt-1和KDR在mRNA水平的表达, 并检测GBC-SD细胞VEGF蛋白分泌, 从分子水平考察VEGF ASODN抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长、促进凋亡的基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胆囊癌细胞株GBC-SD(中科院上海细胞生物学研究所), RPMI1640培养基, 2.5 g/L胰蛋白酶(含EDTA)(Gibco公司), Oligofectamine<sup>TM</sup> Reagent(20  $\mu$ mol/L) (Invitrogen公司), VEGF反义寡核苷酸、VEGF错义寡核苷酸, VEGF, Flt-1, KDR与 $\beta$ -actin引物(上海生工生物工程公司)。

**1.2 方法** 人胆囊癌GBC-SD细胞用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液(含青霉素和链霉素各100 mg/L), 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养. 待细胞长满瓶底70%-80%时采用2.5 g/L胰酶(含0.2 g/L EDTA)消化传代, 3-4 d传代1次, 传代后24-48 h处于指数生长期的细胞备实验用. 细胞经4 g/L台盼蓝染色, 拒染率>95%。

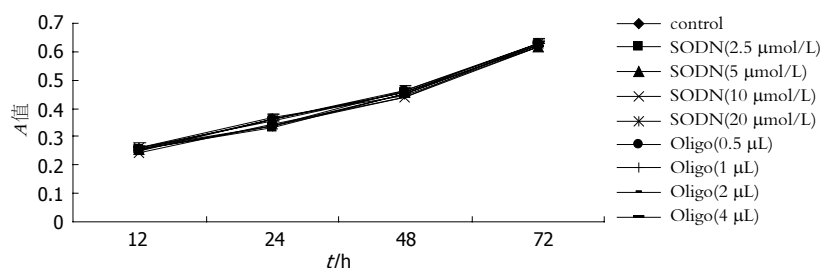


图 1 不同浓度SODN和Oligofectamine对GBC-SD细胞的影响.

## ■同行评价

本文研究了VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF、Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响,文章具有一定的科学性、创新性和可读性,能较好的反映我国肝胆病学临床和基础研究的先进水平.

表 1 引物序列及目的片段的长度

名称	方向	引物序列	目的片段的长度
VEGF	forward:	5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3'	403 bp (VEGF165)
	reverse:	5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3'	535 bp (VEGF121)
Flt-1	forward:	5'-CAAGTGGCCAGA GGCATGGAGTT-3'	498 bp
	reverse:	5'-GATGTAGTCTTTACCATCCTGTTG-3'	
KDR	forward:	5'-TATAGATGGTGTAAACCCGGA-3'	555 bp
	reverse:	5'-TTTGTCACTGAGACAGCTTGG-3'	
β-actin	forward:	5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3'	305 bp
	reverse:	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'	

1.2.1 寡核苷酸合成 VEGF反义寡核苷酸及错义寡核苷酸序列参照文献[10], VEGF反义寡核苷酸(ASODN)序列为: 5'-TGGCTTGAAGATGTAC TCGAT-3', VEGF错义寡核苷酸(SODN)序列为: 5'-TACGTAGTATGGTGTACGATC-3', 全硫代修饰, 保存于-70℃待用. Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染参照Oligofectamine™ Reagent说明书和参考文献[11-14]进行.

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 SODN和Oligofectamine™对GBC-SD细胞的毒性试验 实验设对照组、2.5, 5, 10和20 μmol/L SODN组及0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine组. GBC-SD细胞37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>度培养箱培养24 h后, 无血清RPMI1640换液, 并分别加入SODN(终浓度为2.5, 5, 10和20 μmol/L)和0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine. 12, 24, 48和72 h后, 用MTT法检测细胞活力, 并绘制各组细胞的生长曲线.

1.2.3 Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染 指数生长期GBC-SD细胞, 以 $5 \times 10^6$ /L细胞密度接种96孔板中. 混合5 μL Oligofectamine和10 μL 20 μmol/L SODN或10 μL 20 μmol/L ASODN, 制备成无血清转染液, 并加入细胞中, 培养4 h后, 吸弃转染液, 加入含小牛血清培养液继续培养, 此时设为0 h点.

1.2.4 RT-PCR法检测GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的变化 实验设对照组、SODN组、Oligofectamine+SODN组、ASODN组和

Oligofectamine+ASODN组. Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染如前所述. 分别于转染后24, 48, 72和96 h提取总RNA, 逆转录后, PCR扩增各目的基因. 将扩增的RT-PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 用IS1000凝胶数字成像系统拍照, 采用Magnitec Ltd.公司Band Leader Applacation 3.0图像分析软件分析电泳条带灰度, 分析GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA变化. 引物相关参数见表1.

1.2.5 ELISA检测VEGF蛋白分泌的变化 分别收集各组24, 48和72 h的培养液上清, 采用双抗夹心ELISA法检测其中的VEGF蛋白分泌, 具体方法按ELISA试剂盒说明书进行.

统计学处理 实验数据中计量资料以mean±SD表示, 多组资料的统计学检验采用方差分析, 各组均数间的相互比较采用Student-Newman-keuls法, 所有统计学检验均采用统计学软件SPSS11.0进行,  $P < 0.05$ 为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 MTT法测定的SODN和Oligofectamine™对GBC-SD细胞的毒性试验 在12, 24, 48和72 h 4个作用时相点, 对照组、2.5, 5, 10和20 μmol/L SODN组及0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine组GBC-SD细胞生长无明显差异( $P > 0.05$ ), 可见在试验浓度范围内, SODN和Oligofectamine对GBC-SD细胞均未见明显毒性. 各组细胞的生长

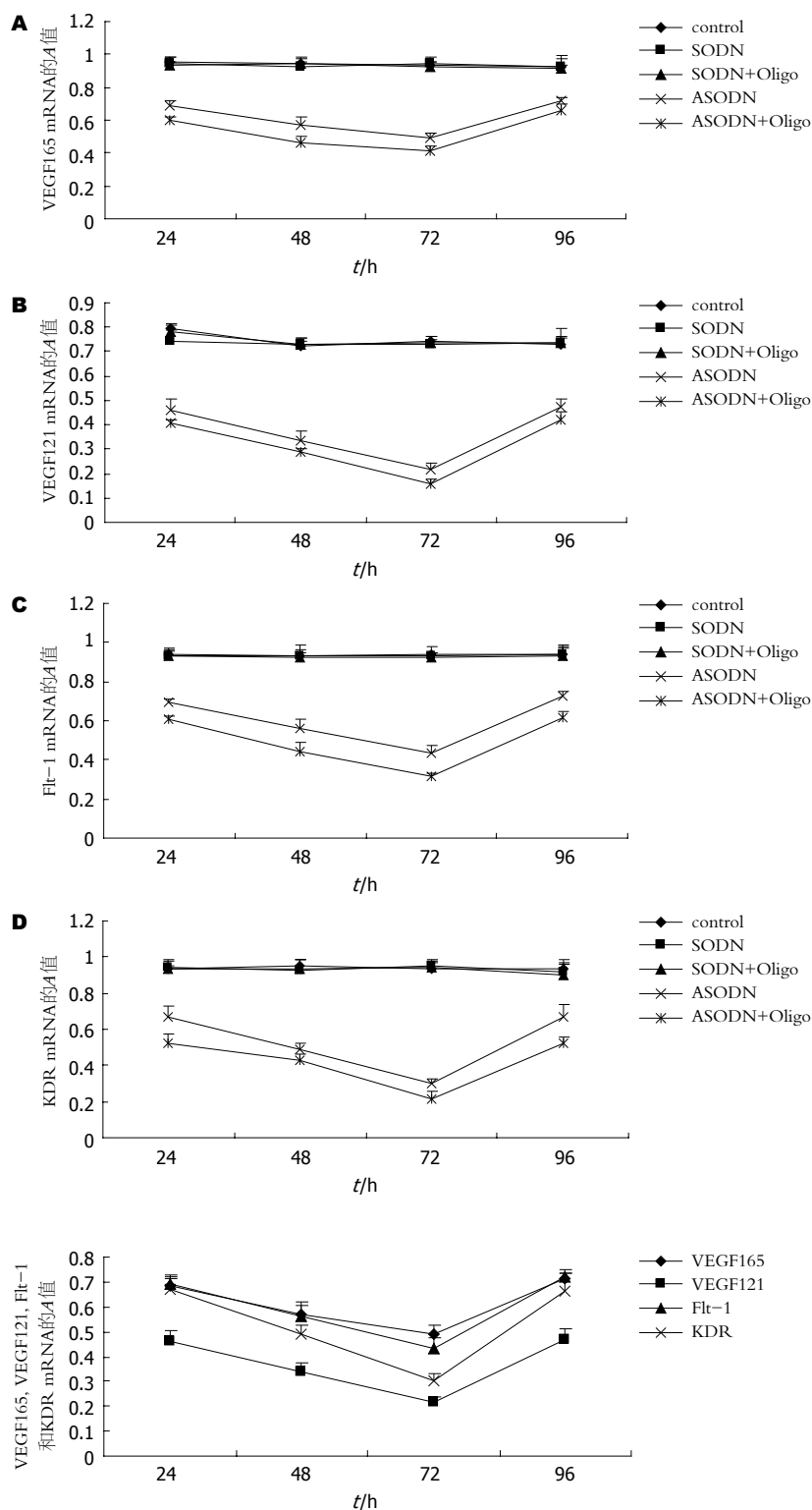


图 2 各组不同时间 VEGF165, VEGF121, Flt-1, KDR mRNA 表达情况. A: VEGF165; B: VEGF121; C: Flt-1; D: KDR.

图 3 VEGF ASODN 直接转染后不同时间 VEGF165, VEGF121, Flt-1 和 KDR mRNA 表达情况.

曲线如图1所示.

**2.2 各组GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA水平的表达情况** RT-PCR扩增产物均经电泳, DNA分子标志标定, 确认为目的条带. 24, 48, 72 和96 h GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA 的表达水平在SODN组、SODN+Oligofectamine 组和control组无明显差别( $P>0.05$ ), 而 ASODN组及ASODN+Oligofectamine组则

明显低于control组( $P<0.05$ ). ASODN组及 ASODN+Oligofectamine组VEGF, Flt-1及 KDR mRNA在同组不同时间作用点的表达 水平也存在差异, 48和72 h组的抑制程度显著 强于24 h组( $P<0.05$ ), 而96 h组与24 h组之间 无显著差异( $P>0.05$ ), 可见VEGF ASODN及 ASODN+Oligofectamine抑制VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的作用在24-72 h左右逐渐增强, 在

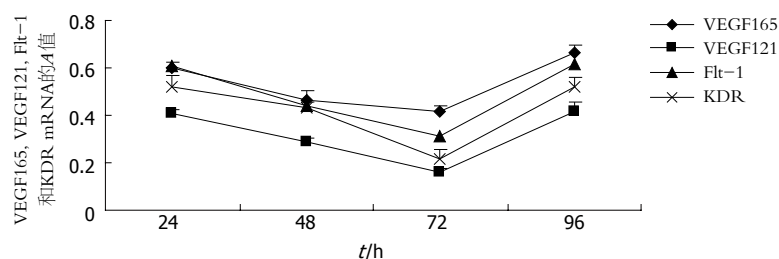


图 4 Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染后不同时间VEGF165, VEGF121, Flt-1和KDR mRNA表达情况.

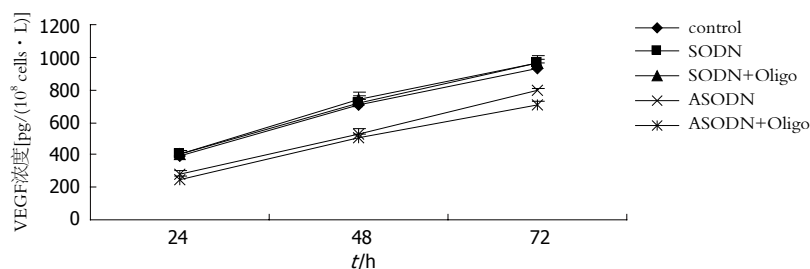


图 5 各组GBC-SD细胞培养液上清VEGF浓度.

72 h抑制作用最强, 在72h后抑制作用开始逐渐减弱, 且ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN组更明显, 虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )(图2-4).

**2.3 ELISA检测VEGF分泌的变化** ELISA检测结果显示, 24, 48和72 h GBC-SD细胞培养上清液中VEGF蛋白浓度在SODN组、SODN+Oligofectamine组和control组无明显差别( $P>0.05$ ), 而ASODN组及ASODN+Oligofectamine组则明显低于control组( $P<0.05$ ), 且ASODN+Oligofectamine组的VEGF蛋白浓度比ASODN组低, 虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )(图5).

### 3 讨论

VEGFR有3种属于酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKs)超家族, 命名为VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(KDR/F1k-1), VEGFR-3(Flt-4). Flt-4分布在淋巴管内皮细胞, Flt-1和KDR/F1k-1则主要在血管内皮细胞内表达<sup>[14]</sup>. KDR/F1k-1激活后能使毛细血管通透性增高, 促进内皮细胞增生及迁移; 而Flt-1激活后可促进内皮细胞分化形成血管, 同时对Flt-1所引起的生物学效应起缓冲作用<sup>[15-16]</sup>. 正常情况下, 这些受体表达水平很低, 大多数组织中不能检测出, 但在病理情况下, 如各种肿瘤等, 常可在其附近血管内皮细胞中检测到受体高度表达. 以往的研究证明在许多人体肿瘤组织中存在VEGF及其受体的异常过度表达<sup>[17]</sup>. VEGF mRNA在肿瘤细胞内表达, 内皮细胞不表达VEGF, 但肿瘤内皮细胞过度表达Flt-1 mRNA和KDR mRNA, 说

明VEGF主要是旁分泌. 但通过对AIDS-Kaposi肉瘤的研究发现<sup>[18]</sup>, VEGF受体的表达除血管内皮外还出现于肿瘤细胞, 用VEGF ASODN可特异地阻抑VEGF蛋白产生, 并可以剂量依赖的方式抑制肉瘤细胞生长. 这提示VEGF可能以自分泌、旁分泌两种方式刺激肿瘤细胞的生长. 不管是何种分泌方式, 在诱导肿瘤生长、转移过程中, VEGF表达的增高是始动因素. VEGF通过与其特异性受体(VEGFR)结合, 引起一系列的信号转导, 释放多种细胞因子与生长因子, 刺激血管内皮细胞增殖和迁移, 促进新生血管生成, 在肿瘤的生长和转移中起重要作用. 抑制VEGFR信号转导通路的任何一个环节, 就可防止肿瘤的进展与转移. 肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成, 而新生血管的形成受与酪氨酸激酶受体(RTKs)结合的特异性生长因子的调控. VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR)都是细胞表面的RTKs, 是信号转导通路的主要环节, 影响细胞的增生、分化、黏附、迁移和代谢. 许多研究提示Flt-1和KDR所引起的信号转导级联反应有所不同, KDR有明显促有丝分裂和化学趋化活性, 在血管通透性升高和血管生成过程中起主要作用, 而Flt-1在血管生成中的调节作用可能与调节内皮细胞间作用、内皮细胞与基底膜作用以及内皮细胞的迁移相关<sup>[10,19-21]</sup>.

ASODN是能与特定的DNA或RNA以碱基互补配对的方式结合, 并阻止其转录和翻译的短核酸片段, 是目前迅速发展的新型的基因治疗药物<sup>[22-23]</sup>. 阳离子脂质体(cationic liposomes)能与带负电荷的核酸物质形成复合物, 可提高细胞对ASODN的摄入, 增加生物利用度, 同时可在



一定程度上降低核酸酶对其的降解,在基因治疗中具有独特的应用价值<sup>[24-31]</sup>。Oligofectamine是一种新型的专门用于寡核苷酸转染的阳离子脂质体,其效率高于市售的Lipofectamine。

半定量RT-PCR结果显示,VEGF ASODN及ASODN+Oligofectamine抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的作用在24-72 h左右逐渐增强,在72 h是抑制作用最强,在72 h后抑制作用开始逐渐减弱,且VEGF ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN更明显,虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ ),而SODN组和SODN+Oligofectamine组则无抑制作用,表明VEGF ASODN在mRNA水平能显著抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF及其受体Flt-1及KDR的表达。ELISA结果表明,VEGF ASODN及ASODN+Oligofectamine在蛋白水平抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF的表达,且VEGF ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN更明显,虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )。可见VEGF ASODN能够特异性封闭VEGF基因并抑制VEGF及其受体Flt-1和KDR表达,阻断其在促进肿瘤新生血管生成通路的信号转导,从而能够抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长增殖,促进细胞凋亡, Oligofectamine作为一种专门用于寡核苷酸转染的阳离子脂质体,能显著提高VEGF ASODN抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的增殖效应,并且这种作用是序列特异性的,而不是脂质体本身的作用或非序列特异性效应。因此Oligofectamine可作为一种低毒载体应用于介导ASODN对胆囊癌的治疗。

从本实验的设计提示VEGF ASODN抑制胆囊癌细胞GBC-SD VEGF的表达,以及其受体Flt-1和KDR表达,即抑制自分泌的方式达到抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长增殖,促进细胞凋亡的效果。也表明胆囊癌细胞GBC-SD存在VEGF自分泌的方式,是否还具有旁分泌的方式,即肿瘤内皮细胞过渡表达Flt-1和KDR mRNA,需要进一步检测实体肿瘤内皮细胞mRNA及蛋白水平Flt-1和KDR表达情况。总之,VEGF ASODN通过抑制VEGF的表达来抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的增殖效应。本实验的结果为将来采用VEGF ASODN对胆囊癌进行基因治疗积累一定的理论基础和实验依据。

#### 4 参考文献

1 李维方, 张光霁, 朱诚, 金由辛, 卢亦成. VEGF反义寡

核苷酸抑制荷瘤大鼠胶质瘤血管生成的作用和效果. 解放军医学杂志 2003; 28: 144-145

2 李维方, 周定标, 余新光, 金由辛. 联合VEGF反义寡核苷酸和PDGF三链形成寡核苷酸抑制大鼠脑胶质瘤生长. 第二军医大学学报 2006; 27: 160-164

3 Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Cho MS, Seong CM, Lee SN, Hong YK, Yung WK. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF. *Br J Cancer* 2001; 84: 1252-1257

4 邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2916-2918

5 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋. VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 655-659

6 刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红. 胰腺癌组织VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1810-1812

7 王江, 窦科峰. 胆囊癌组织hPTTG1和bFGF表达与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 680-684

8 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

9 吴汉平, 冯敢生, 田元. 反义VEGF寡核苷酸与碘油混合肝动脉注入转染鼠肝癌的可行性. 世界华人消化杂志 2004; 12: 23-26

10 Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001; 98: 1904-1913

11 Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 26969-26979

12 Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem* 2002; 277: 46791-46798

13 Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 4003-4009

14 Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zionscheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230

15 Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 2001; 159: 993-1008

16 Lu D, Jimenez X, Zhang H, Wu Y, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and

- kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res* 2001; 61: 7002-7008
- 17 Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, Noie T, Inoue K, Kubota K, Takayama T. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1682-1686
- 18 Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y, Gill PS. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 979-984
- 19 Langer I, Vertongen P, Perret J, Fontaine J, Atassi G, Robberecht P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34: 386-393
- 20 Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117-5124
- 21 Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000; 19: 2138-2146
- 22 Varga LV, Toth S, Novak I, Falus A. Antisense strategies: functions and applications in immunology. *Immunol Lett* 1999; 69: 217-224
- 23 Weiss B, Davidkova G, Zhou LW. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 334-358
- 24 Akhtar S, Hughes MD, Khan A, Bibby M, Hussain M, Nawaz Q, Double J, Sayyed P. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44: 3-21
- 25 Thomas SM, Zeng Q, Dyer KF, Suscovich TJ, Kanter PM, Whalen JD, Watkins SF, Grandis JR. Tissue distribution of liposome-mediated epidermal growth factor receptor antisense gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 518-528
- 26 Zhang Y, Jeong Lee H, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 2002; 4: 183-194
- 27 Ghosh C, Iversen PL. Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10: 263-274
- 28 Arora V, Cate ML, Ghosh C, Iversen PL. Phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers inhibit expression of human cytochrome P450 3A4 and alter selected drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 757-762
- 29 Geller BL, Deere JD, Stein DA, Kroeker AD, Moulton HM, Iversen PL. Inhibition of gene expression in *Escherichia coli* by antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3233-3239
- 30 Moulton HM, Hase MC, Smith KM, Iversen PL. HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13: 31-43
- 31 Tilley LD, Hine OS, Kellogg JA, Hassinger JN, Weller DD, Iversen PL, Geller BL. Gene-specific effects of antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer-peptide conjugates on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in pure culture and in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2789-2796

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.(世界胃肠病学杂志社2007-04-18)

# 自体树突状细胞联合抗病毒治疗对HBV慢性感染者的临床效应

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海舫, 柳立平, 申伟, 王淑云

## ■背景资料

近年来随着生物疗法的进展, 人们对树突状细胞(DC)体外扩增和抗原致敏的研究已成为热点, 将其制备成特异DC疫苗用于慢乙肝的治疗已引起了广泛关注。

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海舫, 柳立平, 申伟, 王淑云, 河北医科大学第一医院肝病中心 河北省石家庄市 050031

佟立新, 医学学士, 主任医师, 主要从事肝病临床治疗研究。

河北省科技厅资助项目, No. 04276101D-40

通讯作者: 刘树贤, 050031, 河北省石家庄市东岗路89号, 河北医科大学第一医院肝病中心. lzhao-002@163.com

电话: 0311-85917156

收稿日期: 2006-12-06 接受日期: 2007-01-10

## Clinical effects of autologous dendritic cells combined with anti-virus therapy on chronic hepatitis B virus infection

Li-Xin Tong, Shu-Xian Liu, Li-Hong Guo, Wei Duan, Bai-Li Chen, Hai-Fang Wang, Li-Ping Liu, Wei Shen, Shu-Yun Wang

Li-Xin Tong, Shu-Xian Liu, Li-Hong Guo, Wei Duan, Bai-Li Chen, Hai-Fang Wang, Li-Ping Liu, Wei Shen, Shu-Yun Wang, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China

Supported by the Grants from Hebei Science and Technology Bureau, No. 04276101D-40

Correspondence to: Dr. Shu-Xian Liu, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 89 Donggang Road, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China. lzhao-002@163.com

Received: 2006-12-06 Accepted: 2007-01-10

## Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical effects of autologous HBsAg-loaded dendritic cells (DCs) combined with anti-viral treatment on patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

**METHODS:** A total of 41 chronic HBV infected subjects were treated with single interferon- $\alpha$ -2b for 6 months before the trial, and the treatment was stopped for the irresponsive cases. Six months later, the irresponsive cases received the combined therapy of interferon- $\alpha$ -2b and autologous HBsAg-loaded DCs for another 6 months (one course containing twice of re-transfusion). The changes of virology, serology and biochemistry indexes were observed one month after the end of treatment.

**RESULTS:** DCs were cultured *in vitro*. After proliferation for 6 days, DCs were incubated with HBsAg for 1 day to prepare the specific DCs vaccine. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were significant decreased after the combined therapy as compared with those before ( $t = 2.976, P < 0.01; t = 2.049, P < 0.05$ ). The response rate of HBV DNA was 53.7%, and the decrease of HBV DNA copies was greater than or equal to  $2\log_{10}$ . Neither the injection times of DCs nor the HBV-carrying time had a correlation with the virological responses ( $r = 0.048, P > 0.05; r = 0.137, P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Combined treatment of autologous DCs vaccine and interferon- $\alpha$ -2b has a favorable effect on patients with chronic HBV infection.

**Key Words:** Dendritic cell; Hepatitis B virus; Combined treatment; Anti-virus

Tong LX, Liu SX, Guo LH, Duan W, Chen BL, Wang HF, Liu LP, Shen W, Wang SY. Clinical effects of autologous dendritic cells combined with anti-virus therapy on chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1232-1236

## 摘要

**目的:** 观察乙肝病毒(HBV)慢性感染者自体树突状细胞(DC)联合抗病毒治疗的临床效应。

**方法:** 采用自身前后对照试验, 对41例HBV慢性感染者在试验前均应用IFN- $\alpha$ -2b治疗6 mo, 无应答者停药6 mo后继续IFN- $\alpha$ -2b治疗6 mo, 同时联合自体DC回输治疗, 回输两次为一疗程。疗程结束后1 mo检测受试者病毒学、血清学、生化学指标, 在回输前后起始的检测指标均一致的基础上观察自身前后的变化。

**结果:** 体外培养扩增DC至第6天, HBsAg致敏形成特异性DC疫苗。DC回输后ALT和AST水平较回输前明显降低( $t = 2.976, P < 0.01; t$

= 2.049,  $P < 0.05$ ). HBV DNA应答率为53.7%, DNA拷贝数下降 $\geq 2\log_{10}$ . DC回输次数与病毒学应答反应没有相关性( $r = 0.048$ ,  $P > 0.05$ ), HBV携带时间与病毒学应答反应亦没有相关性( $r = 0.137$ ,  $P > 0.05$ ).

**结论:** 自体DC回输联合IFN- $\alpha$ -2b治疗HBV慢性感染者, 生化学和病毒学单项应答反应均优于单纯IFN- $\alpha$ -2b治疗.

**关键词:** 树突状细胞; 乙型肝炎病毒; 联合治疗; 抗病毒

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海航, 柳立平, 申伟, 王淑云. 自体树突状细胞联合抗病毒治疗对HBV慢性感染者的临床效应. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1232-1236  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1232.asp

## 0 引言

自1990年代初至今, 随着对树突状细胞(DC)的体外分离、扩增和培养技术方面的基础研究, 带动了临床研究的逐渐深入. 目前已发现了许多疾病的发生与转归都与DC有关. 因此通过对DC成熟过程中的改变来调节机体的免疫功能, 渴望达到治疗疾病的目的已成了研究的热点. 该研究采用特异性自体DC疫苗与抗病毒药物治疗相结合, 对HBV慢性感染者的临床效应进行了观察.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选自我院肝病中心2004-05/2005-12门诊与住院的HBV慢性感染者41例, 其中慢性携带者22例, 慢性乙型肝炎(CHB)19例, 诊断标准符合2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》<sup>[1]</sup>. 受试者均不合并其他肝炎病毒感染, 亦不合并其他严重并发症(表1), 同时全部获得了知情同意. 主要仪器: CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Forma, 美国), 倒置显微镜(Olympus, 日本), 流式细胞仪(Coulter, 美国), 全自动酶标仪(Thermo, 芬兰). 主要试剂: rhGM-CSF、rhIL-4、RPMI1640培养液、鼠抗人CD40、CD83, 均购自河北博海生物工程有限公司. HBsAg购自中国预防医学科学院病毒所.

**1.2 方法** 在无菌条件下抽取受试者外周静脉血20 mL, 肝素抗凝, 在百级试验室进行下面操作, 生理盐水1:1稀释抗凝血, 层加到淋巴细胞分离液2000 r/min离心30 min, 分离出外周血单核细胞并计数, 用1640液洗2次, 再加入含有体积分数150 mL/L人AB血清的1640完全培养基重

表1 41例受试者一般特征

诊断	n	性别		年龄(岁)						自觉症状	
		男	女	<20	20-	30-	40-	50-		有	无
慢性携带	22	15	7	2	11	5	4	0	5	17	
慢性肝炎	19	16	3	1	8	5	4	1	9	10	
合计	41	31	10	3	19	10	8	1	14	27	

悬细胞. 以 $2 \times 10^9$ /L的细胞浓度加入一次性6孔培养板中, 于37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度下培养4 h, 吸弃上清液, 再用1640培养液轻洗2次, 除去非贴壁细胞, 加入含8335  $\mu$ kat/L rhGM-CSF和8335  $\mu$ kat/L rhIL-4的完全培养基, 隔日换液, 培养至第6天再加入终浓度为2.5 mg/L的HBsAg, 4 h后加入终浓度为10  $\mu$ g/L的TNF, 继续在37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度下培养1 d, 收获DC用生理盐水洗涤2次并计数, 即刻在受试者腋下部位常规消毒后经皮下注入体内<sup>[2-6]</sup>. 同时取细胞洗液做无菌实验. 采用自身前后对照, 对41例HBV慢性感染者, 在试验前均应用IFN- $\alpha$ -2b 500万单位/次肌注隔日一次, 治疗6 mo无应答者停药6 mo后继续IFN- $\alpha$ -2b治疗6 mo, 同时联合自体DC回输治疗, 回输2次为一疗程(间隔2 wk). 治疗结束后1 mo, 观察受试者HBV DNA、乙肝五项及ALT、AST指标的变化. 在回输前后起始的检测指标均一致的基础上, 对DC回输前后做自身比较.

**统计学处理** 计量资料用mean $\pm$ SD表示, 进行t检验. 计数资料用 $\chi^2$ 检验和Fisher精确概率检验以及等级相关分析(Spearman法). 全部资料均用SPSS10.0软件包处理.

## 2 结果

**2.1 DC体外培养扩增** 外周血单核细胞贴壁4 h后获得黏附细胞, 加入细胞因子24 h后贴壁细胞减少, 悬浮细胞渐增多, 随培养时间延长至第6天呈积聚现象, 并可见到悬浮细胞具有树突样突起(图1), 台盼蓝染色细胞存活率达95%以上.

**2.2 外周血DC特征标志** DC培养第6天后, 经流式细胞仪检测DC表面CD83的表达(图2). 经组化免疫检测DC表面CD40的表达(图3).

**2.3 HBsAg致敏DC** 细胞培养至第6天, 加入终浓度为2.5 mg/L的HBsAg, 4 h后再加入终浓度为10  $\mu$ g/L的TNF继续培养1 d, 收获DC(图4).

**2.4 41例HBV慢性感染者DC回输前后生化学指标的变化** 结果显示, ALT, AST在DC回输前与回输后的生化学单项应答比较有明显差异( $P < 0.01$ , 表2).

## ■ 研发前沿

特异DC性疫苗对HBV慢性感染者的治疗已引起广为关注, 为临床治疗开辟了新的途径. 但经体外扩增乃至用HBsAg致敏的DC, 其性质有可能有别于体内自然存在的微环境状态下的性质. 因此, 更应深入研究体内、外诸多因素与疗效的关联.



### 应用要点

目前研究表明,机体的B细胞和T细胞介导的免疫反应是由DC所调控,从而激发免疫反应,使侵入机体的病毒得以清除.因此应用自体DC疫苗回输治疗HBV慢性感染的研究开辟了治疗学的新方向,应用前景广泛.

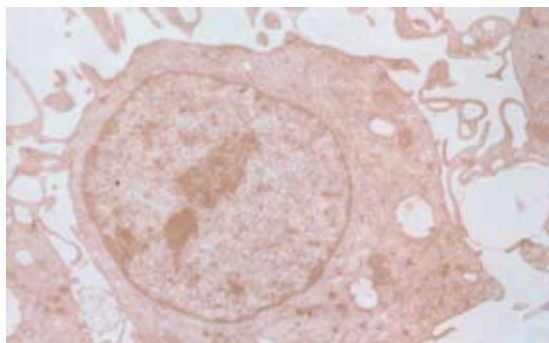


图1 培养第6天透射电镜下DC形态(×4000).

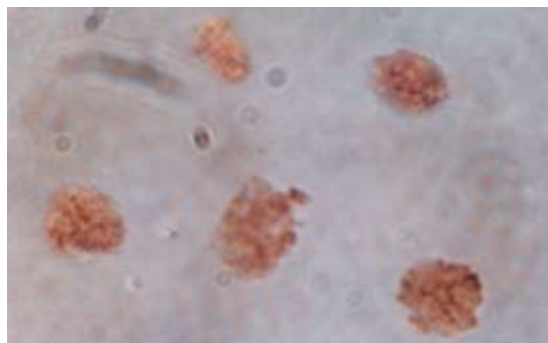


图3 免疫组化检测DC表面CD40的表达(×400).

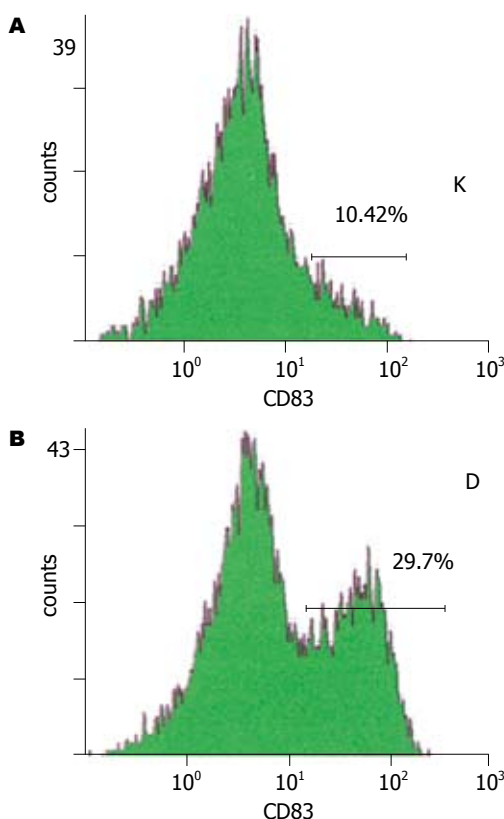


图2 流式细胞仪检测DC表面抗原分析. A: DC促成成熟前CD83表达; B: DC促成成熟后CD83表达.

2.5 41例HBV慢性感染者DC回输前、后血清学指标单项应答的变化 回输前HBsAg阳性数41例, HBsAb阳性数0例, HBeAg阳性数27例, HBeAb阳性数4例, HBcAb阳性数39例. 回输后, HBsAg阳性数41例, HBsAb阳性数0例, HBeAg阳性数27例, HBeAb阳性数3例, HBcAb阳性数41例. 以上数据显示了回输前后无显著性差异.

2.6 DC回输前后病毒学单项应答反应变化 结果显示, 回输前41例受试者均无应答反应, 但回输后完全应答4例、应答18例、无应答减至19例, 有统计意义, 病毒学单项总应答率达53.7%(表3).

2.7 自体DC回输次数与病毒学应答反应类型的

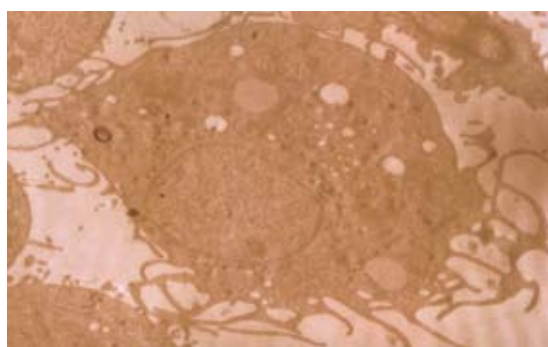


图4 培养结束收获DC透射电镜下形态(×3500).

表2 HBV慢性感染者DC回输前后生化指标单项应答比较(mean ± SD, IU/L)

分组	n	ALT	AST
IFN-α-2b	41	60.40 ± 31.43	54.29 ± 31.07
IFN-α-2b+DC	41	41.76 ± 24.92	41.80 ± 23.64
T值		2.976	2.049
P值		<0.01	<0.05

关系 结果显示, 自体DC回输次数与病毒学应答反应类型无直线相关关系, 作等级相关分析( $r = 0.048, P > 0.05$ , 表4).

2.8 HBV携带的时间与病毒学应答反应的关系 结果显示, 携带病毒时间与病毒学应答反应的类型无量效应关系, 等级相关分析( $r = 0.137, P > 0.05$ , 表5).

### 3 讨论

乙型肝炎病毒感染的慢性化是一个较大的群体, 在我国约占全世界的1/3. 每年由于慢性乙肝死亡的约30万例<sup>[7-11]</sup>. 着眼于这方面的防治研究一直是国家的重点也是热点课题. 目前尚无理想方法根除体内HBV的情况下, 减缓或阻断慢性化进程是当前重要的治疗策略.

表 3 受试者DC回输前后病毒学单项应答反应比较( $n = 41$ )

分组	DC回输前后病毒学单项应答反应类型			总应答率(%)
	完全应答	应答	无应答	
IFN- $\alpha$ -2b	0	0	41	0/41(0.0)
IFN- $\alpha$ -2b+DC	4	18	19	22/41(53.7)
显著性检验	确切概率 $P = 0.058$	$\chi^2 = 21.45$ $P < 0.005$	$\chi^2 = 26.45$ $P < 0.005$	$\chi^2 = 26.45$ $P < 0.005$

表 4 自体DC回输次数与病毒学应答反应的关系( $n$ )

回输次数	病毒学单项应答反应类型			合计
	完全应答	应答	无应答	
1-3	0	7	7	14
4-6	1	11	3	15
>7	3	0	9	12
合计	4	18	19	41

表 5 HBV携带时间与病毒学反应的关系( $n$ )

持续时间(年)	病毒学单项应答反应类型			合计
	完全应答	应答	无应答	
<10	2	13	9	24
10-19	1	4	8	13
>20	1	1	2	4
合计	4	18	19	41

HBV感染后慢性化的形成与发展是非常复杂的过程, 其中宿主的免疫应答缺陷, 特别是细胞免疫功能低下, 不能产生有效的细胞毒性T细胞(CTL)反应, 导致了HBV的持续感染. 树突状细胞作为功能最强的抗原提呈细胞和免疫反应的启动者<sup>[8-15]</sup>, 在HBV感染后可能成为决定急性自限性感染或是慢性感染的标志. 随着对DC体外分离、扩增和培养技术方面基础研究的进展, 带动了临床治疗学研究的发展. 该研究在建立了DC体外分离、扩增以及HBsAg致敏的实验研究基础上, 对41例HBV慢性感染者进行自体回输特异性DC疫苗同时联合抗病毒药物治疗, 以自身前后对照设计模式, 作了临床观察. 依据慢性乙型肝炎防治指南的标准<sup>[16]</sup>, 采用单向应答标准, 对其效应分析如下: 受试者41例均为HBV慢性感染者, 经过IFN- $\alpha$ -2b治疗6 mo后, 在此基础上停药6 mo后再继续IFN- $\alpha$ -2b治疗, 同时联合自体特异性DC疫苗回输治疗. 实验结果显示, IFN- $\alpha$ -2b联合DC回输的干预措施, 单项生化学应答反应及单项病毒学应答反应均优于单纯IFN- $\alpha$ -2b的干预措施. 其ALT, AST复常或下降, DC回输前后比较有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). 病毒学应答反应表现在HBV DNA载量下降或转阴, DC回输前后比较有统计学意义( $P < 0.05$ ), 病毒学总应答率53.7%. 以上结果表明了自体特异性DC疫苗的治疗, 能够抑制病毒复制, 降低感染者的血清病毒载量. 有可能在于DC体外试验可促使其成熟和功能的完善, 回输体内后有利于促进

干扰素的抗病毒疗效, 而干扰素治疗又有诱导HBV慢性感染者血源性DC产生的作用, 或增加血源性DC的前体细胞, 使之易于向DC分化. 此种联合治疗的临床研究较为鲜见. 特别针对慢性携带状态的青年人群, 应采取积极的治疗措施, 尽早消除升学、就业、婚姻等问题的困惑.

研究还观察到自体DC回输次数与病毒学应答反应无直线相关关系. 表明了随着DC回输次数增加, 并不能改善病毒学应答反应. 当然这与体外获得的DC状态是否典型(如树突明显, 且发亮, 胞体折光性好, 有成簇的DC出现, 大量悬浮等)和DC的数量应越多越好有直接关系<sup>[17-18]</sup>, 并考虑到回输后的DC在体内维持其活性的时间长短等因素. 为此, DC疫苗的临床治疗效果与回输次数之间无明显的直接关系. 该研究还观察到了病毒学应答类型与HBV持续携带时间无量效应关系, 经等级相关分析. 在此基础上拟进一步扩大DC研究的范围, 从多学科、多因素、多中心的角度探讨与治疗效应有关的因素, 及因素与因素之间的交互作用的研究, 从而推进临床治疗学的进展.

总之, 针对HBV的免疫应答低下是病毒持续存在, 感染慢性化的主要原因<sup>[19-26]</sup>. 因此, 重建宿主细胞免疫功能将是治疗措施之一<sup>[27]</sup>. 但值得注意的是目前的研究结果大多是以体外培养扩增DC为研究重点, 而经体外培养扩增乃至用HBsAg冲激的DC, 其性质有可能有别于体内自然存在的微环境状态下的性质<sup>[28-32]</sup>. 因此, 要客

## ■名词解释

1 树突状细胞(DC): 是起源于骨髓的最强的专职抗原提呈细胞(APC), 具有启动T细胞介导的免疫应答功能, 因其形态上具有许多突起而得名. DC在免疫应答中起了举足轻重的作用.

2 自身前后对照设计: 是指研究对象不分组, 将实验分为前后两个阶段, 第一阶段的治疗结束后, 经过洗脱期待药物残留效果在体内完全消失, 再开始第二个阶段的治疗, 在治疗结束后比较两种措施的效果. 此种设计可比性好, 消除了不同个体间的差异, 减少了偏倚.

# ■同行评价

DC自体回输,是近几年抗病毒研究的一个热点,利用HBV特异蛋白在体外预先制备的DC而制成自体疫苗可望成为未来的治疗办法。文章有一定的新颖性,方法可靠,结果可信,有实际意义。

观的对待体外DC研究的结果。更应注意DC双重性作用。人体的免疫调节,实为一个非常复杂的,多位点的调控系统,对今后DC的制备和应用的研究,要进一步作出一套相适应的质控标准和在临床应用方面的规范条件。

**致谢:** 本文得到王锡育主任的大力帮助,张明辉副主任、马文波、解从君、张丽霞、刘静医师的参加,一并致谢。

## 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 Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223: 1-15
- 3 李用国, 罗云萍, 梁增伟, 任红. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增. 重庆医科大学学报 2001; 26: 1-3
- 4 周雨迁, 詹俊, 邓庆丽, 黄志清, 邵静, 智慧, 黄志明. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 256-260
- 5 Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93
- 6 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 雷虹, 万涛, 陈国友, 马施华. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 中国肿瘤生物治疗杂志 1997; 4: 191
- 7 贾继东, 庄辉. 中国慢性乙型肝炎治疗进展研讨会会议纪要. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 698-699
- 8 曹雪涛. 树突状细胞的研究热点及其与疾病的防治. 中华医学杂志 1999; 79: 163-165
- 9 张锦堃, 陈海滨, 孙劲旅, 周燕琼. 树突状细胞对不同诱导时间LPAK抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999; 7: 673-675
- 10 韩进超, 臧国庆, 余永胜. 树突细胞的成熟状态和慢性病毒性肝炎. 国外医学·流行病学传染病学分册 2005; 32: 54-57
- 11 刘源, 李军. 树突细胞与慢性乙型肝炎相关性研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2004; 31: 79-81
- 12 高泽立, 许洁, 陈同辛. 树突细胞功能与乙型肝炎病毒感染慢性化的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2005; 32: 299-301
- 13 邱双健. 树突状细胞与肝癌的免疫逃逸. 世界华人消化杂志 2005; 13: 429-431
- 14 罗治彬, 徐采朴, 王东, 王阁, 肖世全, 朱高友, 房殿春. 致敏树突细胞及其亚细胞成分对荷胃癌小鼠的免疫治疗作用研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 9-12
- 15 罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基. mRNA致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 13-15
- 16 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 17 Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; 31: 323-331

- 18 Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Kruskall MS, Awdeh Z, Schlossman SF, Alper CA, Yunis EJ. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991; 173: 531-538
- 19 李用国, 陈敏, 张大志, 王志毅, 曾维群, 石小枫, 郭渊, 郭树华, 任红. 自体树突状细胞疫苗治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 206-208
- 20 张书广, 赵歧刚, 李友忠. 树突状细胞疫苗的制备及治疗慢性乙型肝炎的疗效观察. 山东医药 2005; 45: 7-9
- 21 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Bocher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836
- 22 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 23 Akbar SK, Onji M. Hepatitis B virus (HBV)-transgenic mice as an investigative tool to study immunopathology during HBV infection. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 279-291
- 24 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 4520-4529
- 25 李用国, 梁增伟, 蔡大川, 兰英华, 周卫平, 任红. 树突状细胞体外激活的CTL杀伤效应. 重庆医科大学学报 2003; 28: 138-139, 165
- 26 Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161: 1947-1953
- 27 Whitmire JK, Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 448-455
- 28 汤多壮. 树突细胞体外扩增及其修饰在肿瘤免疫治疗中的应用. 国外医学·输血及血液学分册 2006; 29: 246-248
- 29 Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, Qiu YH, Pan JZ, Xie W, Jiang LY, Klein B, Zhang XG. An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line. *Hybridoma* 1999; 18: 471-478
- 30 Tarte K, Fioll G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation *in vitro*. *Leukemia* 2000; 14: 2182-2192
- 31 Loudovaris M, Hansen M, Suen Y, Lee SM, Casing P, Bender JG. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 569-578
- 32 Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umansky V, Schirmacher V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. *Int J Oncol* 2002; 20: 247-253

电编 张敏 编辑 王晓瑜

# 肝富集转录因子对乙型肝炎病毒转录与复制的调控

王甦, 唐红

王甦, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室感染性疾病分子生物学研究室(现在扬州大学医学院附院感染科) 四川省成都市 610041

唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心 四川省成都市 610041

国家杰出青年基金资助项目, No. 30325036

通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院感染性疾病中心, htang6198@hotmail.com

收稿日期: 2007-01-13 接受日期: 2007-02-12

## Regulation of hepatitis B virus transcription and replication by liver-enriched transcriptional factors

Su Wang, Hong Tang

Su Wang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University; Molecular Biology Division of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 30325036

Correspondence to: Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University, 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com

Received: 2007-01-13 Accepted: 2007-02-12

## Abstract

Hepatotropism is a prominent feature of hepatitis B virus (HBV). Cell lines of nonhepatic origin do not independently support HBV replication. In this review, we show that the nuclear hormone receptors, hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor plus peroxisome proliferator-activated receptor, support HBV replication in nonhepatic cells by controlling pregenomic RNA synthesis, indicating that these liver-enriched transcription factors control a unique molecular switch restricting viral tropism. In contrast, hepatocyte nuclear factor 3 antagonizes nuclear hormone receptor-mediated viral replication, demonstrating distinct regulatory roles for these liver-enriched transcription factors.

Key Words: Hepatitis B virus; Transcription and replication; Liver-enriched transcription factors

Wang S, Tang H. Regulation of hepatitis B virus transcription and replication by liver-enriched transcriptional factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1237-1240

## 摘要

乙肝病毒具有明显的嗜肝性. 在非肝源乙肝病毒复制体系中, 发现肝富集转录因子在HBV肝特异性复制过程中起重要作用. 其中, 肝富集转录因子HNF4和RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 是调节前基因组RNA转录和病毒复制所必需, 是病毒嗜肝性的重要决定因素之一, 而肝富集转录因子HNF3对HNF4和RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 介导的HBV转录和复制具有抑制作用. 从而揭示HBV的嗜肝机制涉及HBV感染进入细胞和HBV基因转录复制两个水平的调控.

关键词: 乙肝病毒; 转录与复制; 肝富集转录因子

王甦, 唐红. 肝富集转录因子对乙型肝炎病毒转录与复制的调控. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1237-1240

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1237.asp>

## 0 引言

HBV属嗜肝DNA病毒, 通过逆转录机制复制. 其基因组全长3.2 kb, 具有Cp, PSlp, Sp和Xp 4个启动子, 分别调控3.5, 2.4, 2.1和0.7 kb HBV mRNA的转录, 并进而编码合成HBcAg、HBeAg、DNA多聚酶、HBsAg及HBxAg, 且3.5 kb前基因组RNA(pregenomic RNA)也是病毒逆转录复制的模板. 因此, HBV基因组的转录是病毒复制过程中最关键的步骤. 肝富集转录因子(liver-enriched transcription factor)是一类具基因转录调控作用的蛋白质分子, 主要存在于肝脏. 若干种肝富集转录因子, 如肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)1, HNF3, HNF4; 视黄醇X受体 $\alpha$ (retinoid X receptor  $\alpha$ , RXR $\alpha$ )、过氧化物酶增殖激活受体 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ )以及CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)等, 能与HBV基因组的4个启动子结合, 从而对HBV的

## ■背景资料

肝富集转录因子是一类具有基因转录调控作用的蛋白质分子, 主要存在于肝脏. 研究表明, 若干种肝富集转录因子能与HBV基因组的启动子结合, 对HBV的基因转录发挥正性和负性调控作用, 由于这一领域对乙型肝炎发病机制研究和抗HBV药物作用靶点的筛选均十分重要, 故成为当前的一个研究热点.



## ■创新盘点

本文提出肝富集转录因子在HBV的肝特异性复制表达过程中起重要作用。其中,核激素受体HNF4和RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 能支持HBV在非肝源细胞中的转录与复制,为HBV前基因组RNA合成和病毒复制所必需,是病毒嗜肝性的重要决定因素之一,而肝富集转录因子HNF3对核激素受体介导的HBV复制具抑制作用。提示HBV复制不仅取决于HNF4和RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 的水平,也与HNF3的相对水平和活性密切相关。

基因转录发挥调控作用。研究发现,核心启动子的激活有多种肝富集转录因子<sup>[1-5]</sup>共同参与,从而控制病毒3.5 kb前基因组RNA的转录和病毒复制。现将几种主要肝富集转录因子的生物学特性及其在乙肝病毒基因转录与病毒复制中的作一综述。

### 1 核激素受体-HNF4以及RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$

肝细胞核因子4(hepatocyte nuclear factor 4, HNF4)是核激素受体超家族配基激活型转录因子的高度保守成员之一,具有脂溶性激素受体的特性,能够直接进入细胞核调节基因转录,从而对机体的各种生理活动进行调控,是糖及脂类等能量物质代谢所必需的调控因子。HNF4通常在肝、肾、肠高度表达,而在胰腺则呈低水平表达。过氧化物酶体增殖激活受体(PPARs)是核激素受体的亚科,有PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ 和PPAR $\delta$  3种亚型;与另外一个亚科视黄醇X受体(RXRs)形成二聚体复合物(RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ )而起作用<sup>[6]</sup>。PPARs的配基还不清楚,但许多化学合成的过氧化物酶体增殖物如对氯苯氧异丁酸(clofibric acid), Wy-14643能起到配基的功能。已证实9-顺式维甲酸(9-*cis*-retinoic acid)是RXRs的配基。研究显示, HNF4和RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 等核激素受体能激活乙肝病毒核心启动子。

Tang *et al*<sup>[1-2]</sup>建立了非肝源细胞HBV复制体系。用非肝源性细胞(鼠成纤维细胞NIH3T3)作为受体细胞,利用复制型HBV重组质粒研究病毒的转录和复制。结果发现,在未用共转染肝富集转录因子时,未见3.5 kb HBV RNA转录,也未检测到病毒复制,但仍有2.1 kb HBV RNA转录(研究表明其主要受泛嗜性转录因子调节);共转染HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , HNF3 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 和HNF6都不支持3.5kb HBV RNA转录和病毒复制;而在共转染HNF4或RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 时,能刺激3.5 kb HBV RNA合成和病毒复制。由于3.5 kb HBV RNA水平与病毒复制相关的,因此,核激素受体HNF4和RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 是调节前基因组RNA转录的主要决定因子,并进而调节病毒复制。提示HNF4和RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 在HBV肝特异性转录复制中具有重要作用。对HBV在不同类型细胞复制水平的比较发现,在分化成熟的肝癌细胞株(huh7和hepG2)中,并不需要外来的核激素受体,HBV就能较强的进行3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制,主要是其已有各种肝富集转录因子。而未分化成熟的

肝癌细胞hepG2.1其转录因子水平较低,非肝源性3T3细胞在共转染RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 表达质粒,显示3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制水平约为肝癌细胞的三分之一。在Hela, 293T, SW1353, CV-1和COS1等非肝源性细胞也证明了核激素受体调节3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制。这表明,核激素受体主要在肝细胞内正性调节病毒复制。

为研究核激素受体调节HBV复制的作用位点和机制。Tang *et al*<sup>[1]</sup>构建在核心启动子近端的HNF4结合位点(也是RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 的结合位点)的4个碱基突变的突变型HBV HNF4mut重组质粒。结果发现,该HNF4结合位点的突变,阻碍了HNF4与核心启动子近端的HNF4结合位点的结合,结果3.5 kb HBV RNA表达较野生株有轻微的下降,而病毒复制则明显下降。说明核激素受体对HBV的增强作用主要是通过该结合位点来实现的。由于该突变型重组质粒仍能在非肝源性细胞复制体系中复制(只是水平较野生株低),提示该HNF4结合位点并非唯一的作用位点。

有学者利用HBV转基因小鼠对PPAR $\alpha$ 在体内的作用进行了研究,发现PPAR $\alpha$ 能激活HBV病毒复制,从而证明在HBV复制周期中,PPAR $\alpha$ 在体内的作用。Raney *et al*<sup>[4]</sup>用带有临床常见的前C区突变(A1764T和G1766A)的HBV病毒株构建转基因小鼠,该突变发生在核心启动子核素受体结合区(A1764T和G1766A),该区的突变阻断了RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ 与核心启动子核素受体结合。结果显示,与野生株转基因小鼠相比,突变株转基因小鼠肝脏中2.1 kb HBV RNA和3.5 kb HBV RNA合成呈低水平,病毒复制明显下降。因此,核激素受体(HNF4和RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ )为HBV前基因组RNA合成和病毒复制所必需,且是一个正性(增强作用)的调控因子,是病毒嗜肝性的重要决定因素之一。

### 2 肝细胞核因子3(HNF3)

HNF3家族包括HNF3 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ 和HNF3 $\gamma$  3个成员,具有一高度保守的DNA结合区即翼旋(wingedhelix)区并以单体形式结合。由于该DNA结合区与果蝇叉脑(forkhead)基因相应区域高度同源<sup>[9,18]</sup>,因此将HNF3 $\alpha$ , 3 $\beta$ 和3 $\gamma$ 的编码基因称为Foxa1, Foxa2和Foxa3。HNF3各成员的氨基末端和羧基末端有长大约100个氨基酸的高度保守,参与转录激活作用。HNF3 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ 和HNF3 $\gamma$ 以不同的亲和性与相同DNA序列结合,不仅在肝细胞的成熟分化起重要的调控作用,

也参与胚胎的发育过程. 对其功能区在HBV转录复制中的研究显示, HNF3 $\beta$ 氨基末端转录激活区对其抑制HBV复制的功能是非常重要的, 而酸基末端的转录激活区对乙肝DNA合成无明显影响. HNF3调节HBV转录复制的功能区位于氨基酸残基的1-102和103-152<sup>[10,16-17]</sup>.

利用报导基因的研究(reporter gene assay)显示<sup>[10]</sup>, HNF3 $\beta$ 可以增强HBV核心启动子和PS1启动子的活性. 由于HBV前基因组RNA是HBV DNA复制的模板, 其活性由C启动子调控, 因此据此推测, HNF3应该能增强HBV前基因组RNA转录和DNA复制. 但对HBV 3.5 kb mRNA由外源的CMV启动子控制时发现, HNF3抑制HBV前基因组RNA和病毒DNA的合成. 同时, 利用非肝源性细胞鼠成纤维细胞NIH3T3病毒复制体系的研究发现<sup>[10]</sup>, HNF3对HNF4和RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 介导的乙肝病毒复制具有抑制作用. HNF3 $\alpha$ 和HNF3 $\beta$ 能使3.5 kb HBV RNA转录水平下降2-3倍, HNF3 $\alpha$ 使HBV复制中间体下降8倍, HNF3 $\beta$ 使HBV复制中间体下降25倍. 而当核激素受体共转染HNF1时, 未显示其对HBV转录或复制的调节作用. 提示HNF3能减少3.5 kb HBV RNA的转录, 明显降低HBV复制中间体.

Banks *et al*<sup>[11]</sup>在表达HNF3 $\beta$ 的HBV转基因小鼠同样证明, 过度表达HNF3 $\beta$ 可明显减少病毒复制中间体水平, 较不表达HNF3 $\beta$ 乙肝转基因鼠低6-23倍. 3.5, 2.4和2.1 kb HBV RNA转录产物与对照比较降低2-4倍. 因此, HNF3抑制HBV的转录和复制, 是一个负性调节因子. 同时研究表明<sup>[10]</sup>, HBV基因组上共有7个HNF3结合位点, 其中在增强子I/X启动子(EnhI/Xp)和C启动子(Cp)区各有2个, 多聚酶编码区(PORF)、PS1p和Sp区各有1个, 因而, HNF3对HBV的转录和复制的调节可能横贯整个过程. 同时在HBV复制体系中, 也有HBsAg, HBeAg, HBxAg等病毒产物的表达. 因而HNF3也可能通过病毒蛋白产物间接抑制HBV的复制.

### 3 其他肝富集转录因子

肝细胞核因子1(hepatocyte nuclear factor 1, HNF1)分为HNF1 $\alpha$ 和HNF1 $\beta$ 两亚型. HNF1 $\alpha$ 能与肝特异表达基因如白蛋白、 $\beta$ 纤维蛋白原、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白等基因的5'顺式调控元件结合, 受HNF1 $\alpha$ 调控的基因都具有GGTTAAT这一保守序列, 他们的编码产物参与糖代谢、解毒和血浆蛋白合成的生理过程. 研究表明, 在HBV基因

组表面抗原含有两个串联的启动子-Sp I 和Sp II<sup>[7-8]</sup>. 其中, Sp I 含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为HNF1结合位点<sup>[12]</sup>. 该结合位点是HBV转录调节的重要组分. 对携带HBV DNA的转基因小鼠及感染HBV的黑猩猩模型的研究表明, 表面抗原主蛋白可在不同的组织中表达, 而表面抗原大蛋白只在肝内特异发现, 这一结果提示: 表面抗原大蛋白的表达具有肝特异性, Sp I 在肝特异性表达中起着重要作用. Chang *et al*<sup>[13]</sup>通过应用短期转染、核酸酶保护分析技术等方法对这一现象的原因进行了研究, 结果显示, HNF1与Sp I 的结合可能是主要原因. Raney *et al*<sup>[3]</sup>用转基因小鼠发现, 表达和不能表达HNF1的转基因小鼠, 对2.4 kb HBV RNA转录无明显的差别, 但不表达HNF1的转基因小鼠其HBV复制中间体较表达HNF1的转基因小鼠高2-4倍. 不表达HNF1的转基因小鼠, 其肝细胞中有cccDNA的表达, 而在表达HNF1的转基因老鼠的肝细胞中无表达. 提示, 由于HNF1的表达缺失, 表面抗原大蛋白表达下降, 病毒成熟障碍, 病毒使cccDNA重新返回肝细胞核. 因而, HNF1对表面抗原大蛋白的表达具有重要的调控作用. 进一步研究HNF1是对核心启动子的调控作用, Zheng *et al*<sup>[14]</sup>研究发现, HNF1对野生株核壳启动子无作用. 但在HBeAg(-)/抗-HBc(+)自然突变型HBV(在核启动子附近核激素受体RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ 结合位点有两个核苷酸替换A1764T, G1766A)时, 发现这种双突变株抑制前核心RNA转录, 但创造了HNF1结合区. Tang *et al*<sup>[2]</sup>在3T3细胞共转染pHBV 4.1 kb双突变株和HNF1表达质粒发现, HNF1能轻微增加3.5 kb RNA和病毒复制. 经核酸酶保护技术分析HNF1能轻微调节前基因组RNA和前核心RNA的比率, 且优先调节前基因组RNA. 因而增加了病毒复制模板水平, 降低前核心RNA编码的HBeAg水平. Cai *et al*<sup>[15]</sup>发现, 用Hela细胞复制乙肝病毒, 在加入hB1F和HNF1, 发现其病毒增加25倍. 同时发现hB1F和HNF1对增强子II有协同激活作用, 提示两种因子有协同作用.

总之, HBV感染在全球范围广泛流行, 仅HBV慢性携带者就达3.5亿人之多. HBV感染不仅可引起急性、慢性和重型肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生密切相关, 是严重危害人类健康的感染性疾病<sup>[19-21]</sup>. 肝富集转录因子对HBV的转录和复制具有重要调节作用. 因而通过改变各种肝富集转录因子的绝对和相对水平, 有可能起到干扰病毒复制的作用, 这为寻找抗HBV

### ■应用要点

深入研究肝富集转录因子不仅有利于进一步澄清HBV的嗜肝机制, 而且为寻找可能的抗病毒靶位点提供理论依据.

## ■同行评价

本文论述了肝富集转录因子对乙肝病毒转录与复制的调控,科学性较好,有一定的实际价值。

的治疗的新手段提供了新的思路和作用靶点。

## 4 参考文献

- 1 Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1841-1846
- 2 Tang H, Raney AK, McLachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture. *J Virol* 2001; 75: 8937-8948
- 3 Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001; 75: 2900-2911
- 4 Raney AK, Kline EF, Tang H, McLachlan A. Transcription and replication of a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is regulated *in vivo* by peroxisome proliferators. *Virology* 2001; 289: 239-251
- 5 Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A. Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspectives* 2001; 14: 325-334
- 6 Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-850
- 7 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 566-570
- 8 Huan B, Kosovsky MJ, Siddiqui A. Retinoid X receptor alpha transactivates the hepatitis B virus enhancer 1 element by forming a heterodimeric complex with the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Virol* 1995; 69: 547-551
- 9 Cirillo LA, McPherson CE, Bossard P, Stevens K, Cherian S, Shim EY, Clark KL, Burley SK, Zaret KS. Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J* 1998; 17: 244-254
- 10 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002; 76: 8572-8581
- 11 Banks KE, Anderson AL, Tang H, Hughes DE, Costa RH, McLachlan A. Hepatocyte nuclear factor 3beta inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2002; 76: 12974-12980
- 12 Raney AK, Easton AJ, McLachlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 10): 2671-2679
- 13 Chang HK, Ting LP. The surface gene promoter of the human hepatitis B virus displays a preference for differentiated hepatocytes. *Virology* 1989; 170: 176-183
- 14 Zheng Y, Li J, Ou JH. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *J Virol* 2004; 78: 6908-6914
- 15 Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003; 13: 451-458
- 16 Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3723-3732
- 17 Qian X, Costa RH. Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1184-1191
- 18 Hromas R, Costa R. The hepatocyte nuclear factor-3/forkhead transcription regulatory family in development, inflammation, and neoplasia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 20: 129-140
- 19 Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495
- 20 Moradpour D, Wands JR. Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 1092-1093
- 21 Ganem D. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 1026-1047

电编 张敏 编辑 王晓瑜

# microRNA表达谱与消化器官肿瘤的发生、诊断及治疗

李欣, 李小青, 黄士昂

李欣, 李小青, 黄士昂, 华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞中心/湖北省生物靶向治疗重点实验室 湖北省武汉市 430022

国家杰出青年基金资助项目, No. 30225038

通讯作者: 黄士昂, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞中心/湖北省生物靶向治疗重点实验室. sa2huang@hotmail.com

电话: 027-85726015

收稿日期: 2007-02-08 接受日期: 2007-02-21

## MicroRNA profiles and initiation, diagnosis and treatment of cancers in digestive organs

Xin Li, Xiao-Qing Li, Shi-Ang Huang

Xin Li, Xiao-Qing Li, Shi-Ang Huang, Stem Cell Center, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Key Laboratory for Bi-targeted Therapy of Hubei Province, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars, No. 30225038

Correspondence to: Shi-Ang Huang, Stem Cell Center, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Key Lab for Bi-targeted Therapy of Hubei Province, Wuhan 430022, Hubei Province, China. sa2huang@hotmail.com

Received: 2007-02-08 Accepted: 2007-02-21

## Abstract

MicroRNA (miRNA) is a kind of small non-coding RNA containing 21 to 23 nucleotides in length that down-regulates gene expression during various crucial cell processes such as development, proliferation, differentiation and apoptosis. Recent studies supported an important role of miRNA in the initiation and progression of human malignancies. Some miRNAs may function as oncogenes or tumor suppressors. It is found that several miRNAs are directly involved in human cancers of digestive organs, including liver, colon, stomach, pancreas and bile duct. In addition, miRNA expression profiling of tumors in digestive organs has identified signatures associated with diagnosis, staging, progression, prognosis and response to treatment. Profiling has also been exploited to identify miRNA genes that might represent downstream targets of ac-

tivated oncogenic pathways, or target protein coding genes involved in cancer. Moreover, miRNA-mediated therapy may be a powerful tool for cancer prevention and therapy.

**Key Words:** MicroRNA; Expression profile; Tumor; Digestive organ

Li X, Li XQ, Huang SA. MicroRNA profiles and initiation, diagnosis and treatment of cancers in digestive organs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1241-1245

## 摘要

microRNA (miRNA) 是一种大小约21-23个碱基的、非蛋白编码单链小分子RNA, 下调参与许多重要细胞活动(包括发育、增殖、分化、凋亡)基因的表达。近期的研究发现, miRNA在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用, miRNA具有癌基因和抑癌基因的作用。已发现若干miRNA直接参与消化器官(包括肝、结肠、胰腺、胃、胆管)肿瘤的发生和发展, miRNA表达谱与消化器官肿瘤的诊断、病理分级、临床分期、疾病进展、预后和对治疗的反应性等相关。miRNA表达谱可以鉴定能抑制下游活化的癌基因信号途径或作用于与肿瘤发生和发展有关的蛋白编码基因的miRNA靶基因, miRNA介导的治疗还可能用于肿瘤的预防和治疗。

**关键词:** microRNA; 表达谱; 肿瘤; 消化器官

李欣, 李小青, 黄士昂. microRNA表达谱与消化器官肿瘤的发生、诊断及治疗. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1241-1245  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1241.asp>

## 0 引言

microRNAs (miRNAs)是动植物中基因组编码的类似siRNA的、一种大小约21-23个碱基的非蛋白编码单链小分子RNA, 是由具有发夹结构的、约70-90个碱基大小的单链RNA前体经过Dicer酶加工后生成, 通过与靶基因序列特异性相互作用来调节基因表达水平. miRNAs表达模式具有分化的位相性和时序性, 提示miRNAs有

## ■背景资料

消化器官肿瘤(包括肝、结肠、胰腺、胃、胆管)是严重危害人民生命健康的最主要恶性肿瘤。深入了解miRNAs参与消化器官肿瘤发生和发展的机制, 将有助于消化器官肿瘤的“早期发现、早期诊断、早期治疗”。



## ■ 研发前沿

在分子水平上消化器官肿瘤的发生和发展是一个多因素、多步骤、多基因综合作用的过程,多个癌基因和抑癌基因参与了该过程,目前的研究初步发现,癌基因和抑癌基因受miRNAs的调控。该领域的研究重点已从研究癌基因和抑癌基因的作用机制转移到研究miRNAs在消化器官肿瘤中的表达,继之到研究在miRNAs调控下,癌基因和抑癌基因在消化器官发生和发展的作用机制。

可能作为参与调控基因表达的分子,因而具有重要意义<sup>[1-4]</sup>。miRNAs参与生命过程中一系列的重要进程,包括早期发育、细胞增殖、分化、凋亡、死亡、脂肪代谢。近期的研究还发现,不同类型的肿瘤有不同组合的表达异常的miRNA表达谱,提示肿瘤miRNA表达谱具有组织特异性;肿瘤miRNA具有癌基因和抑癌基因的作用;多个miRNA与肿瘤的发生、病理分级、临床分期,肿瘤的激素状态及激素分泌,肿瘤的耐药性及预后等相关。现将近年来miRNA表达谱与消化器官肿瘤的相关研究进展作一综述。

### 1 miRNA表达谱和结肠癌

结直肠癌的发生和发展与其他肿瘤一样是一个多阶段、多基因突变积累的过程,APC, p53, DCC, K-ras等参与其中;这些基因中有些是结肠癌特有的或多见的,有些是多种肿瘤共有的<sup>[5]</sup>。新近的研究发现,miRNA在结肠癌中的表达也有类似现象。比较了miRNA在15株人结肠癌细胞系、1株正常人结肠细胞系,结直肠癌及其邻近非肿瘤组织的表达后,发现13个miRNA的表达有差异<sup>[6]</sup>: miR-133b, -145, -129, -124a, -30-3p, -328, -19a, -20, -21, -183, -96, -31, -135b;其中miR-133b, -145, -183, -96, -31, -135b表达的差异性最明显,miR-133b和-145的表达水平降低,其余4个miRNA的表达水平升高。miR-31在人结肠癌细胞系、结直肠癌样本的表达水平高于非肿瘤组织,miR-31在IV期结直肠癌的表达水平高于II期结直肠癌。在人结肠癌和人结肠癌细胞系均可检测到低水平的let-7表达,将let-7a-1前体miRNA转染入DLD-1人结肠癌细胞株细胞,可观察到剂量依赖性生长抑制作用,let-7a-1在翻译水平明显抑制C-myc, RAS蛋白的表达<sup>[7]</sup>。在结直肠癌和其他器官肿瘤细胞中可检测到miR-143, -145的低表达<sup>[8]</sup>。而let-7与RAS之间平衡被影响的程度与肿瘤发生和肿瘤生存相关<sup>[9]</sup>。

### 2 miRNA表达谱和胆管癌<sup>[10]</sup>

在3株来源不同的胆管癌细胞系、1株非肿瘤胆管细胞系H69细胞系中表达均升高(或均降低)的miRNA有: let-7a-1, -7c, -7f-2, miR-21, -320, -16-1(或let-7b, miR-326, -351, -373, -150)。这些组织特异性miRNA可作为胆管细胞系列的标记物。由于以上4株细胞系的来源不同,因此其miRNA表达谱既有相同处,也有不同处。与H69细胞系相比较,miRNA在3株癌细胞系的表达水

平普遍较低,有5个miRNA表达较高: miR-200b, -21, -23a, -141, -27a, 提示这些miRNA在恶性转化过程中发挥作用;表达较低的有: miR-125, -31, -95。这些组织特异性miRNA也可能用于诊断分析。miR-21, -200b还可能通过调节化疗药物诱导的凋亡而导致肿瘤细胞耐药性。并观察了以上3个miRNA对各自预测靶基因的作用。

### 3 miRNA表达谱和胰腺癌

比较了201个miRNA前体(代表222个miRNA)在9株人胰腺癌细胞系、28例胰腺癌、15例邻近非肿瘤组织、4例慢性胰腺炎组织中的表达,发现有112个miRNA前体表达异常。在表达异常排名前20位中表达升高的miRNA前体有: miR-221, -424, -301, -100, -376a, -125b-1, -021, -016-1, -181a, c, -092-1, -015b, -155, -212, -107, -024-1, 2, let-7f-1, let-7d, 表达降低的miRNA前体有miR-345, -142-p, -139<sup>[11]</sup>。该结果与Volinia的结果相近(表1)<sup>[12]</sup>,但Lu的结果提示,miRNA在胰腺癌中的表达普遍降低<sup>[13]</sup>。与胰腺癌发病相关的、最常见的、表达异常的癌基因是K-ras和cyclin D1及抑癌基因是p53, p21, p16, p27和SMAD4/DPC4<sup>[14]</sup>,也有人发现了一些与胰腺癌有关的新基因<sup>[15]</sup>,目前尚无这些基因与其上游miRNA在胰腺癌发病中作用机制的研究报道。

### 4 miRNA表达谱分类和肿瘤分类

目前,基因芯片技术已广泛应用于肿瘤研究中。应用基因芯片技术可发现与肿瘤有关的基因,对肿瘤进行分类,分析肿瘤药物敏感性、耐受性谱和与临床治疗的相关性,可用于肿瘤的靶向治疗<sup>[16]</sup>;miRNA芯片技术挑战了传统的DNA和RNA芯片技术。对来自6种器官(乳腺、结肠、肺、胰腺、前列腺和胃)的共540个样本(363个肿瘤样本/177个相应的正常组织样本)的miRNA表达谱进行了分析,所用的芯片可检测228个miRNA<sup>[12]</sup>。结果提示,有137个(60%) miRNA在近90%的样本中有表达;43个miRNA的表达有差异(肿瘤/相应邻近的正常组织),其中26个miRNA的表达水平升高,17个miRNA的表达水平降低;miRNA在结肠(肿瘤/相应邻近的正常组织)的表达升高/降低为21/1、胰腺为39/6、胃为22/6。miRNA在以上6种肿瘤样本表达升高的有: miR-21, 在5种肿瘤中表达升高的有: miR-17-5p, -191, 在4种肿瘤中表达升高的有: miR-29b-2, 223, 在3种肿瘤中表达升高的有: miR-

表 1 在结肠、胰腺、胃肿瘤中表达升高的miRNA

结肠	miR-21, -17-5p, -191, -29b-2, -223, -128b, -24-1, -24-2, -155, -20a, -107, -32, -30c, -221, -106a
胰腺	miR-21, -17-5p, -191, -29b-2, -223, -128b, -199a-1, -24-1, -24-2, -146, -181b-1, -20a, -107, -32, -92-2, -214, -30c, -25, -221, -106a
胃	miR-21, -191, -223, -24-1, -107, -92-2, -214, -25, -221

128b, -199a-1, -24-1, -24-2, -146, -155, -181b, -20a, -107, -32, -92-2, -214, -30c, -25, -221, -106a; 至少在3种肿瘤中表达升高的miRNA列于表1.

### 5 miRNA表达谱和肝癌

肝癌的发生与多个癌基因与抑癌基因及其产物的表达及结构异常有关, 与肝癌有关的癌基因有C-myc, N-ras, IGF-II, C-erbB2, C-fos, Bcl-2, C-ets2等, 与肝癌有关的抑癌基因有p53, Rb, p16 INK4, DCC, MCC, APC等. 与肝癌有关的癌基因的激活是肝癌发生的关键步骤, 而癌基因的激活是多种因素作用的结果. 其中的C-myc激活与肝癌的发生直接相关, 并发现通过灭活C-myc能逆转肝癌的癌变过程<sup>[17]</sup>. 近年来发现miRNA在肝癌的表达也有异常. 与肝癌周边正常组织相比较, miRNA在肝癌组织内表达水平升高的有: miR-18, pre-miR-18, miR-224, 表达水平降低的有: miR-199a\*, -199a, -195, -125a, -200a. miR-92, -20, -18, pre-miR-18的表达水平在分化良好的肝癌组织中最低, 在分化较差的肝癌组织中最高; 而miR-199a的表达水平与分化程度是正相关. miR-18, -20, pre-miR-18在肝癌组织中的表达水平高于非肿瘤样本<sup>[18]</sup>. 同时, 比较了12例慢性肝炎与14例肝纤维化的miRNA芯片检测结果, miRNA在前者表达水平较高的有: miR-182, -224, -156, pre-miR-199b; 在后者表达水平较高的有: miR-28, -342, -126, -199a, -145b, -434, -368, pre-miR-372; 这10个miRNA和2个前体miRNA调控与感染和纤维化相关的基因. 乙肝、丙肝患者miRNA的表达水平无差异性. 以上信息可以帮助了解肝病发生、发展的分子学机制, 可以作为原发性肝细胞癌的诊断工具. 在此, miR-199a的表达水平在正常肝组织中较高、在慢性肝炎中较低、在肝纤维化中较高、在肝癌组织中较低, 且miR-199a的表达水平与分化程度正相关<sup>[18]</sup>. 如同mRNA一样, 大多数的miRNA的表达具有组织特异性, 有些miRNA在某些组织中富集, 这与他们在这些组织的发育中发挥着一定的作用有关. 给Fisher小鼠喂食缺

乏甲基的食物(FMD)36 wk后, Fisher小鼠肝脏出现癌前病变; 喂食54 wk后, Fisher小鼠肝脏出现癌变. 与正常肝组织相比, 在Fisher小鼠肝癌组织中有9个miRNA (miR-101b-2, -130, -130a, -172a-2, -219-1, -23a, -23b, -24, -328-1)的表达水平升高, 有3个miRNA(miR-122, -123, -215)的表达水平降低. 在小鼠肝癌移植模型、50%人肝癌样本(10/20)、人和小鼠肝癌细胞系中, miR-130, -23表达水平升高, miR-122的表达水平降低<sup>[19]</sup>; 在FMD诱导的小鼠肝癌中, c-myc的表达亦升高. miR-122是一个调节肝脏发育的“肝特异性miRNA”. 在受精卵置入小鼠后12.5 d即可检测到其表达; 其表达水平在出生前达到平台期, 在出生后以一种相当缓慢的方式升高, 提示miR-122还参与调节肝脏的分化. 应用miR-122的反义寡聚核苷酸后, 肝脏功能受损, 胆固醇合成降低, 提示miR-122在维持肝脏正常功能上起着重要作用<sup>[20]</sup>. miR-122通过与丙肝病毒基因组5'-非翻译区相互作用调节丙肝病毒的表达; 当miR-122被灭活, 丙肝病毒复制及其蛋白表达明显降低<sup>[21]</sup>.

miRNAs和MYC的表达增加有着紧密联系, 并可导致B细胞的恶性增殖. MYC可以诱导E2F1和miR-17-92基因簇的转录, 而这些miRNAs可以抑制E2F1的翻译. 因此, 在MYC存在的情况下, miR-17-92基因簇中的miRNAs限制了E2F1的活性, 通过阻断MYC和E2F1的正反馈循环削弱了MYC对于细胞增殖的影响. 在这一模型中, miR-17-92基因簇所起的作用是抑癌基因的作用<sup>[13]</sup>, 这与He的发现是相反的<sup>[22]</sup>; 与这一模型一致的是, 在肝癌中也有编码mir-17-92的13q31位点的丢失. 然而, 尽管E2F1可以促进细胞增殖, 但是当E2F1的表达水平超过一定的阈值, 其也可以引起凋亡. 在此情况下, miRNAs对于E2F1的负调控可能是通过阻断E2F1的诱导凋亡活性, 促进MYC介导的细胞增殖, 支持了He提出的模型<sup>[22]</sup>. 以上简明阐述了MYC, miR-199a, miR-122和mir-17-92基因簇在慢性病毒性

### ■创新盘点

本文在总结了miRNA表达谱与消化器官肿瘤相关性研究的基础上归纳了结肠癌、胰腺癌、胃癌独特的表达异常miRNA组合, 提示肿瘤miRNA表达谱具有组织特异性; 对miRNA在肝癌发生中的作用作了较详尽的叙述.

## ■同行评价

本文介绍了miRNA表达谱与消化系统肿瘤关系的研究进展,内容较新颖,有较高的指导意义。

肝炎、肝纤维化、肝癌中的作用。

miR-17-92基因簇的抑癌基因和癌基因的多重特点表明了肿瘤发生的复杂性和miRNAs调控基因表达的复杂性。这些结果也反映出单个的miRNA可以控制许多不相关的靶基因,导致其可以控制细胞增殖和细胞分化等相反的细胞活动。miR-17-92基因簇起抑癌基因和癌基因的作用可能依赖于表达这些miRNA的细胞类型和将受到调控的mRNA所位于的组织特异性靶基因有关。

## 6 小结

**6.1 miRNA表达谱与肿瘤发生**<sup>[1-4,23]</sup> 肿瘤是在多种外界致癌因素作用于多个基因、经多个步骤而发生的。miRNA在肿瘤发生中的作用补充、丰富了肿瘤的发生机制。miRNA在肿瘤组织及其相应邻近正常组织的差异性表达是分析miRNA表达谱的基础,差异性表达升高者为癌基因性miRNA,差异性表达降低者为抑癌基因性miRNA。一个或多个抑癌基因性miRNA的表达降低,导致癌基因激活,如低表达的let-7与高表达的RAS, miR-15a, -16-1与BCL-2;一个或多个癌基因性miRNA的表达升高,导致抑癌基因灭活,如高表达的miR-221, -222与低表达的Kit。提示异常的miRNA表达可能导致细胞去分化,引起肿瘤发生。miRNA与靶基因的相互作用不是简单的一个miRNA调节一个靶基因或一个靶基因受一个miRNA的调节。应用生物信息学技术预测在转录后或翻译水平,一个miRNA可调节数百个靶基因,一个靶基因受数个或数十个miRNA的调节(登录<http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/targets/v4/>或<http://www.microrna.org>);如通过检索发现hsa-miR-509有561个靶基因,其中的靶基因SMAD2受34个miRNAs的调节。这种作用特点既非常有意义,也极其复杂。目前的研究主要集中在分析miRNAs在消化器官及其他器官肿瘤中的表达,有关miRNA与其对应靶基因作用关系的研究报道为数不多。对miRNA的功能分析(即miRNA作用于那个或那些癌基因或抑癌基因)是以后的研究热点。

**6.2 miRNA表达谱可能帮助肿瘤诊断**<sup>[1-4,24]</sup> miRNA表达特征被用来对肿瘤进行分类,如本文中的表1提示肿瘤miRNA表达谱具有组织特异性;这有助于肿瘤的诊断,尤其有助于分化较差的肿瘤、来源不明的肿瘤的鉴别诊断。如应用miRNA芯片对分化良好的11类、68例肿瘤样

本进行了miRNA表达的分类;在此基础上,用miRNA芯片对17例分化不良的肿瘤进行了诊断,其正确例数为12/17;而4 a前用含16 000个编码蛋白基因的mRNA芯片分析了该17例分化不良的肿瘤,其表达谱分类正确的例数仅为1/17。以上提示miRNA芯片在肿瘤诊断上远远优于mRNA芯片,并能确定那些可以用来估计预后的miRNA。

**6.3 miRNA表达谱与肿瘤治疗**<sup>[25-28]</sup> miRNA相关的肿瘤基因治疗不外乎引入(knock-in)抑癌基因性miRNA,敲除(knock-out)或敲减(knock-down)癌基因性miRNA。将来,引入与具有癌基因特性miRNA互补的合成反义寡聚核苷酸(抗miRNA寡聚核苷酸, AMOs)可有效地灭活肿瘤中的miRNAs,延缓其生长。使用antagomirs(与胆固醇偶联的AMOs)注射小鼠后可以在不同器官有效抑制miR-16, miR-122, miR-192和miR-194的活性,因而可能成为一种有希望的治疗药物。临床上,可以通过经常的或者持续的2'-O-甲基化或者锁定核酸(LNA)等修饰的反义寡聚核苷酸给药使miRNA失活。这些修饰使得寡核苷酸更稳定,比其他治疗手段毒性更低。相反的,过表达那些具有肿瘤抑制基因作用的miRNAs,如let-7家族也可以用于治疗某些特定的肿瘤。利用病毒或者脂质体的表达系统可以瞬时引入大量miRNAs。这些技术可以保证在某些组织特异性的启动子控制之下,表达pre-miRNA及其两侧序列,并且刺激内源性的miRNA加工,产生正确的miRNA,抑制特定基因表达。然而,利用这种类似于用于肿瘤治疗的siRNAs方法,免疫反应可能会限制miRNA的有效运送。miRNA治疗从实验室到临床应用的过程中,还需要进一步的发展这些方法。抑癌基因性miRNA或癌基因性miRNA的寡聚核苷酸抑制剂与化疗(或放疗)联合应用将能提高抗肿瘤疗效。

## 7 参考文献

- 1 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- 2 Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353: 1768-1771
- 3 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- 4 Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006; 94: 776-780
- 5 Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003; 2: 41

- 6 Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzo M, Garcia-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
- 7 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 903-906
- 8 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 9 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 10 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 11 Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1046-1054
- 12 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2257-2261
- 13 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- 14 Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2213-2236
- 15 Jin G, Hu XG, Ying K, Tang Y, Liu R, Zhang YJ, Jing ZP, Xie Y, Mao YM. Discovery and analysis of pancreatic adenocarcinoma genes using cDNA microarrays. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6543-6548
- 16 Wulfkühle J, Espina V, Liotta L, Petricoin E. Genomic and proteomic technologies for individualisation and improvement of cancer treatment. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2623-2632
- 17 Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop JM, Contag CH, Felsher DW. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431: 1112-1117
- 18 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
- 19 Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 2006; 99: 671-678
- 20 Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004; 1: 106-113
- 21 Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309: 1577-1581
- 22 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-833
- 23 Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12
- 24 Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 2006; 25: 6220-6227
- 25 Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* 2006; 13: 496-502
- 26 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-689
- 27 Hammond SM. MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med* 2006; 12: 99-101
- 28 Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 819-829

电编 张敏 编辑 王晓瑜



# 与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展

崔建军, 曾 争, 田国保, 田 地, 陆海英

## ■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染是世界范围的严重公共卫生问题, 感染后, 疾病的发生、发展及不同临床转归除与病毒因素、环境因素有关外, 宿主的免疫遗传因素, 即宿主的抗病毒免疫(或炎症)相关基因的多态性发挥了重要作用, 寻找所有相关基因的多态性对理解疾病的发生机制及预防、治疗有重要意义。

崔建军, 田国保, 田地, 北京大学第一医院感染疾病科病毒研究室 北京市 100034  
曾争, 陆海英, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034  
国家自然科学基金资助项目, No. 30671855  
美国国家癌症研究所(NCI)资助项目, N01-CO-12400  
通讯作者: 曾争, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科, zeng@bjmu.edu.cn  
电话: 010-66551799 传真: 010-66551799  
收稿日期: 2007-01-21 接受日期: 2007-03-06

## Advance in genetic factors influencing hepatitis B virus infection

Jian-Jun Cui, Zheng Zeng, Guo-Bao Tian, Di Tian, Hai-Ying Lu

Jian-Jun Cui, Guo-Bao Tian, Di Tian, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China  
Zheng Zeng, Hai-Ying Lu, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30671855, and the Fund from the National Cancer Institute of United States, N01-CO-12400  
Correspondence to: Zheng Zeng, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China. zeng@bjmu.edu.cn  
Received: 2007-01-21 Accepted: 2007-03-06

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major global health problem. A complex combination of environment and virus, especially host genetic factors, play a critical role in determining both susceptibility to HBV persistence and different clinical outcomes after HBV infection. In this review, we summarized the main relevant genes such as human leukocyte antigen (HLA), tumor necrosis factor (TNF), interleukins (ILs), interferons (IFNs), etc. However, in order to identify all the relevant polymorphisms that affect the outcome of HBV infection, alternative strategies such as genome-wide association studies with large sample sizes are required to define the majority of the related genes.

Key Words: Genetic factors; Hepatitis B virus; Advance

Cui JJ, Zeng Z, Tian GB, Tian D, Lu HY. Advance in

genetic factors influencing hepatitis B virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1246-1251

## 摘要

乙型肝炎病毒(HBV)感染是世界范围的严重公共卫生问题之一。HBV感染后, 机体对病毒的清除能力以及疾病的进展和不同临床转归, 除了与病毒因素和环境因素有关外, 在很大程度上取决于个体间基因组的差异。本文就近年来与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展及研究中存在的问题作一综述, 主要包括影响机体免疫应答的基因、人类白细胞抗原(HLA)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)等, 同时对这一领域的研究前景作一展望。

关键词: 遗传基因; 乙型肝炎病毒; 研究进展

崔建军, 曾争, 田国保, 田地, 陆海英. 与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1246-1251

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1246.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是导致慢性乙型肝炎、肝硬化和肝细胞癌的重要原因, 全世界慢性HBV感染者约3.85亿, 其中每年约75万人死于HBV感染相关的肝脏疾病。乙型肝炎的发病除了与病毒因素(病毒含量、基因型、亚型及病毒变异造成的基因组<sup>[1]</sup>的差异等)、环境因素(如暴露人群的整体卫生状况、疫苗接种状况等)有关外, 宿主本身, 尤其是免疫遗传因素也发挥了相当重要的作用<sup>[2-4]</sup>, 也就是说宿主的抗病毒免疫(或炎症)相关基因的多态性在很大程度上决定了其感染HBV后的病情进展及结局。近些年国内外对此项的研究取得了一定的成果, 但也存在一些问题, 下面就对其研究现状和发展前景作一综述。

## 1 宿主遗传因素与HBV感染的关系

### 1.1 人类白细胞抗原 人类白细胞抗原(human

leucocyte antigen, HLA)基因系统是迄今所知最复杂、多态性最高及首个被发现与疾病有明确关系的人类遗传系统<sup>[5]</sup>, 位于第6号染色体短臂(6p21.31), 约3.6 Mb. 主要由HLA- I类基因(HLA-A, B, C, E, F, G, H, J等)、II类基因(HLA-DR, DP, DQ, DM, DO等)及III类基因(HLA-c2, Bf, c4A, c4B等)组成<sup>[6]</sup>, 具有抗原递呈、活化淋巴细胞、启动特异性免疫应答等功能. 某些位点的等位基因超过300个, 具有高度的遗传多态性, 这些多态性可能影响免疫应答和抗原肽的呈递, 进而造成机体免疫功能状态的差异. 而HBV感染后急性期病毒清除与机体强的特异性免疫应答密切相关, 因此, HLA等位基因多态性与HBV持续感染及清除过程密切相关.

**1.1.1 HLA- I类基因** HLA- I类分子以膜抗原形式广泛存在于人体有核细胞表面, 编码糖蛋白. 特异性CTLs(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)识别肝细胞表面与HLA结合的抗原多肽后, 通过裂解或凋亡途径来清除感染的肝细胞<sup>[7]</sup>. 正常人肝实质细胞基本不表达或仅微量表达HLA- I类分子, 在急性HBV感染者和抗-HBs血清阳性者中表达明显增加, 而在慢性HBV感染者中却很少检测到, 提示慢性HBV感染者的HLA- I类分子的表达可能和HBV的清除有关. 对Qatari人成人的小样本研究提示, D7基因是乙型肝炎病毒的易感基因, 而D2基因则具有抵抗作用<sup>[8]</sup>; A\*0301与病毒的清除有关, B\*08, B\*44, C<sub>w</sub>\*0501, C<sub>w</sub>\*1601以及彼此组成的单体型B\*44-C<sub>w</sub>\*1601, B\*44-C<sub>w</sub>\*0501, B\*44-DRB1\*0701, B\*44-C<sub>w</sub>\*1601-DRB1\*0701, A\*0101-B\*08-DQA1\*0501-DQB1\*0201-DRB1\*0301与病毒持续感染有关的结论则在是对高加索人群的大样本研究中发现<sup>[9]</sup>. 对中国不同地区汉族人口研究显示, B\*54<sup>[10]</sup>和B\*35参与病毒的清除, 而B\*55, B\*71, B\*74及A\*02<sup>[11]</sup>则参与病毒的感染; 但关于B\*35的作用却和对台湾部分汉族人群的研究结果存在分歧<sup>[12]</sup>, 后者对422个患者的较大样本进行研究, 得出B\*35与病毒的感染密切相关, 产生这种现象的原因与样本量及样本遗传背景本身有关.

**1.1.2 HLA- II类基因** 表达于淋巴样组织中的各种细胞表面, 参与外源性抗原呈递, 与CD4<sup>+</sup>T细胞的活化有关. 与持续HBV感染相比, 急性HBV感染后, CD4<sup>+</sup>T细胞增殖反应明显增强, 提示HLA- II类分子与HBV感染后的结局密切相关. (1)HLA-DQ. 对非洲小样本的美国士兵研究

显示<sup>[13]</sup>, HBV的持续感染不仅与DQA1\*0501, DQB1\*0301密切相关, 而且与其组成的单体型DQA1\*0501-DQB1\*0301, DQA1\*0501-DQB1\*0301-DRB1\*1102呈显著正相关( $P<0.01$ ). 此结果与国内对重庆汉族52例慢性乙型肝炎患者、30例急性乙型肝炎患者和106例健康对照者的研究一致<sup>[14]</sup>, 并且后者研究还发现DQA1\*0301与慢性乙型肝炎的易感性呈负相关, 此基因的抗性基础可能是因其多态性能够影响HLA分子、抗原和T细胞受体之间的相互作用, 从而控制对外来抗原的免疫应答. 对韩国HBV感染人群中HLA-DQB1等位基因多态性与HBV感染之间关系的研究发现, HLA-DQB1\*0402、DQB1\*0604等位基因对韩国人群慢性HBV感染具有保护作用<sup>[15]</sup>. DQA1\*0102, DQB1\*0602是HBV的拮抗基因, 而DQA1\*0201, DQA1\*0302, DQB1\*0302, DQB1\*0305, DQB1\*0501对HBV的感染起促进作用, 这已由对中国各地区人口的研究<sup>[16]</sup>给予证实; (2)HLA-DR. HLA-DRB1\*1301/1302与HBV感染的自发清除有关, 这首先由Thursz *et al*<sup>[17]</sup>对冈比亚人群的研究发现, 随后这一结果在韩国<sup>[15]</sup>、德国<sup>[18]</sup>、高加索<sup>[9]</sup>以及中国人群的研究中陆续得到证实. 体外研究显示<sup>[19]</sup>, 和HLA-DR13<sup>+</sup>的个体相比, HLA-DR13<sup>+</sup>个体的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞对乙肝病毒HBcAg产生更强的免疫应答, 这种现象可能是HLA-DR13分子本身具有较强的抗原提呈能力, 或是HLA-DR13与其临近的某个免疫调节性基因具有连锁不平衡. HLA-DR13可能赋予个体较强的抗感染能力, 然而, HLA-DR13在东方人中的分布频率比白种人和黑种人都低, 这或许是东方人更易患慢性乙型肝炎的原因之一. 在HLA-DRB1的研究中还发现<sup>[20]</sup>, DRB1\*0301, DRB1\*06, DRB1\*07, DRB1\*08等能加速HBV的感染, 而DRB1\*0403, DRB1\*12, DRB1\*15等则发挥拮抗作用. 其中也存在一些差异: 如Jiang *et al*<sup>[14]</sup>研究显示, HLA-DRB1\*1101/1104和HBV清除有关, 与对韩国人群的研究结果相反, 这种现象进一步提示样本量和所选人群对研究有影响<sup>[15]</sup>; (3)HLA-DP. HLA-DP同样是HLA-II类基因中的重要组成部分, 具有高度多态性, 但目前国内外对其报道较少. 对广州地区乙型肝炎患者研究发现<sup>[21]</sup>, 广州地区HBV感染与HLA-DPB1无相关性. 这一结果可能是DP与HBsAg抗原决定簇的递呈无关, 或是DP的多态性对HBsAg抗原决定簇的递呈无特异性.

#### ■研发前沿

近年来, 免疫相关基因多态性与宿主HBV感染易感性或拮抗性方面的研究一直是热点, 研究范围也已从经典的HLA(I类和II类)、细胞因子(如TNF, IL-10等)和某些蛋白(AGT, CTLA4, TAP, Mx等)等单基因与疾病相关性转到基因传导通路(pathway)及全基因组扫描大规模研究.

## ■相关报道

由于选择人群的种族、样本量大小、病例-对照的设计方案、研究方法不同及是否综合考虑病毒因素等原因,研究结论不尽一致,这在对HLA-I, HLA-II和TNF- $\alpha$ 的研究中都有相关报道,因此常见疾病与宿主遗传因素的关联研究需要大样本及严格的样本选择标准和排除标准。

1.2 细胞因子 细胞因子是由各种细胞分泌的具有介导和调节天然与特异性免疫应答、抗感染、参与炎症等功能的小分子可溶性蛋白。研究表明<sup>[22]</sup>,细胞因子编码区、调节区或信号序列的多态性可影响细胞因子的表达及功能。

1.2.1 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) TNF是一种促炎因子,具有介导多种炎症反应和免疫调节等作用,适量TNF- $\alpha$ 在维持机体内环境稳定以及抵抗外来微生物入侵中发挥重要作用。HBV感染后, TNF一方面调控HLA-II类分子的病毒抗原提呈作用,另一方面则直接通过激活NF- $\kappa$ B通路破坏HBV壳体的完整性而抑制HBV DNA的复制和蛋白表达<sup>[23]</sup>。TNF- $\alpha$ 基因位于人类第6号染色体HLA-III类基因簇内(6p21.3),其启动子区存在5个典型的单核苷酸多态性(SNPs),分别是-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A, -238G/A, 这些SNPs可能通过影响转录活性而使其表达水平不同<sup>[24]</sup>。对德国人群中TNF- $\alpha$ 启动子区多态性分析显示<sup>[25]</sup>, -238位核苷酸变异(由G变成A)与HBV感染慢性化有关,而在日本人群中研究<sup>[26]</sup>相同位点却未发现两者相关,这或许是由于两者选择的研究人种或是病例-对照组设计不同所致。另外,通过对韩国样本5个典型SNPs位点研究表明<sup>[27]</sup>, TNF- $\alpha$ -308位点A等位基因的存在或-863位点A等位基因的缺失促使HBV的长期携带,这可能和TNF- $\alpha$ -308(G替换成A后)更易和转录因子复合物结合有关(尽管G等位基因也可与转录因子复合物结合)。还有研究发现<sup>[28]</sup>, TNF- $\alpha$ (-857T/T, -1031C/C)位点以及由5个SNPs位点组成的单体型TNF- $\alpha$ (GGTAT), TNF- $\alpha$ (GGCAT)和乙型肝炎的感染密切相关,提示在研究疾病遗传因素过程中,不仅是SNPs,单体型信息同样影响着疾病的发生和发展。

1.2.2 白细胞介素(interleukin, IL) IL是一种多功能免疫调节因子,在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节过程中发挥重要作用。在以日本人群为对象研究IL-10基因启动子-1082, -819和-592位点多态性过程中发现, 3个位点组成的ATA单体型在无症状HBV携带者组中的频率(77%)明显高于慢性乙型肝炎组(65%)和肝硬化组(61%),得出IL-10启动子基因位点多态性直接关系到HBV感染后的病情严重程度<sup>[26]</sup>。而对韩国和中国的人群调查时,共同得出: IL-10(-592A)和(-592C)基因位点对HBV感染分别起促进和抑制作用<sup>[29-30]</sup>。除IL-10外,还有研究发现IL-1 $\beta$ -511(C/C)及白细胞介素-1受体拮抗基因(IL-

1RN)抑制HBV感染<sup>[31-32]</sup>; IL-2(-330T/G)对HBV感染具有促进作用<sup>[33]</sup>。研究中有阴性结果, Park *et al*<sup>[34]</sup>对IL-6基因-572 G/C基因型在慢性乙肝患者与肝硬化患者之间,以及HBV感染所致的肝癌与慢性HBV感染的非肝癌患者之间分布频率进行研究,并未发现差异。

1.2.3 干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) IFN- $\gamma$ 已作为临床治疗肝炎的常用药物, IFN- $\gamma$ 通过经典的JAK-STAT途径<sup>[35]</sup>、丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径<sup>[36]</sup>以及磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI-3K)途径<sup>[37]</sup>,抑制病毒复制与扩散,并调动机体的免疫调节功能(如增强感染的肝细胞表达被T淋巴细胞识别的蛋白质,帮助T细胞识别病毒感染的细胞等)发挥抗病毒作用。IFN- $\gamma$ 基因具有6个多态性位点,通过改变转录因子结合位点而影响IFN- $\gamma$ 表达,进而影响其抗病毒作用。其中, Ben-Ari *et al*<sup>[38]</sup>体外实验显示,在IFN- $\gamma$ 第一内含子区+874位点携带A/A等位基因的个体, IFN- $\gamma$ 水平较低,易发展为慢性HBV感染,这在我国多项研究<sup>[39-40]</sup>中都有证实(有些是和宫内HBV感染有关)。而且,对IFN- $\gamma$ 启动子区(-183G/T)和(-155A/G)位点多态性研究<sup>[41]</sup>(367例)还发现, IFN- $\gamma$ 启动子(-183T)等位基因的存在,促进HBV感染( $OR = 4.5, P < 0.01$ ),而且随着年龄的增长, $OR$ 值增大。

1.2.4 其他基因 研究显示,雌激素受体- $\alpha$ (ESR- $\alpha$ )<sup>[42-43]</sup>29 T/T基因型的个体与至少含一个29C等位基因的个体相比, HBV持续感染显著增加( $P < 0.001$ );转化生长因子 $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)的启动子-509(C/C),可以加速HBV感染,而关于第10位密码子变异导致的编码氨基酸转换造成的多态性(codon10T/C)的作用,国内外研究得出相反的结论,提示我们进一步考虑种族遗传因素<sup>[44-47]</sup>;钙依赖性的C型凝集素(MBL)作为一种影响天然免疫的调理素存在于人体内,其在第52, 54位密码子的突变,使机体HBV感染的结果不同,这在国内外都有研究<sup>[48-51]</sup>;低分子量蛋白酶体(LMP)基因位于HLA-II类基因区,编码的LMP2和LMP7蛋白以二聚体形式进行抗原肽水解,参与HLA-II类分子的抗原呈递,在探讨LMP2和LMP7基因多态性与HBV感染易感性的关联研究<sup>[52]</sup>中,发现LMP7-Codon145位点多态性在正常人群与HBV感染者之间的分布频率差异有统计学意义,提示多态性可能限制了LMP的正常作用,而使HBV逃避免疫监视,致使感染发生。

目前, 关于遗传多态性的研究已经成为研究乙肝发病机制的重点, 而且不断有新的细胞因子发现, 维生素D<sup>[53-55]</sup>、趋化因子<sup>[56-57]</sup>、某些蛋白<sup>[58-63]</sup>和酶<sup>[64-66]</sup>也列入其中, 为研究HBV感染的发病机制开拓了思路。

## 2 问题及展望

近年来, 与HBV感染相关的基因位点不断被发现, 但相同的位点, 常常得到不同甚至矛盾的结果。可能的原因有: (1)样本来源不同。不同的基因多态性及等位基因频率的分布与民族、种族、生活习惯等密切相关, 易造成偏移, 研究时应尽可能排除这些混杂因素的干扰, 因此选择样本是研究的重中之重; (2)样本量的选取。研究中小样本量及人群中基因多态性流行数据的缺失, 都会导致统计学上II类错误。正常人每1000个碱基就有一个SNPs, 样本量的选择要尽量发挥最大检出力; (3)病例组和对照组的设计。患者感染时的年龄(90%婴儿感染、20%-50%儿童感染、5%-10%成人感染会发展为慢性肝炎)和性别(由于雌激素<sup>[42]</sup>影响, 男性比女性更易感染HBV)会导致不同结果, 因此疾病关联研究中对对照组的选择, 应考虑年龄、性别的匹配, 尤其是对最早暴露于HBV的时间及感染途径的控制; (4)是否综合考虑病毒等因素。各个因素与宿主相互竞争, 相互影响, 并非孤立的发挥作用<sup>[67]</sup>; (5)基因分型方法不同。不同的分型方法对等位基因的鉴定会产生不同的结果。目前, 常用的方法有多聚酶链反应-序列特异性寡核苷酸反应(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probing, PCR-SSO或PCR-SSOP)、多聚酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)、多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)<sup>[68]</sup>等。基因芯片<sup>[69]</sup>由于高通量、自动化、无污染等特点, 使基因分型更准确; (6)细胞因子基因多态性的改变可能发生在转录、翻译和分泌等不同水平, 对体内细胞因子表达状况的研究很有必要。

总之, 乙肝的发生、发展是病毒、环境和遗传因素相互作用的结果。就遗传易感因素而言, 每个多态性位点并不是孤立的发挥作用, 而是存在一定的内在关联, 这种关联可表现为协同或拮抗, 单体型则是最好的体现, 因此单体型的研究更能揭示SNPs与疾病易感的关联。目前,

筛选HBV感染相关基因的工作已有一定进展, 还应加快对已鉴定出的候选基因的功能研究, 使之能尽快应用于临床。鉴于以上问题, 最好进行全国乃至更大范围的合作, 为HBV感染制定免疫防治策略和实施基因干预治疗打下基础。

**致谢:** 此课题全部或部分由美国国家卫生研究院国家癌症研究所资助, 资助编号为N01-CO-12400。本文内容既不涉及公共健康与社会福利部的方针政策, 也不涉及美国政府资助提到的商家、商业产品或组织机构。

## 3 参考文献

- 1 Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 2002; 35: 1274-1276
- 2 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 3 Frodsham AJ. Host genetics and the outcome of hepatitis B viral infection. *Transpl Immunol* 2005; 14: 183-186
- 4 Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12: 111-124
- 5 Du YP, Deng CS, Lu DY, Huang MF, Guo SF, Hou W. The relation between HLA-DQA1 genes and genetic susceptibility to duodenal ulcer in Wuhan Hans. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 107-110
- 6 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 284-285
- 7 Zeng Z. Genetic factors that influence HBV infection and comments. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1163-1165
- 8 Almarri A, Batchelor JR. HLA and hepatitis B infection. *Lancet* 1994; 344: 1194-1195
- 9 Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087
- 10 蒋雪梅, 陈士俊, 旭日. 山东汉族人乙肝患者与HLA-B基因型的相关性研究. *山东大学学报(医学版)* 2005; 43: 737-780
- 11 陈兰羽, 陈建杰, 章晓鹰. HLA-A、DRB1等位基因多态性与上海汉族人乙肝后肝硬化相关性研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 487-489
- 12 Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25
- 13 Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999; 179: 1004-1006
- 14 Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2221-2225
- 15 Park MH, Song EY, Ahn C, Oh KH, Yang J, Kang SJ, Lee HS. Two subtypes of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis are associated with different HLA-DR2 alleles in Koreans. *Tissue*

## ■创新盘点

关于免疫相关基因多态性与宿主HBV感染相关性的研究, 已有多项报道, 本文不仅对以往文章中涉及较多的相关基因(HLA-II, TNF- $\alpha$ )做一汇总, 而且就研究相对较少的相关基因及其多态性(如: HLA-I、IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-1RN, TGF $\beta$ 1, LMP, 某些蛋白和酶)也给予总结, 而且就目前此方面研究中存在的问题展示看法, 使读者对此有新的了解。



## ■应用要点

本文就目前涉及的与宿主HBV感染相关的免疫相关基因多态性作了较全面的综述,并且对可能存在的问题及研究前景展示了相应的看法,使读者能够更清晰的掌握此研究的发展方向,为进行这方面研究的同行提供参考。

- Antigens 2003; 62: 505-511
- 16 卢亮平, 刘英, 李兴旺, 孙国常, 朱席琳, 吴云忠, 胡全有, 李辉. 中国北方汉族人群白细胞抗原DRB1及DQA1区基因多态性与乙型肝炎病毒感染结局的关系. 中国医学科学院学报 2006; 28: 134-142
- 17 Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-1069
- 18 Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1\*1301 and \*1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 503-507
- 19 Diepolder HM, Jung MC, Keller E, Schraut W, Gerlach JT, Gruner N, Zachoval R, Hoffmann RM, Schirren CA, Scholz S, Pape GR. A vigorous virus-specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 244-251
- 20 Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5721-5724
- 21 刘泽霖, 范新兰, 林蒋海, 符志彦, 潘德京, 付永贵, 贾宗剑, 徐安龙. 广州地区汉族人乙型肝炎病毒感染与HLA-DPB1基因的相关性研究. 中国病理生理杂志 2002; 18: 907-909
- 22 Wang C, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Douglas SD, Mytilineos J, Schoenbaum EE, Tang J, Kaslow RA. Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35: 446-454
- 23 Biermer M, Puro R, Schneider RJ. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid Integrity through activation of NF-kappaB. *J Virol* 2003; 77: 4033-4042
- 24 Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, Cadahia V, Saro C, Dieguez MA, Lopez-Larrea C. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101-1106
- 25 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 579-582
- 26 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsuhashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092
- 27 Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2541-2546
- 28 Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR, Gou CY, Li Z, Liu Y, Li H. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006; 13: 618-624
- 29 Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Kim JH. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1163-1169
- 30 Zhang PA, Li Y, Yang XS. Associated study on interleukin 10 gene promoter polymorphisms related to hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006; 23: 410-414
- 31 Zhang PA, Li Y, Xu P, Wu JM. Polymorphisms of interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist genes in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1826-1829
- 32 Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 776-779
- 33 王坤, 时昌文, 高勇, 于振海, 宁涛, 曹邦伟, 李勇. 中国北方两市部分人群IL-2、IL-4基因多态性与乙肝关联性的研究. 中国现代普通外科进展 2006; 9: 171-174
- 34 Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med* 2003; 35: 76-82
- 35 Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993; 366: 583-585
- 36 Katsoulidis E, Li Y, Mears H, Platanius LC. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 749-756
- 37 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657
- 38 Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Klein T. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 144-150
- 39 Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2928-2931
- 40 Zhang PA, Wu JM, Li Y. Relationship between genetic polymorphisms of Interferon-gamma gene intron 1 +874 site and susceptibility of hepatitis B virus infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2006; 27: 41-43
- 41 Qi S, Cao B, Jiang M, Xu C, Dai Y, Li K, Wang K, Ke Y, Ning T. Association of the -183 polymorphism in the IFN-gamma gene promoter with hepatitis B virus infection in the Chinese population. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 276-281
- 42 Deng G, Zhou G, Zhai Y, Li S, Li X, Li Y, Zhang R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Wang Y, He F. Association of estrogen receptor alpha polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 318-326
- 43 Zhai Y, Zhou G, Deng G, Xie W, Dong X, Zhang X, Yu L, Yang H, Yuan X, Zhang H, Zhi L, Yao Z, Shen Y, Qiang B, He F. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility

- to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology* 2006; 130: 2001-2009
- 44 Yang ZX, Wang H, Gao CF, Xu LL, Zhao WJ. Effect of polymorphism of transforming growth factor beta1 gene on HBV-induced liver cirrhosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1021-1026
- 45 Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 505-510
- 46 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35: 196-202
- 47 Gupta V, Arora R, Saha A, Dhir A, Kar P, Bamezai R. Novel variations in the signal peptide region of transforming growth factor beta1 gene in patients with hepatitis: a brief report from India. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 79-82
- 48 Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH, Lai CL, Lau YL. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 42: 1037-1045
- 49 Song le H, Binh VQ, Duy DN, Juliger S, Bock TC, Luty AJ, Kremsner PG, Kun JF. Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. *Mutat Res* 2003; 522: 119-125
- 50 Thio CL, Mosbruger T, Astemborski J, Greer S, Kirk GD, O'Brien SJ, Thomas DL. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 9192-9196
- 51 Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348: 1417-1419
- 52 Dai Y, Ning T, Li K, Qi SX, Jiang MW, Chai QB, Gai YH, Wang X. Association between LMP2/LMP7 gene polymorphism and the infection of hepatitis B virus. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005; 37: 508-512
- 53 Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999; 179: 721-724
- 54 单晶, 王璐, 李卓, 刘英, 高冀蓉, 庞艳雷, 李俊红, 庞福民, 郭新会, 池洪治, 张长庚, 李辉. 维生素D受体基因多态性与乙型肝炎阳性者家庭聚集性关系. *中国医学科学院学报* 2006; 28: 148-153
- 55 李俊红, 陈冬梅, 李卓, 刘英, 高冀蓉, 曾宪嘉, 钟崇芳, 朱席林, 勾春燕, 潘利, 单晶, 郭新会, 李辉. 维生素D受体基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关联研究. *中华医学遗传学杂志* 2006; 23: 402-405
- 56 Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; 44: 856-863
- 57 Chang HY, Ahn SH, Kim DY, Shin JS, Kim YS, Hong SP, Chung HJ, Kim SO, Yoo WD, Han KH. Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection. *Korean J Hepatol* 2005; 11: 116-124
- 58 Mohammad Alizadeh AH, Hajilooi M, Ranjbar M, Fallahian F, Mousavi SM. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 630-635
- 59 Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C. Polymorphisms in the promoter region of the angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1488-1491
- 60 Namisaki T, Yoshiji H, Kuriyama S, Kojima H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Sakurai S, Yanase K, Kitade M, Yamazaki M, Asada K, Tsujimoto T, Akahane T, Uemura M, Fukui H. A potent angiogenic factor, vascular endothelial growth factor, improves the survival of the on-going acute hepatic failure in rats. *Hepatol Res* 2006; 35: 199-203
- 61 陈涛, 陈明, 汪莉萍, 封波, 李秀华. CD28基因启动子-372G/A多态性与慢性乙型肝炎的关系. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 312-313
- 62 夏天, 郝妍, 王小华, 刘洋, 陈兆鹏, 沈锡中, 朱乃硕. 抗原肽运载体TAP2基因与乙型肝炎病毒感染预后的相关性研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2005; 25: 331-337
- 63 殷思纯, 彭晓谋, 顾琳, 黄仰甦, 高志良. 粘病毒抵抗基因-1启动子88位点G/T多态性影响乙型肝炎病毒感染的自然转归. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 418-421
- 64 Mohammadzadeh Ghobadloo S, Yaghmaei B, Allameh A, Hassani P, Noorinayer B, Zali MR. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers. *Clin Biochem* 2006; 39: 46-49
- 65 Tseng CS, Tang KS, Lo HW, Ker CG, Teng HC, Huang CS. UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk and onset age. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1758-1763
- 66 邓春青, 邓国宏, 王宇明. eNOS基因(894G/T)多态性与HBV感染. *中国病毒学* 2005; 20: 476-479
- 67 McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 1: 17-21
- 68 Sobrino B, Brion M, Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 2005; 154: 181-194
- 69 李瑶. 基因芯片与功能基因组. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2004: 28-30

#### 同行评价

本文综述了与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展, 文章题目新颖, 层次清楚, 文字流畅, 逻辑性强, 有较强的理论基础和临床指导意义。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

# RNA干扰在胃癌治疗中的研究进展

章 璿, 方国恩, 王嘉锋

## ■背景资料

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 其死亡率在我国居于首位, 探索新的治疗方法具有重要的现实意义. 基因治疗是当前肿瘤研究的热点, RNA干扰作为当前一种新的基因治疗手段, 已经受到越来越多的重视, 其在胃癌治疗方面的研究也得到了较快的发展.

章璿, 方国恩, 王嘉锋, 中国人民解放军第二军医大学长海医院普外科 上海市 200433

通讯作者: 章璿, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院普外科. zhangjin\_sh@126.com  
电话: 021-65504407

收稿日期: 2006-12-04 接受日期: 2007-02-12

## Progress of RNA interference in the therapy of gastric cancer

Jin Zhang, Guo-En Fang, Jia-Feng Wang

Jin Zhang, Guo-En Fang, Jia-Feng Wang, Department of General Surgery, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Jin Zhang, Department of General Surgery, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. zhangjin\_sh@126.com

Received: 2006-12-04 Accepted: 2007-02-12

## Abstract

RNA interference (RNAi) is a new gene-silencing technique, which is a post-transcriptional gene silencing mediated by double-stranded RNA, resulting in the sequence-specific silence of target gene. RNAi technique has been applied widely in the research of various tumors, and most of the results have shown that it could specifically inhibited the expression of oncogenes, cancer-related genes and mutant genes, so as to suppress the occurrence and development of tumors. Meanwhile, explorations have also been performed on the therapy of gastric cancer, and some significant advances have been obtained. RNAi technique can not only act on the target genes directly, but also treat gastric cancer indirectly by restraining the angiogenesis. Furthermore, RNAi technique can be used to resist the multi-drug resistance during chemotherapy.

Key Words: RNA interference; Gastric cancer; Gene therapy

Zhang J, Fang GE, Wang JF. Progress of RNA interference in the therapy of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1252-1256

## 摘要

RNA干扰(RNAi)是近几年发展起来的一种新兴的基因沉默技术, 他是由双链RNA介导的靶向基因序列特异性转录后沉默机制. 目前, RNAi技术已被广泛应用于各种肿瘤研究, 结果发现其可特异地抑制癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达, 从而抑制肿瘤的发生、发展. 同时RNAi技术在胃癌治疗方面也进行了许多积极的探索, 取得了一些突破性进展. RNAi技术可直接作用于胃癌的靶向基因, 也可通过抑制肿瘤血管新生间接治疗胃癌, 并且他对胃癌化疗多药耐药也有作用.

关键词: RNA干扰; 胃癌; 基因治疗

章璿, 方国恩, 王嘉锋. RNA干扰在胃癌治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1252-1256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1252.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率位居我国恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>, 在世界范围居第2位<sup>[2]</sup>. 胃镜的普及虽然有效的提高了胃癌的检出率, 从而使得手术治愈率也得到了一定的提高, 但对进展期胃癌来说, 由于手术切除率低, 放化疗毒副作用大, 且常常面临肿瘤多药耐药的问题, 其疗效仍难以令人满意, 5 a生存率仍徘徊在30%左右<sup>[3]</sup>. 因此, 寻找一种新的治疗方法成为目前胃癌研究的一个重要课题. 近年来, 随着胃癌的分子生物学研究方面取得的进展, 人们认识到胃癌的发生主要与癌基因的突变、扩增、过度表达以及抑癌基因的突变、失活等密切相关, 因此, 在基因水平治疗胃癌是未来的发展方向. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发展起来的一项新技术, 能特异而有效的阻断靶基因的表达. 外源性或内源性双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内导致与其序列同源的mRNA分子发生特异性降解, 从而干扰相应基因的表达, 这种现象即为RNA干扰, 因基因沉默现象发生在转录后水平, 故又称为转录

后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). RNAi技术具有特异、高效、快捷、毒性小等特点,可高效、特异的抑制癌相关基因的过度表达,从而达到抗肿瘤的目的.目前, RNAi技术已被广泛的应用于各种肿瘤的研究中,为肿瘤的基因治疗带来新的希望.现就近年来RNAi技术在胃癌治疗方面的研究进展作一综述.

## 1 RNAi概述

**1.1 RNAi的特点** 1998年, Fire *et al*<sup>[4]</sup>将正义RNA与反义RNA以及一段与目的基因序列同源的反义RNA和模板RNA复性退火后的双链RNA分别注入到线虫体内,结果发现,注射双链RNA的基因沉默效率比单独注射的正义RNA或反义RNA至少高2个数量级.他们将所观察到的这种现象命名为“RNA干扰”. RNA干扰现象已证实一系列生物中存在,包括植物<sup>[5]</sup>、真菌<sup>[6]</sup>、锥虫<sup>[7]</sup>、囊虫<sup>[8]</sup>、果蝇<sup>[9]</sup>和哺乳动物<sup>[10]</sup>. RNA干扰于2001和2002连续2 a被《Science》评为当年十大科学成就之一,并获得了2006年度诺贝尔医学奖.科学家们之所以对RNA干扰表现出如此大的关注和兴趣,就在于其在基因功能和相关方面的研究具有许多传统方法无法比拟的特点和优势: (1)高度特异性: RNAi具有严格的序列特异性,只降解与之序列相应的内源性mRNA,对无关基因的表达无干扰作用,因此,可用于单个核苷酸突变基因的表达抑制<sup>[11]</sup>; (2)高效性: 即只需微量的dsRNA分子就可有效抑制靶基因的表达,甚至达到剔除(Knock-out)的效果,该过程是以催化放大形式完成的<sup>[4]</sup>; (3)快速性: dsRNA进入细胞后10 min即可产生siRNA分子,30 min内其靶mRNA的水平可下降30倍左右<sup>[12]</sup>; (4)可传播性: RNA干扰具有细胞间的高穿透性,可跨越细胞界限,在果蝇细胞中可见在细胞群落之间传播<sup>[9]</sup>; Song *et al*<sup>[13]</sup>在实验鼠尾部血管注入旨在“沉默”Fas基因的siRNA,发现有90%的肝细胞内存在这种RNA分子; (5)可遗传性: 研究发现, dsRNA注入线虫性腺后,其子代也出现了同样的基因抑制现象,说明RNAi效应具有可遗传性<sup>[4]</sup>; (6)ATP依赖性: 在去除ATP的样品中RNA干扰现象降低或消失,显示RNA干扰是个ATP依赖的过程<sup>[14]</sup>; (7)长度、浓度依赖性、高稳定性等.

**1.2 RNAi的作用机制** 有两种途径可将dsRNA导入生物体内,一种是直接将合成的dsRNA

导入,另一种是将DNA模板引入到细胞内后通过转录的方式再产生dsRNA<sup>[15]</sup>. 目前公认的RNAi作用机制为: (1)启动阶段: 当dsRNA导入细胞后,首先被一种dsRNA特异的核酸内切酶Dicer(一种RNaseIII样的酶,包含3个区域: 螺旋酶区、dsDNA结合区和PAZ区<sup>[16]</sup>)识别,切割成为21-23 bp(base pairs)的双链小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),每个片段的3'端都有两个碱基突出<sup>[17]</sup>和5'磷酸末端<sup>[14]</sup>,这一加工过程需ATP提供能量; (2)效应阶段: siRNA和体内一些酶(包括核酸内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成RNA诱导的沉默复合物<sup>[18]</sup>(RNA-induced silencing complex, RISC)或RNA诱导的转录基因沉默起始复合物<sup>[19]</sup>(RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing complex, RITS). 在RNA解旋酶的作用下,由ATP提供能量, siRNA被解链成正义链和反义链,随后,反义siRNA引导RISC和相应序列的mRNA特异性结合,并使得Argonaut 2蛋白切断靶mRNA<sup>[20]</sup>,切断部位大约在距离siRNA的3'端第12个碱基的位置<sup>[21]</sup>,而后mRNA进一步降解,最终阻断相应基因的表达; (3)扩增阶段: siRNA的反义链结合到目的mRNA后,不仅诱导RISC对该基因进行降解,同时还激活RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)介导的以siRNA反义链为引物、靶mRNA为模板的dsRNA的合成. 新合成的dsRNA再次被Dicer切割,产生大量的次级siRNA,进入下一个RNAi的循环,这一过程称为RNAi的放大效应<sup>[22]</sup>.

## 2 RNAi技术在胃癌治疗中的应用

**2.1 RNAi直接作用于胃癌的靶向基因** 胃癌的发生是以癌基因的激活与抑癌基因的失活为基础的多步骤、多阶段过程,是遗传和环境因素相互作用的结果,通过其表达产物的作用,改变和扰乱细胞生长、分化及代谢等重要过程,从而导致细胞癌变. 因此,寻找阻断癌基因激活与抑癌基因失活的siRNA有可能抑制胃癌的发生. 传统的基因敲除、反义核酸和核酶等基因治疗方法往往不可能完全抑制或逆转肿瘤细胞的生长,而RNAi技术则不同,它能够同时抑制多个不同的基因,而且抑制效果互不干扰. 大量实验研究结果表明, RNAi技术可特异的抑制癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达,抑制肿瘤的发生、发展<sup>[23]</sup>,并可快速鉴定新的肿瘤靶目标,所以这项技术在肿瘤的基因治疗上有光明的应

### ■研发前沿

当前, RNA干扰在胃癌治疗中的研究主要集中在针对胃癌靶基因、抗肿瘤血管治疗及抑制肿瘤的多药耐药性等方面. 胃癌的肿瘤疫苗研究及多基因联合治疗是RNAi在胃癌治疗方面亟待研究的方向.



## ■应用要点

RNA干扰技术已经在很多方面显示出了其特异、高效的优越性,尽管目前RNAi技术在哺乳动物中的应用还处于探索阶段,但他必将成为疾病尤其是肿瘤基因治疗中重要的组成部分。

用前景。胃癌从组织学上被分成弥漫型和肠型两种类型。与肠型胃癌相比,弥漫型胃癌具有发病年龄轻、恶性程度高、预后差、死亡率高等特点<sup>[24]</sup>。Jinawath *et al*<sup>[25]</sup>研究表明,将核仁蛋白NOL8特异性siRNA转染ST-4, TMK-1和MKN45 3种不同的弥漫型胃癌细胞,可以有效的降低该基因的表达,并能诱导这些细胞凋亡。因此, NOL8可能成为弥漫型胃癌治疗性干预的一个靶点。RhoC是Rho家族的一员,与肿瘤转移密切相关。刘娜 *et al*<sup>[26]</sup>将RhoC特异性siRNA的真核表达载体转染胃癌AGS细胞,经Western印迹分析发现, RhoC-siRNA转染细胞中的RhoC的表达水平明显下降,从而为进一步进行针对RhoC的胃癌基因治疗的研究奠定了基础。表皮生长因子受体(EGFR)与胃癌的预后和转移相关, EGFR高表达提示预后差,肿瘤易发生转移<sup>[27]</sup>。EGFR能被许多因子反式激活,包括G蛋白耦联受体激动剂和细胞因子等。尽管有许多报道认为EGFR的这种反式激活需要解离素和金属蛋白酶(adisintegrin and metalloprotenase, ADAM)来屏蔽EGFR的外功能区,但具体机制尚不清楚。Tanida *et al*<sup>[28]</sup>运用siRNA使ADAM10沉默,发现ADAM10的降低能明显减少IL-8诱导的EGFR反式激活,从而揭示IL-8诱导的EGFR反式激活需要ADAM10依赖性通道。

**2.2 通过抑制肿瘤血管新生间接治疗胃癌** 肿瘤内血管新生是肿瘤细胞得以不断分裂、生长和转移的基础,抑制血管的生成就能够抑制肿瘤的生长。血管内皮生长因子(VEGF)是目前发现的诸多促血管生成因子中作用最强的,在肿瘤血管生成的各个环节均有重要作用且能特异性的作用于血管内皮细胞的有丝分裂原,而肿瘤的淋巴结转移亦依赖于血管的形成<sup>[29]</sup>,故抑制VEGF表达是当前抗肿瘤血管生成的最重要策略之一。徐文华 *et al*<sup>[30]</sup>应用VEGF-siRNA转染胃癌细胞SGC-7901,发现从mRNA转录到蛋白质表达, VEGF均被明显抑制,同时也在一定程度上抑制了SGC-7901细胞的增殖。研究表明, Rho家族的小GTP酶和缺氧诱导的恶性肿瘤血管形成密切相关。Rac1是Rho家族的一个主要成员, Xue *et al*<sup>[31]</sup>将特异于Rac1的siRNA表达载体转染胃癌AGS细胞,有效的抑制了高表达的Rac1基因与蛋白,促进了AGS细胞的凋亡,同时发现, VEGF和缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$ 表达下调,而抑癌基因p53和血管形成抑制因子VHL表达上调。结果表明, Rac1是通过调

控血管形成相关因子的表达而在肿瘤血管形成中起作用的。Meng *et al*<sup>[32]</sup>发现, Raf-1被RNA干扰抑制后VEGF和(HIF)-1 $\alpha$ 也相应下降,在抑制胃癌血管生成的同时也促进了胃癌细胞的凋亡。

**2.3 RNAi在胃癌化疗多药耐药方面的研究** 与其他实体肿瘤一样,多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是导致胃癌化疗失败的一个主要原因。有学者认为,以每个患者基因分型为基础的治疗是将来胃癌治疗用药的方向<sup>[33]</sup>。而RNAi对于基因的高度特异性决定了他必将在未来肿瘤的化疗中扮演重要的角色。化疗失败的主要原因是肿瘤细胞获得了耐药性,这种耐药性常表现为肿瘤细胞对多种结构不同、作用靶位不同、作用方式不同的抗肿瘤药物具有抵抗性,称为多药耐药(MDR)。研究发现,这种耐药性与肿瘤细胞的某些耐药基因相关,主要的耐药基因是多药耐药基因1(MDR1),编码相对分子质量为170 000的跨膜糖蛋白P-gp (P-glycoprotein),其过表达使肿瘤细胞具有MDR<sup>[34]</sup>。这种糖蛋白具有药泵的作用,当其表达增高或功能异常增强时,能以耗能的方式将肿瘤细胞内的药物泵出,并抑制依赖caspases的细胞凋亡途径,使细胞能在高浓度的药物环境中生存<sup>[35]</sup>。针对该基因的RNAi可以使MDR1基因的水平下调而进一步提高细胞内的药物浓度,提高肿瘤细胞对化疗的敏感性。传统的MDR逆转剂都是作用在P-gp水平,效率低、副作用大。为了克服这一障碍, Stege *et al*<sup>[36]</sup>将针对MDR1的siRNA转染胃癌细胞株EPG85-257RDB,有效的抑制了MDR1基因的表达及其表达产物(在RNA水平和蛋白水平有效抑制率达91%),使EPG85-257RDB对抗肿瘤药物柔红霉素的耐药性降低了58%。表明此种siRNA可逆转具有P-gp依赖的MDR表型的肿瘤的治疗,通过提高细胞对化疗药物的敏感性来达到治疗肿瘤的目的。Hao *et al*<sup>[37]</sup>利用RNA干扰技术干扰胃癌细胞的细胞因子诱导凋亡阻遏物-1(cytokine-induced apoptosis inhibitor 1, CIAPIN1)后发现P-gp下降,MDR-1和MRP-1均下调,细胞耐药性则相应降低。肿瘤易感基因(tumor susceptibility gene101, TSG101)与转录调控有关,在多药耐药的胃癌中表达上调。Shen *et al*<sup>[38]</sup>将体外构建的特异于TSG101的siRNA真核表达载体转染于对长春新碱耐药的胃癌SGC-7901细胞后发现, TSG101的表达显著下降,且增加了所转染细胞对长春新碱的敏感性。结果表明, TSG101可能在胃癌的多药耐药中起重

要作用, 有望成为胃癌基因治疗的一个新的靶点. Ning *et al*<sup>[39]</sup>发现, 在对阿霉素和足叶乙甾耐药的胃癌SGC-7901细胞中, 端粒重复序列结合因子2(telomeric repeat binding factor 2, TRF2)表达上调, 使用RNAi干扰抑制TRF2后细胞耐药表型减少, 表明TRF2不仅与细胞DNA损害反应有关, 且能提高肿瘤细胞耐药性.

总之, RNAi技术的应用已成为生命科学研究中的新热点. 目前, 对RNAi技术已经有深入的了解, 新的研究成果不断涌现, 但在其真正运用于临床之前, 还有许多问题亟待解决. 相关问题有siRNA分子的稳定性, 不同的mRNA对RNAi的敏感性不同, 在人体内RNAi是否与在体外以及动物模型中有相似的研究结果以及转运siRNA的合适载体系统等. 在胃癌的研究方面, RNAi的应用也还有很多可拓展的空间, 如胃癌肿瘤疫苗的研究、寻找对抗胃癌淋巴结及腹膜转移的途径、胃癌的多基因治疗实验探索等方面. RNAi独特的作用机制以及其简便的操作流程和对靶基因表达抑制的高效性使其在肿瘤基因治疗方面显示出了广阔的应用前景<sup>[40]</sup>. 虽然这一技术真正应用于胃癌的临床治疗尚不成熟, 相信随着研究的广泛细致深入, 越来越多的与肿瘤生长增殖密切相关的高特异性靶基因及能使外源性治疗基因高效表达的载体的发现, RNAi技术会成为胃癌基因治疗的一种新手段.

### 3 参考文献

- 1 邓大君, 鄂征. 胃癌病因: 人N-亚硝酰胺暴露. 世界华人消化杂志 2000; 8: 250-252
- 2 Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 354-362
- 3 Hejna M, Wohrer S, Schmidinger M, Raderer M. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. *Oncologist* 2006; 11: 136-145
- 4 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
- 5 Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13959-13964
- 6 Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999; 399: 166-169
- 7 Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14687-14692
- 8 Lohmann JU, Endl I, Bosch TC. Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol* 1999; 214: 211-214
- 9 Caplen NJ, Fleenor J, Fire A, Morgan RA. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 2000; 252: 95-105
- 10 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 11 Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10: 816-820
- 12 Yang D, Lu H, Erickson JW. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 2000; 10: 1191-1200
- 13 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-351
- 14 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101: 25-33
- 15 Ohta A, Inoue A, Taira K. Basic research on and application of RNA interference. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31: 827-831
- 16 Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 2000; 6: 1077-1087
- 17 Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 225-232
- 18 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-296
- 19 Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004; 303: 672-676
- 20 Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-197
- 21 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107: 297-307
- 22 Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* 2005; 56: 401-423
- 23 Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 2003; 424: 797-801
- 24 Framp A. Diffuse gastric cancer. *Gastroenterol Nurs* 2006; 29: 232-236; quiz 236-238
- 25 Jinawath N, Furukawa Y, Nakamura Y. Identification of NOL8, a nucleolar protein containing an RNA recognition motif (RRM), which was overexpressed in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 430-435
- 26 刘娜, 毕锋, 潘阳林, 薛妍, 韩者艺, 刘长江, 樊代明. RhoC在胃癌细胞中的表达及其小干扰RNA表达载

### ■名词解释

基因沉默: 外源性或内源性双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内导致与其序列同源的mRNA分子发生特异性降解, 从而干扰相应基因的表达, 这种现象即为RNA干扰, 因基因沉默现象发生在转录后水平, 故又称为转录后基因沉默.

## ■同行评价

RNAi是目前研究的一个热点,最近有大量的相关文献报道,文章较全面的综述了RNAi目前在胃癌中的研究现状,有一定的指导意义。

- 体的构建与鉴定. 细胞与分子免疫学杂志 2004; 20: 148-151
- 27 Ito R, Nakayama H, Yoshida K, Matsumura S, Oda N, Yasui W. Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2004; 444: 324-331
- 28 Tanida S, Joh T, Itoh K, Kataoka H, Sasaki M, Ohara H, Nakazawa T, Nomura T, Kinugasa Y, Ohmoto H, Ishiguro H, Yoshino K, Higashiyama S, Itoh M. The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 2004; 127: 559-569
- 29 Yan C, Zhu ZG, Yu YY, Ji J, Zhang Y, Ji YB, Yan M, Chen J, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 783-790
- 30 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋. VEGF基因表达抑制对胃癌细胞SGC-7901增殖的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 655-659
- 31 Xue Y, Bi F, Zhang X, Pan Y, Liu N, Zheng Y, Fan D. Inhibition of endothelial cell proliferation by targeting Rac1 GTPase with small interference RNA in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 1309-1315
- 32 Meng F, Ding J, Liu N, Zhang J, Shao X, Shen H, Xue Y, Xie H, Fan D. Inhibition of gastric cancer angiogenesis by vector-based RNA interference for Raf-1. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 113-117
- 33 Katoh M, Katoh M. Pharmacogenomics on gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 566-567
- 34 Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159-165
- 35 Rittierodt M, Harada K. Repetitive doxorubicin treatment of glioblastoma enhances the PGP expression-a special role for endothelial cells. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 55: 39-44
- 36 Stege A, Pribsch A, Nieth C, Lage H. Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 699-706
- 37 Hao Z, Li X, Qiao T, Du R, Hong L, Fan D. CIAPIN1 confers multidrug resistance by upregulating the expression of MDR-1 and MRP-1 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 261-266
- 38 Shen H, Pan Y, Han Z, Hong L, Liu N, Han S, Yao L, Xie H, Zhaxi C, Shi Y, Fan D. Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by downregulation of TSG101 with TSG101siRNA. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 561-565
- 39 Ning H, Li T, Zhao L, Li T, Li J, Liu J, Liu Z, Fan D. TRF2 promotes multidrug resistance in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 950-956
- 40 Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA* 2005; 293: 1367-1373

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

## 第三届全军胃肠外科学术会议暨 2007年普通外科高峰论坛征文通知

**本刊讯** 全军胃肠外科学术委员会定于2007-06月上旬在贵阳市召开“第三届全军胃肠外科学术会议暨2007年普通外科高峰论坛”。会议将邀请国内、军内著名外科专家,对热点问题作专题演讲与探讨。代表获得国家继续医学教育I类学分。

### 1 征文内容

(1)胃肠外科和普通外科的新进展、新技术、新手术、新经验;(2)实验研究;(3)腹腔镜手术;(4)围手术期肿瘤放化疗;(5)围手术期营养支持;(6)围手术期护理等。

### 2 征文要求

论文全文和摘要(600字左右)各一份,并附拷贝软盘,请寄:100700北京市东城区南门仓5号 北京军区总医院全军普通外科中心 李世拥 收;电话:010-66721188;截稿日期:2007-05-01。

# 肝脏炎性肌纤维母细胞瘤研究进展

付雪琼, 林 军

付雪琼, 林军, 武汉大学中南医院消化内科, 武汉大学医学院消化系疾病研究中心 湖北省武汉市 430071  
通讯作者: 林军, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科, 武汉大学医学院消化系疾病研究中心.  
linjun64@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2006-10-07 接受日期: 2007-01-31

## Advancement of research on inflammatory myofibroblastic tumor of the liver

Xue-Qiong Fu, Jun Lin

Xue-Qiong Fu, Jun Lin, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital; Research Center of Digestive Diseases, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Lin, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital; Research Center of Digestive Diseases, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, Hubei Province, China. linjun64@yahoo.com.cn  
Received: 2006-10-07 Accepted: 2007-01-31

## Abstract

Inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) is a mesenchymal neoplasm composed of transformed myofibroblastic spindle cells with infiltration of a large number of inflammatory cells and/or lymphocytes. The etiology of IMT remains unknown. IMT occurs at various sites and often affects young adults and children. IMT of the liver mostly arises in the right lobe of liver. Biopsy, computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are beneficial to diagnosis and differential diagnosis. Vimentin, smooth muscle actin (SMA), muscle-specific actin (MSA) are often positive by immunohistochemistry. The prognosis of most patients is favorable after surgery. In this article, we reviewed the overseas and domestic literatures and summarized the advancement of research on the IMT of the liver about etiology, pathogenesis, clinical presentations, imaging feature, histological appearance, immunohistochemical and electron microscopic feature, diagnosis, differential diagnosis and therapy.

Key Words: Inflammatory myofibroblastic tumor; Liver

Fu XQ, Lin J. Advancement of research on inflammatory myofibroblastic tumor of the liver. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1257-1260

## 摘要

炎性肌纤维母细胞瘤, 是指由分化的肌纤维母细胞性梭形细胞组成, 常伴大量炎细胞和/或淋巴细胞的一种间叶性肿瘤。炎性肌纤维母细胞瘤病因未明, 可见于身体各个部位, 发病年龄多见于儿童和青少年。肝脏炎性肌纤维母细胞瘤多发于肝右叶, 组织活检、CT和MRI有助于诊断和鉴别诊断, 且免疫组化常表达波形蛋白(Vimentin), 平滑肌肌动蛋白(SMA), 肌特异性肌动蛋白(MSA), 大部分患者经手术治疗后预后良好。本文复习国内外文献对发生于肝脏的炎性肌纤维母细胞瘤的病因及发病机制、临床表现、影像学特点、组织学形态、免疫组织化学及电镜特征、诊断及鉴别诊断、治疗等问题作系统综述, 以期提高对肝脏炎性肌纤维母细胞瘤的认识。

关键词: 炎性肌纤维母细胞瘤; 肝脏

付雪琼, 林军. 肝脏炎性肌纤维母细胞瘤研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1257-1260

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1257.asp>

## 0 引言

炎性肌纤维母细胞瘤(inflammatory myofibroblastic tumor, IMT)是一种少见独特的间叶性肿瘤, 近年来, 已逐渐得到病理及临床的广泛认同。WHO定义为“由分化的肌纤维母细胞性梭形细胞组成, 常伴大量浆细胞和/或淋巴细胞的一种间叶性肿瘤”。IMT好发于青少年, 多位于肺部<sup>[1-2]</sup>和眼部<sup>[3-4]</sup>, 也可发生在胃<sup>[5-6]</sup>、肠<sup>[7]</sup>、脾脏<sup>[8-9]</sup>、膀胱<sup>[10]</sup>、胰腺<sup>[11-12]</sup>、肝脏<sup>[13-15]</sup>、中枢神经系统<sup>[16-17]</sup>等全身各处, 由于病因不清, 起初命名较混乱, 国内外文献曾以多种命名报道, 如: 炎性假瘤、浆细胞肉芽肿、纤维黄色肉芽肿、肌纤维母细胞瘤、黏液样错构瘤、假肉瘤、炎症性纤维肉瘤、组织细胞瘤、浆细胞瘤

## ■背景资料

肝脏炎性肌纤维母细胞瘤临床上不多见, 临床医师对此认识不深, 而且诊断和鉴别诊断比较困难, 容易导致漏诊、误诊。因此, 本文综述了国内外相关文献, 以期提高认识, 对临床诊断、鉴别诊断和治疗带来帮助。



## ■研究前沿

炎性肌纤维母细胞瘤的病因和发病机制尚未明确,因此,目前该研究领域中的热点和重点应该为探讨和研究该疾病的病因和发病机制,提高对该病的诊断、治疗水平,使更多的患者得到康复。

等. 1939年最早报道2例IMT发生于肺部,肿瘤的梭形细胞表现当时误认为是恶性,经过多年的临床与病理验证,得出这些梭形细胞是炎症后肿瘤的结论,临床预后尚好;其次,该病变中常可见大量淋巴细胞和浆细胞浸润,因而“炎性假瘤”的名称逐渐被广泛接受. 现在WHO软组织肿瘤国际组织学分类专家已建议命名为IMT,从而结束了长期以来有关其命名混乱的状态. 本文就肝脏IMT的概念、病因及发病机制、临床表现、影像学特点、组织学形态、免疫组织化学及电镜特征、诊断及鉴别诊断、治疗等问题做系统综述,以提高我们对肝脏炎性肌纤维母细胞瘤的认识.

## 1 病因和发病机制

IMT的发病原因和机制尚不清楚. 细胞遗传学分析揭示了一种好发于儿童和青壮年的IMT亚型, 包含有2P23染色体的重排, 分子生物学研究表明其含有恶性淋巴激酶(ALK); 腹腔内的IMT中发现了SEC31L1/ALK的一种新的融合基因, G带分析发现有染色体的易位t(2, 4)(p23, q21)<sup>[18]</sup>. Sirvent *et al*<sup>[19]</sup>在1例婴儿IMT中发现了t(2, 11, 2), (p23, p15, q31)的染色体易位. 还有学者认为, 发生肝、脾及淋巴结的IMT可能与EBV感染有关, Arber *et al*<sup>[20]</sup>通过免疫组化和原位杂交的方法, 在肝IMT的淋巴细胞和梭形细胞中发现了EB病毒感染的证据, 而Tamsel *et al*<sup>[21]</sup>则报道了1例由放线菌感染引起的肝IMT, Milne *et al*<sup>[22]</sup>通过荧光原位杂交在IMT病例中发现了ALK/TPM3融合基因, Fisher<sup>[23]</sup>也报道, 许多IMT病例中发现了包含2p22-24的克隆性染色体异常, 在IMT的一个亚型中还检测出tropomyosin 3 (TPM3-ALK)或tropomyosin 4 (TPM4-ALK)的融合基因.

## 2 临床及影像学特点

IMT可发生于任何年龄, 以婴幼儿和青壮年居多<sup>[24]</sup>, 病灶可单发, 也可多发, 部位以右叶多见, 左叶及肝门区也可发生. 发病尚无一定的规律, 症状轻微或不明显. 主要临床表现包括右上腹不适或疼痛、发热, 上腹部可扪及包块或肝肿大, 体质量减轻等, 部分患者可有恶心、呕吐等消化道症状. 当肝IMT位于肝门部, 若压迫、累及胆道可发生胆汁淤积性黄疸, 并发门静脉炎及阻塞<sup>[25]</sup>. IMT呈取代周围结构的肿块, 可有/无钙化, 肿块的形态随部位而异, 肠系膜或肝的IMT表现为局限性实性团块<sup>[26]</sup>. 迄今肝脏IMT影

像学检查的文献报道较多, 如B超、彩超、螺旋CT、MRI等多种检查. IMT可发生于肝脏的任何部位, 以肝右叶多见, B超可见IMT多呈不规则形, 边界常较清楚且规则, 有时可见周边有淡的低回声环围绕; 内部多以低回声为主, 分布不均, 偶尔在低回声区中央可有较淡的增强光点出现, 后方回声很少发生改变. 彩超示肝IMT大多无彩色血流信号, 仅少数病灶可检出些许条状彩色血流, 且多位于周边部. CT动态增强扫描可较好反映病灶的血供和病理特征, 对肝IMT诊断和鉴别诊断具有一定的价值. CT平扫肝IMT呈低密度, 密度不均匀/均匀, 边界清楚/不清楚. MRI肝IMT在T1加权相上多为低信号, T2加权相上为中或高信号<sup>[15]</sup>; 门静脉期及延迟期均呈不同程度强化, 其方式与CT增强扫描类似, 增强扫描动脉期强化比CT多见.

## 3 组织学形态特征

3.1 巨检 常为局限性或者多灶性的实质性肿块或呈息肉样肿物, 大小从<1 cm到>20 cm不等, 有时有完整的包膜.

3.2 镜检 主要为梭形细胞, 数量不等的胶原以及由淋巴细胞、浆细胞组成的炎性成分. 这些细胞或基质以及生长方式在不同的IMT中或在同一肿瘤的不同区域中比例会有所不同. 纪小龙 *et al*<sup>[26]</sup>提出3种主要组织学类型: (1)黏液样/血管型, 以黏液、血管、炎症区域为主; (2)丰富梭形细胞型, 梭形细胞夹杂炎性细胞, 类似纤维组织细胞瘤. 当累及胃肠道时, 常被误认为平滑肌瘤或间质瘤; (3)少细胞纤维型, 致密成片的胶原纤维可类似疤痕或硬化性纤维瘤, 少部分病例出现点状或大片的钙化和化生骨.

## 4 免疫组化研究

免疫组化常表达vimentin, smooth muscle actin(SMA), muscle-specific actin(MSA), 部分病例desmin阳性, S-100, myoglobin, CD34阴性. 文献[27]报道, 梭形细胞vimentin(15/18, 83%), actin(18/20, 90%), keratin(10/13, 77%)表达阳性, vimentin弥漫表达. 部分病例尚可表现为EMA、CD68、CD30、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、 $\alpha$ 1-抗糜蛋白酶或溶菌酶等阳性. 有文献报道, ALK阳性率可达60%(44/73)<sup>[28]</sup>.

## 5 电镜检查

电镜可观察IMT梭形细胞的肌纤维母细胞特征,

梭形细胞内可见大量的粗面内质网、微丝束、发育良好的高尔基复合体、细胞内胶原;周围伴有成熟纤维母细胞、胞外胶原、间充质细胞、肥胖的内皮细胞及炎性细胞,包括成熟的浆细胞。

## 6 诊断、鉴别诊断及治疗

IMT的诊断取决于肿瘤发生的部位以及组织表现,B超、CT、MRI可以辅助诊断,但是确诊应该依赖于活组织病理学检查证实。鉴别诊断主要有以下几个:(1)肝细胞性肝癌。肝细胞性肝癌是肝脏最常见的恶性肿瘤,在肝动脉期扫描时病灶明显强化,而门脉期和延迟期扫描时病灶密度下降,密度呈速升速降尖顶山峰型特点,典型病例不难鉴别。而少血供型肝癌,始终无强化表现,需和肝脏IMT鉴别,根据门静脉和延迟期有无强化,病灶内有无纤维分隔,有无肝炎肝硬化病史及AFP的测定,并结合临床病史、体征等,一般可做出明确诊断。极少数仍鉴别困难,需经皮肝穿刺、术后病理及抗炎治疗后随访,可明确诊断;(2)转移性肝癌。肝脏是转移性肿瘤的好发部位,在门脉期扫描时也可见到边缘环形强化表现,但转移性肝癌一般为多发病灶,典型病例具有“牛眼征”表现,结合临床病史,一般不难作出诊断;(3)肝脓肿。典型病例有起病急,发热,右上腹痛,白细胞升高的表现,CT上常可见到肝内病灶有典型的“环征”,中心液化坏死区无强化,脓肿壁有强化,而外周水肿带无强化表现。病灶也可以是多房的,其分隔可有强化。不典型的肝脓肿不易和肝脏IMT鉴别,有时需经抗炎治疗后复查或经皮肝穿刺及术后病理检查,进一步明确;(4)肝血管瘤。典型肝血管瘤为边界清楚密度均匀的低密度影,增强扫描周边首先强化,呈线状、环状或团块状,强化较明显,并向内扩散,延迟扫描可完全充盈,密度等于或略高于正常肝实质。小血管瘤在增强早期可完全强化。所有血管瘤造影剂在病灶内停留时间较长,一般可以和IMT鉴别;(5)胆管细胞癌。为原发性肝癌的组织学亚型,可早期强化,且多可延迟强化与IMT有类似特征,但其多位于肝左叶,且直径常超过5 cm,病灶内或周边常见到扩张的胆管,T2WI也多为不均匀高信号,以资鉴别。

肝IMT的治疗目前仍存在争议,大多数学者主张手术切除是最为有效的治疗方法。如术前难获确诊,不能除外恶性肿瘤或有症状(如胆道梗阻)、肿物增大以及对药物治疗无效,则需

手术治疗。而一些无法切除的患者则接受了肝移植的治疗<sup>[25]</sup>。亦有学者主张,对无症状且已经明确诊断,或不能耐受手术者可以采用保守疗法,如抗生素、非类固醇类抗炎药物,但其疗效有待进一步观察。少数病例未经特殊治疗,几个月后可能自行缓解<sup>[29-30]</sup>。但有肝IMT复发的报道,Hussong *et al*<sup>[31]</sup>认为,肿瘤的复发可能与肿瘤细胞的异型性、出现节细胞样细胞、表达P53和异倍体有关,绝大部分肝IMT预后良好。

## 7 参考文献

- 1 Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kitamura H. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor resected by video-assisted thoracoscopic surgery: Report of a case. *Surg Today* 2007; 37: 137-140
- 2 Kobashi Y, Fukuda M, Nakata M, Irei T, Oka M. Inflammatory pseudotumor of the lung: clinicopathological analysis in seven adult patients. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 461-466
- 3 Oh JY, Yu HG. Subretinal inflammatory myofibroblastic tumor: clinicopathological findings. *Korean J Ophthalmol* 2005; 19: 235-238
- 4 Sa HS, Ji JY, Suh YL, Kim YD. Inflammatory myofibroblastic tumor of the orbit presenting as a subconjunctival mass. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2005; 21: 211-215
- 5 Leon CJ, Castillo J, Mebold J, Cortez L, Felmer R. Inflammatory myofibroblastic tumor of the stomach: an unusual complication after gastrectomy. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 347-349
- 6 Popova ED, Popov SD. Inflammatory pseudotumor of the stomach in a 12-year old child. *Arkh Patol* 2005; 67: 46-47
- 7 Zuccarello C, Arena F, Fazzari C, Arena S, Nicotina PA. Small bowel intussusception by local recurrence of an inflammatory myofibroblastic tumor: report of a case and review of the literature. *Minerva Pediatr* 2006; 58: 495-498
- 8 Shapiro AJ, Adams ED. Inflammatory pseudotumor of the spleen managed laparoscopically. Can preoperative imaging establish the diagnosis? Case report and literature review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2006; 16: 357-361
- 9 Colovic N, Colovic R, Grubor N, Micev M, Radak V, Stojkovic M. Inflammatory pseudotumor of the spleen. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63: 757-760
- 10 Hayashi T, Abe T, Nakayama J, Mori N, Sekii K, Yoshioka T, Itatani H, Kishikawa H. A case of inflammatory myofibroblastic tumor of the bladder. *Hinyokika Kyo* 2006; 52: 955-957
- 11 Nakamura Y, Inui K, Yoshino J, Tokoro T, Sabater L, Takeda S, Yamashita K, Okochi O, Nakao A. Inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory fibrosarcoma) of the pancreas: a case report. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 625-628
- 12 Casadei R, Piccoli L, Valeri B, Santini D, Zanini N, Minni F, Marrano D. Inflammatory pseudotumor of the pancreas resembling pancreatic cancer: clinical, diagnostic and therapeutic considerations. *Chir Ital* 2004; 56: 849-858
- 13 Solomon GJ, Kinkhabwala MM, Akhtar M. Inflammatory myofibroblastic tumor of the liver.

## ■名词解释

肝脏炎性肌纤维母细胞瘤(IMT):是一种少见独特的间叶性肿瘤,WHO定义为“由分化的肌纤维母细胞性梭形细胞组成,常伴大量浆细胞和/或淋巴细胞的一种间叶性肿瘤”。

## ■同行评价

本文综述了肝脏炎性肌纤维母细胞瘤研究进展,文章层次清楚,语言流畅,有较高的指导意义。

- 14 Alimoglu O, Sahin M, Eryilmaz R, Turgut H, Kurtulmus N, Igci A. Inflammatory pseudotumour of the liver presenting with obstructive jaundice. *Acta Chir Belg* 2005; 105: 309-312
- 15 Teranishi N, Yoshida H, Mamada Y, Tani ai N, Mizuguchi Y, Shimizu T, Takahashi T, Akimaru K, Naito Z, Tajiri T. Inflammatory pseudotumor in the Spiegel lobe of the liver of an elderly woman. *J Nippon Med Sch* 2005; 72: 121-126
- 16 Jung TY, Jung S, Lee MC, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim SH. Hemorrhagic intracranial inflammatory pseudotumor originating from the trigeminal nerve: a case report. *J Neurooncol* 2006; 76: 139-142
- 17 Jeon YK, Chang KH, Suh YL, Jung HW, Park SH. Inflammatory myofibroblastic tumor of the central nervous system: clinicopathologic analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 254-259
- 18 Panagopoulos I, Nilsson T, Domanski HA, Isaksson M, Lindblom P, Mertens F, Mandahl N. Fusion of the SEC31L1 and ALK genes in an inflammatory myofibroblastic tumor. *Int J Cancer* 2006; 118: 1181-1186
- 19 Sirvent N, Hawkins AL, Moeglin D, Coindre JM, Kurzenne JY, Michiels JF, Barcelo G, Turc-Carel C, Griffin CA, Pedetour F. ALK probe rearrangement in a t(2;11;2)(p23;p15;q31) translocation found in a prenatal myofibroblastic fibrous lesion: toward a molecular definition of an inflammatory myofibroblastic tumor family? *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 85-90
- 20 Arber DA, Kamel OW, van de Rijn M, Davis RE, Medeiros LJ, Jaffe ES, Weiss LM. Frequent presence of the Epstein-Barr virus in inflammatory pseudotumor. *Hum Pathol* 1995; 26: 1093-1098
- 21 Tamsel S, Demirpolat G, Killi R, Elmas N. Primary hepatic actinomycosis: a case of inflammatory pseudotumor (case report). *Tani Girisim Radyol* 2004; 10: 154-157
- 22 Milne AN, Sweeney KJ, O'Riordain DS, Pauwels P, Debiec-Rychter M, Offerhaus GJ, Jeffers M. Inflammatory myofibroblastic tumor with ALK/TPM3 fusion presenting as ileocolic intussusception: an unusual presentation of an unusual neoplasm. *Hum Pathol* 2006; 37: 112-116
- 23 Fisher C. Low-grade sarcomas with CD34-positive fibroblasts and low-grade myofibroblastic sarcomas. *Ultrastruct Pathol* 2004; 28: 291-305
- 24 Norus TP, Filtenborg-Barnkob BE, Edstrom PT. Inflammatory pseudotumour of the liver. *Ugeskr Laeger* 2005; 167: 3698-3699
- 25 Dasgupta D, Guthrie A, McClean P, Davison S, Luntley J, Rajwal S, Lodge JP, Prasad KR, Wyatt JI, Stringer MD. Liver transplantation for a hilar inflammatory myofibroblastic tumor. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 517-521
- 26 纪小龙, 马亚敏. 炎性假瘤的病理学进展. *诊断病理学杂志* 2003; 10: 239-241
- 27 Meis JM, Enzinger FM. Inflammatory fibrosarcoma of the mesentery and retroperitoneum. A tumor closely simulating inflammatory pseudotumor. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 1146-1156
- 28 Cook JR, Dehner LP, Collins MH, Ma Z, Morris SW, Coffin CM, Hill DA. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in the inflammatory myofibroblastic tumor: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1364-1371
- 29 Colakoglu O, Unsal B, Haciyanli M, Tunakan M, Buyrac Z, Yorukoglu G, Yazicioglu N, Genc H. A successfully managed inflammatory pseudotumour of liver without surgery: report of a case. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 382-384
- 30 Druetz P, Cornet P, Rahier J, Horsmans Y. Spontaneous regression of inflammatory pseudotumor of the liver: a case report. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 101-103
- 31 Hussong JW, Brown M, Perkins SL, Dehner LP, Coffin CM. Comparison of DNA ploidy, histologic, and immunohistochemical findings with clinical outcome in inflammatory myofibroblastic tumors. *Mod Pathol* 1999; 12: 279-286

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起,世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>),所有办公流程一律可以在线进行,包括投稿、审稿、编辑、审读,以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在线办公系统注册的用户,将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。(世界胃肠病学杂志社 2007-04-18)

# 肝脏功能重建的细胞来源

张瑞, 郭善禹

张瑞, 郭善禹, 上海交通大学附属第九人民医院普外科 上海市 200011  
上海市第九人民医院2004科学研究基金项目  
通讯作者: 郭善禹, 200011, 上海市制造局路639号, 第九人民医院普外科. guoshuyu@hotmail.com  
电话: 021-63138341  
收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-02-13

## Cell source of liver functional reconstruction

Rui Zhang, Shan-Yu Guo

Rui Zhang, Shan-Yu Guo, Department of General Surgery, the Ninth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China  
Supported by the Scientific Research Foundation of the Ninth People's Hospital Shanghai Municipality during the Year 2004  
Correspondence to: Shan-Yu Guo, Department of General Surgery, the Ninth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China. guoshuyu@sina.com  
Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-02-13

### Abstract

Recent years, various new techniques, such as bioartificial liver system, hepatocyte transplantation and tissue engineering, were being employed to fight against the liver diseases. However, the shortage of liver cells has become a prominent problem. This review focuses on the current research progress of the liver cell differentiation source, and it also discusses the advantages and disadvantages of various hepatic stem cells and nonhepatic stem cells, expecting to provide a reference for liver cell source selection during tissue engineering, an adequate and suitable source for bioartificial liver and hepatocyte transplantation and to help to treat liver diseases.

Key Words: Hepatocyte; Stem cell; Cell differentiation

Zhang R, Guo SY. Cell source of liver functional reconstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1261-1265

### 摘要

生物人工肝、肝细胞移植、组织工程等技术

的开展, 为肝病的治疗开辟了新的途径. 然而, 肝细胞来源短缺已经逐渐成为一个突出的问题. 本文着重论述了目前肝脏细胞的分化来源研究进展情况, 并对各种肝源性和非肝源性干细胞的优缺点进行了讨论, 以期为肝组织工程选择细胞来源提供参考, 为生物人工肝、肝细胞移植提供充足、合适的细胞来源, 协助治疗肝脏疾病.

关键词: 肝细胞; 干细胞; 细胞分化

张瑞, 郭善禹. 肝脏功能重建的细胞来源. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1261-1265  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1261.asp>

### 0 引言

肝脏是一个结构和功能相当复杂的器官. 对于各种终末期肝病, 肝移植是目前唯一理想的治疗方法. 但这个方法同时也面临许多问题: 供体缺乏, 手术和术后管理复杂, 费用高等, 限制了其临床的开展. 因此, 一些其他治疗方法, 包括生物人工肝, 细胞移植, 组织工程构建等有蓬勃发展的趋势. 随着这些技术的开展, 肝细胞的临床需求逐步扩大, 但肝细胞来源仍是问题. 大多数肝脏疾病都是由于“肝细胞功能异常”最终导致肝功能衰竭, 用干细胞替代病态的肝细胞成为目前肝脏导向的细胞治疗的主要目标. 目前, 对于各种来源干细胞分化为肝细胞已有很深入的研究, 有望给肝病治疗带来新的飞跃.

### 1 肝源性干细胞

1.1 成熟肝细胞 过去曾认为, 肝细胞是终末分化细胞, 事实上他属于单向潜能的干细胞, 具有很强的增殖能力, 平时处于静止期, 一定的刺激可引起肝细胞激活与增殖. Sell<sup>[1]</sup>推测, 肝脏由3种细胞系组成: 干细胞、前体细胞和成熟细胞. 肝脏受到损害如部分肝切后门静脉和中央静脉周围的肝细胞早期就通过自我复制来修复, 当受到更严重的损伤后才会启动干细胞的分化, 这说明肝细胞本身就是有功能的干细胞, 具有很

### ■背景资料

用干细胞替代病态的肝细胞成为目前肝脏导向的细胞治疗的主要目标. 本文主要就目前研究较多的一些可分化为肝细胞的干细胞进行了论述及对比, 以期为肝组织工程选择合适的种子细胞提供参考.



## ■同行评价

本文对目前各种肝源性和非肝源性干细胞的来源和优缺点进行了综述,文献复习较为充分,层次清楚,可读性好,基本上反映了目前在该方面的研究进展,具有科学性和实用性。

强的再生能力,即使切除肝脏的2/3,剩余的细胞只要通过2-3个细胞周期便可增殖达到术前水平,正常肝脏大约每年更新一次<sup>[2]</sup>。然而,成熟肝细胞的体外培养有很大难度,包括体外培养时表型的丧失和增殖能力受限等<sup>[3]</sup>,因此其应用前景受到一定限制。

1.2 卵圆细胞 Fausto<sup>[4]</sup>发现,当动物接触化学致癌物时,肝脏最早的细胞反应是位于门管区周围的小细胞的增殖,这种细胞胞质少,胞核卵圆形,因此将其命名为“卵圆细胞(oval cell)”。卵圆细胞是分布在胆小管(称之为Hering管,即小叶间胆管)周围的肝干细胞,具有双分化潜能:分化为肝细胞和胆管上皮细胞。卵圆细胞表达的标志物主要有中间丝波形蛋白(vimentin),增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、细胞角蛋白7(cytokeratin7, CK7)、CK8、CK18、CK19、OV6等。He *et al*<sup>[5]</sup>采用特异的酶消化法和Percoll液密度梯度离心后可获得比较纯的、活力很高的卵圆细胞,这些细胞可以同时表达成熟肝细胞标记物白蛋白和胆管上皮细胞标记物CK19、CK7,表明其具有双分化潜能。严重的肝损伤(毒素、致癌物或手术刺激)可以激活卵圆细胞,分化为肝细胞和胆管上皮细胞,有趣的是这些细胞也表达c-kit, flt-3, Thy-1, CD34等造血细胞相关抗原<sup>[6]</sup>。也有报道称卵圆细胞还可以分化为非肝系细胞:肠上皮和胰腺上皮细胞<sup>[7]</sup>。

卵圆细胞已有理想的体外培养方法,成纤维细胞分泌的细胞外基质(层黏连蛋白、纤维连接蛋白、I和IV型胶原等成分)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等对于维持卵圆细胞的增殖和分化潜能都很重要<sup>[5]</sup>。

1.3 小肝细胞 Mitaka *et al*<sup>[8]</sup>在培养成年大鼠肝细胞时发现,一些单核细胞形成小的集落,周围以成熟肝细胞,这些细胞的局部克隆呈低分化表型,免疫组化和超微结构观察均显示其有肝细胞特征,这种细胞只有成熟肝细胞的1/3-1/2大小,因此称之为“小肝细胞(small hepatocytes, SHs)”,这种小细胞有很强的增殖能力,在含有表皮生长因子的培养基中培养,每个小肝细胞的克隆中出现胞质丰富的细胞,含较多线粒体和过氧化物酶体,类似典型的成熟肝细胞,因此推测小肝细胞是一种干细胞,可以分化为成熟

肝细胞。然而,他们在肝脏内的确切定位尚不清楚。小肝细胞作为一种肝前体细胞可以从啮齿类动物和人的肝脏中分离出,将小肝细胞和新鲜成熟肝细胞(primary fresh hepatocytes, FHs)移植入大鼠体内对比,植入细胞数SHs组少于FHs组,移植后12 wk检测受体组织及血清白蛋白水平,发现SH和FH有相似的肝再生功能,白蛋白水平接近,这些结果表明,SH可以作为一种新的细胞来源替代FH做肝细胞移植<sup>[9]</sup>。

Gordon *et al*<sup>[10]</sup>从倒千里光碱(retrorsine)处理过的、部分肝切的大鼠模型中分离出小肝细胞,检测发现甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)阳性,OV6阴性,再注射入同系大鼠肝脏内,这些细胞植入后可表达白蛋白、转铁蛋白,不表达AFP,且部分肝切后可以发生增殖。最近研究显示,人小肝细胞培养2 mo后仍可保持高增殖潜能,克隆细胞表达肝细胞和胆管上皮细胞的特异蛋白<sup>[11]</sup>,表明其也有双向分化潜能,并且较长时间的深低温保存后仍可以保持其增殖能力和分化能力,可有60%的细胞存活,并有分泌白蛋白的功能<sup>[12]</sup>。而成熟肝细胞体外增殖能力较差,最多存活2-3 wk,而且1 wk后就会丧失其分化表型,并且肝细胞的深低温保存效果也不能令人满意。因此,小肝细胞有逐渐替代成熟肝细胞移植的趋势。

## 2 非肝源性干细胞

随着再生医学的发展,许多研究者把目光转向一些向肝脏分化的非肝源性细胞,目前主要研究有以下几种干细胞:

2.1 骨髓间充质干细胞 骨髓中存在两种干细胞,造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSCs)和间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。前者在各种集落刺激因子作用下,向红系、粒系、淋巴系细胞分化,维持体内造血功能;骨髓间充质干细胞是1987年由Friedenstein *et al*<sup>[13]</sup>发现的一种可以贴附于塑料培养板表面的成纤维细胞样细胞,存在于骨髓基质,又称“骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)”。他有两个重要功能:分泌骨髓基质,提供造血微环境;在合适的环境和诱导因子存在下,分化为成熟的间质细胞,如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、血管内皮细胞等。BMSCs主要标记物有CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, SH-2和SH-3等,不表达造血系特异的CD13, CD34, CD45, CD133等<sup>[14]</sup>。研究MSC的细胞周期

发现, MSC中有90%处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期<sup>[15]</sup>, 说明MSC具有很大的增殖潜能. Petersen *et al*<sup>[16]</sup>最先在小鼠肝损伤模型中发现, 将♂鼠骨髓移植入致死剂量照射的同系♀鼠体内可在供体肝内发现部分肝细胞表达Y染色体基因. Theise *et al*<sup>[17]</sup>进行了临床研究, 发现女性白血病患者接受男性骨髓移植治疗后, 其肝脏中部分细胞同时表达肝细胞标志及Y染色体; 男性严重肝病患者接受女性全肝移植后, 移植的肝脏中部分细胞同时表达肝细胞标志及Y染色体. Oh *et al*<sup>[18]</sup>最先将HGF应用于体外诱导骨髓干细胞向肝系细胞的转化, 并在诱导后的细胞中检测到了AFP、白蛋白、CK8和CK18、c-met等肝系细胞的标志, 说明HGF可作为体外诱导骨髓间质干细胞向肝系细胞转化的诱导因子. Schwartz *et al*<sup>[19]</sup>报道, 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor-4, FGF-4)和HGF可以促进体外培养的成年小鼠、大鼠及人的骨髓间质干细胞向肝细胞分化. 因此, 骨髓干细胞已经被认为是肝脏再生除肝细胞和肝干细胞外重要的细胞来源. 但是, 从患者身上抽取骨髓是一种有创性操作, 此外, 细胞的数量和分化潜能也会随着年龄的增长逐渐下降<sup>[20]</sup>.

**2.2 脂肪干细胞** 脂肪组织像骨髓一样, 来源于胚胎的间质, 含有一种容易分离的支持基质. Zuk *et al*<sup>[21]</sup>发现, 在脂肪组织基质中也存在有干细胞, 这种细胞群称之为脂肪组织提取细胞(processed lipoaspirate cells, PLA cells), PLA细胞可以从脂肪组织中大量分离, 并表现出稳定的生长和增殖能力. 分离出单个PLA细胞形成的克隆, 发现这些细胞像BMSc一样, 有自我更新和诱导分化为各种间质组织的能力, 包括软骨细胞、脂肪细胞、成骨细胞、肌细胞、上皮细胞等. 为了证实脂肪组织含有干细胞, 对PLA细胞群进行了分子和生化分析, 发现PLA细胞表达一些与BMSCs相同的CD抗原: 表达CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, SH2和SH3, 不表达CD14, CD16, CD31, CD34, CD45, CD56, CD62e和CD104, 此外, PLA细胞还表现出不同于MSCs的特征, 包括一些不同的CD标记和基因表达, 如PLA细胞表达CD49d, 不表达CD106, 与MSCs恰好相反. PLA还可向神经细胞分化, 表明其还有外胚层分化的潜能, 因此称这种细胞为脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs). Seo *et al*<sup>[22]</sup>用HGF和OSM(IL-6家族成员, 有促肝细胞生长、细胞分化、胆小管形成和白蛋白分泌作

用)体外诱导脂肪基质细胞hADSCs向肝系细胞分化, 并用RT-PCR和免疫细胞化学均可检测到AFP和ALB的表达, 分化细胞有摄取LDL和分泌尿素的功能; 将hADSC移植于CCl<sub>4</sub>肝损伤SCID小鼠模型体内也发现其可分化为肝细胞. 李绍青 *et al*<sup>[23]</sup>从吸脂术所得的脂肪抽吸液中分离出干细胞, 用含有HGF和FGF-4的条件培养基将其向肝细胞样细胞诱导分化, 并利用RT-PCR及免疫荧光的方法检测到了分化后的细胞表达肝系细胞的标志物且具有一定的肝细胞功能.

**2.3 脐带血干细胞** 有报道称, 脐带血较外周血含有更多的造血祖细胞, 但是MSCs的存在仍然没有定论, Erices *et al*<sup>[24]</sup>从脐带血细胞(umbilical cord blood cells, UBCs)中分离培养有核细胞, 这些单核细胞呈成纤维细胞样, >85%的细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并且表达一些MSC相关抗原: CD13, CD29, CD49e, CD54, CD90, SH2, SH3, SH4和ASMA( $\alpha$ -smooth muscle actin)等, 不表达CD14, CD34, CD45, CD49d, CD106和CD31等. 这些细胞不仅可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、而且可以分化为神经胶质细胞和肝细胞样细胞<sup>[25]</sup>, 因此称这种来源于UBCs的单核细胞为间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells, MPC). 临床上, UBCs植入各种造血系统疾病患者, 其疗效已经得到广泛的认可, 因此, UBCs很有希望像BMSCs一样, 成为肝祖细胞来源. Teramoto *et al*<sup>[26]</sup>将来源于UBCs的有核细胞用含HGF, FGF-1, FGF-2的条件培养基诱导培养1 wk后, 可以检测到白蛋白mRNA, 3 wk后免疫染色检测到ALB和CK19阳性细胞, 部分细胞双重表达, 表明肝祖细胞的存在, 类似于卵圆细胞, 有双向分化潜能. Di Campli *et al*<sup>[27]</sup>将UBCs移植于SCID小鼠肝损伤模型, 发现UBCs表达肝细胞标志物, 处理组和对照组死亡率为22%比67%.

**2.4 胚胎干细胞** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是来源于哺乳动物胚泡内细胞群的一群未分化的有无限增殖能力和多向分化潜能的细胞, 核质比高, 核仁丰富, 表达高水平的端粒酶活性<sup>[28]</sup>. ESCs可被诱导分化为各种组织, 有向3个胚层方向分化的潜能, 包括: 肠上皮细胞(内胚层); 软骨细胞, 成骨细胞, 平滑肌细胞, 横纹肌细胞(中胚层); 神经细胞, 鳞状上皮细胞(外胚层). 人ESCs表达阶段特异性胚胎抗原-3(stage-specific embryonic antigen-3, SSEA-3), SSEA-4等特异抗原. 胚胎干细胞分化为肝细胞样细胞已有很多报道, Teramoto *et al*<sup>[26]</sup>将培养

的♂鼠胚胎细胞移植入♀鼠体内,受体鼠肝脏取出免疫组化染色白蛋白,荧光原位杂交Y染色体,可以发现两者均为阳性的细胞在♀鼠肝内表达,因此认为这些表达白蛋白的肝细胞样细胞是由♂鼠ESCs分化而来。Kuai *et al*<sup>[29]</sup>将维甲酸(retinoic acid, RA)、HGF、神经生长因子( $\beta$ -nerve growth factor,  $\beta$ -NGF)加入细胞培养液,诱导后的细胞形态似肝细胞,免疫细胞化学染色显示AFP阳性表达,RT-PCR显示有白蛋白、甲状腺激素结合蛋白、葡萄糖6磷酸酶、肝核因子-4表达,这些物质只有有功能的肝细胞才表达。尽管ES来源细胞有很强的组织再生功能,是一个很有效的细胞来源,但是其临床应用确受到伦理问题限制,UCB(umbilical cord blood)来源细胞就不会受此影响,因为收集细胞时,他经常是作为医疗废弃物,而且对供体没有损害。

总之,当前细胞移植及组织工程已经成为终末期肝病治疗的研究热点。干细胞由于具有自我更新能力强,长期保持活性及多向分化潜能的特点,因而有很好的应用前景。再生医学已经成为本世纪医学的一个大热门,虽然分化为一个完整的器官还是个梦想,但是各种干细胞分化来的细胞移植已经变为现实。Ogawa *et al*<sup>[30]</sup>将鼠小肝细胞和非实质细胞共同培养后制成单层细胞板铺于肝损伤模型大鼠的大网膜上,并卷曲构造一个血管化的三维肝脏组织,定期取出移植物检测发现肝细胞层次明显增多,并发现有小胆管样结构生成。因此,将来构造出有功能的组织工程化肝脏将不是没有可能。

### 3 参考文献

- Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738-750
- Steiner JW, Perz ZM, Taichman LB. Cell population dynamics in the liver. A review of quantitative morphological techniques applied to the study of physiological and pathological growth. *Exp Mol Pathol* 1966; 5: 146-181
- Kim BK, Chung KW, Sun HS, Suh JG, Min WS, Kang CS, Sim SI, Shin WS, Kim CC. Liver disease during the first post-transplant year in bone marrow transplantation recipients: retrospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 193-197
- Fausto N. Oval cells and liver carcinogenesis: an analysis of cell lineages in hepatic tumors using oncogene transfection techniques. *Prog Clin Biol Res* 1990; 331: 325-334
- He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and *in vitro* proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 2004; 37: 177-187
- Alison M. Hepatic stem cells. *Transplant Proc* 2002; 34: 2702-2705
- Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10: 1249-1256
- Mitaka T, Mizuguchi T, Sato F, Mochizuki C, Mochizuki Y. Growth and maturation of small hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 Suppl: S70-77
- Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K. Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 78-87
- Gordon GJ, Butz GM, Grisham JW, Coleman WB. Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats. *Transplantation* 2002; 73: 1236-1243
- Hino H, Tateno C, Sato H, Yamasaki C, Katayama S, Kohashi T, Aratani A, Asahara T, Dohi K, Yoshizato K. A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 184-191
- Ikeda S, Mitaka T, Harada K, Sugimoto S, Hirata K, Mochizuki Y. Proliferation of rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *J Hepatol* 2002; 37: 7-14
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 263-272
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67-73
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-1122
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source

- of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295
- 22 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264
- 23 李绍青, 管利东, 王槁芳, 白慈贤, 岳慧敏, 闫舫, 南雪, 施双双, 司徒镇强, 裴雪涛. 人脂肪来源的干细胞体外培养特性及分化为肝细胞样细胞的研究. *自然科学进展* 2006; 16: 421-426
- 24 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242
- 25 Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-1675
- 26 Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, Kakinuma S, Chinzei R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teraoka H, Arai S. Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 196-202
- 27 Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 603-613
- 28 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147
- 29 Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 2003; 9: 1094-1099
- 30 Ogawa K, Ochoa ER, Borenstein J, Tanaka K, Vacanti JP. The generation of functionally differentiated, three-dimensional hepatic tissue from two-dimensional sheets of progenitor small hepatocytes and nonparenchymal cells. *Transplantation* 2004; 77: 1783-1789

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

**本刊讯** 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与世界华人消化杂志社合作举办“原位肝移植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座。

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平。本中心已举办三期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术。本项目为2007年国家级继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分。授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙型肝炎治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面。学习对象为省级、地市级医院的医护人员。

收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心 邮编: 510630 联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying\_827@163.com.



# 急性胰腺炎与氧化应激

王艳红, 冯志杰, 郝晓

## ■背景资料

急性胰腺炎的发病机制目前并不十分清楚, 氧化应激在急性胰腺炎发病机制中的作用以及抗氧化治疗是当前研究的热点, 因此探讨急性胰腺炎与氧化应激的关系具有重要的临床意义。

王艳红, 冯志杰, 郝晓, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

通讯作者: 冯志杰, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科. zhijiefeng2005@126.com

电话: 0311-87222951

收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-08

## Relationship between acute pancreatitis and oxidative stress

Yan-Hong Wang, Zhi-Jie Feng, Xiao Hao

Yan-Hong Wang, Zhi-Jie Feng, Xiao Hao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@126.com

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-08

## Abstract

Under the imbalance between generation of reactive oxygen species and inadequate antioxidant defense systems, oxidative stress can cause cell damage either directly or indirectly through altering signaling pathways. It is the etiopathogenesis and also the consequence of many diseases. Oxidative injury plays an important role not only in the pathogenesis of acute pancreatitis (AP) but also in pancreatitis-induced damages of other organs such as heart, liver, lung, kidney, alimentary canal and so on. Oxidative stress can produce a higher level of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which induce inflammatory reaction and microcirculation disturbance, and cell necrosis or apoptosis, leading to pancreatic inflammation and multiple organ dysfunction syndromes. The antioxidants can decrease the production of oxygen free radicals (or directly scavenge them), protect the antioxidant enzyme activity, reinforce the antioxidative capacity of bodies, and consequently play an obvious therapeutic effect on AP.

Key Words: Acute pancreatitis, Oxidative stress

Wang YH, Feng ZJ, Hao X. Relationship between acute pancreatitis and oxidative stress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(11):1266-1272

## 摘要

氧化应激是在机体内活性氧生成和抗氧化物质失衡状态下, 直接或间接通过信号转导通路引起细胞的损伤, 是许多疾病的病因, 同时又是许多疾病发生、发展的结果。研究表明, 氧化应激在急性胰腺炎的发病中发挥重要作用, 还与胰腺炎时胰腺外器官, 如心、肝、肺、肾、消化道等的损伤有密切联系。氧化应激产生大量的活性氧和活性氮, 引起炎症反应及微循环障碍, 通过不同途径引起细胞坏死或凋亡, 造成胰腺及其他脏器的功能障碍甚至衰竭。抗氧化剂可减少氧自由基的产生或直接清除机体产生的氧自由基, 并增强机体的抗氧化能力, 对急性胰腺炎具有较好的治疗作用。

关键词: 急性胰腺炎; 氧化应激

王艳红, 冯志杰, 郝晓. 急性胰腺炎与氧化应激. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1266-1272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1266.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由于多种原因引起的胰腺自身消化性疾病, 急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)由于并发多脏器功能衰竭, 病情凶险, 常常危及患者的生命。氧化应激(oxidative stress)是在机体内活性氧生成和抗氧化物质失衡状态下, 直接或间接通过信号转导通路引起细胞的损伤<sup>[1]</sup>, 是许多疾病的病因, 同时又是许多疾病发生、发展的结果。目前研究表明, 氧化应激在AP的发病中发挥重要作用, 还与胰腺炎时胰腺外器官的损伤有密切的联系<sup>[2]</sup>。本文就氧化应激对AP的影响作一综述。

## 1 氧化应激的概念

氧化应激是由活性氧(reactive oxygen species,

ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的大量生成,或机体内源性抗氧化保护能力下降引起的组织氧化损伤过程.在很多危重疾病中,如脓毒血症、烧伤、AP、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、艾滋病(AIDS)及肺损伤等,都会出现ROS, RNS增加和抗氧化能力下降<sup>[3]</sup>. ROS, RNS的大量产生在炎症和休克方面起着重要作用<sup>[4]</sup>.既往认为,ROS, RNS是有害物质,但近来的研究指出,这些物质作为强大的信使分子与基因调节有关<sup>[5]</sup>,他可以参与蛋白磷酸化、钙离子信息传递及转录因子激活等过程<sup>[5]</sup>,可以广泛参与细胞生长、转化、凋亡及衰老等途径的调节<sup>[6]</sup>. Martin *et al*<sup>[7]</sup>通过研究表明,ROS具有双重作用,低剂量可影响细胞信号传递,而大剂量可损伤DNA,因而认为ROS剂量是决定细胞反应的关键指标,用小剂量ROS刺激细胞,其信号传递系统被激活,当ROS浓度过高时,会对生物大分子DNA、蛋白质和脂质等造成损伤.

生物膜中含有多不饱和脂肪酸,极易受ROS的进攻发生脂质过氧化(lipid peroxidation),脂质过氧化是不饱和脂肪酸氧化降解的链反应过程,有启动、延伸、终止3个阶段.脂质过氧化过程的延伸阶段产生多种自由基,如脂过氧自由基、脂氧自由基和脂自由基.终止阶段产生多种小分子产物,如丙二醛(malondialdehyde, MDA)等,这些产物可以引起多种细胞功能的损伤,并且和多种疾病的发生、发展有密切关系,是疾病早期严重程度的一个重要的标志物<sup>[8]</sup>.氧化应激产生的大量ROS可通过不同途径引起细胞坏死或凋亡:(1)引起线粒体功能紊乱,类脂膜及溶酶体膜破坏<sup>[9]</sup>;(2)破坏细胞质Ca<sup>2+</sup>内环境的稳定<sup>[10]</sup>,引起细胞内Ca<sup>2+</sup>超载.自由基引起的细胞膜脂质过氧化增强,使膜的液态性和流动性减弱,通透性增强,细胞外Ca<sup>2+</sup>内流增加导致细胞死亡<sup>[11]</sup>;(3)导致胰腺腺泡细胞线粒体膜上的凋亡相关基因Bax基因<sup>[12]</sup>和p53基因<sup>[13]</sup>活化及细胞色素C释放;(4)活化氧化应激敏感的转录因子核因子-κB(nuclear factor kappaB, NF-κB)<sup>[14-18]</sup>;(5)激活c-Jun氨基末端激酶(JNK)和p38丝裂原活化的蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)通路<sup>[19-20]</sup>;(6)激活CD95受体,诱导细胞凋亡<sup>[21]</sup>;(7)诱导炎症介质的产生.

## 2 氧化应激在AP中的作用

### 2.1 氧化应激对胰腺组织的影响 AP是一种炎症

反应所致的胰腺腺泡细胞损伤、间质水肿和出血,并且可以导致局部和全身并发症<sup>[14]</sup>.各种因素如胆结石、酒精、局部缺血、遗传等因素似乎都首先影响胰腺腺泡细胞<sup>[22]</sup>,引起胰腺腺泡细胞胰酶的激活,随着胰蛋白酶原被激活转化为胰蛋白酶,诱发局部炎症反应,炎性介质产生,多核中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞释放溶酶体酶、氧自由基(oxygen free radicals, OFR)、血管活性物质和促炎反应介质<sup>[9]</sup>.在AP发展中,OFR及其衍生物作为分子起源在胰腺损伤的过程中起重要作用,其中过氧化氢、超氧化物、羟基及单态氧(singlet oxygen)是造成细胞损害的主要因素,这些高度的活化物质可通过脂肪酸过氧化作用造成的类脂膜破坏及溶酶体膜破坏.OFR可激活补体,促进白细胞黏附、活化和迁移<sup>[23]</sup>,能够损伤内皮细胞的完整性,增加毛细血管的通透性,造成循环血量的丢失,引起微循环障碍,加重胰腺损伤<sup>[24]</sup>.循环中产生的OFR破坏毛细血管内皮,在加速AP的进程中发挥作用<sup>[9]</sup>.在AP的炎症应答过程中,致炎因子和氧化应激发挥协同作用,致炎因子和氧化应激触发共同的信号传导通路,主要通过MAPK和NF-κB激活,导致了炎症的级联扩增<sup>[14]</sup>. Urunuela *et al*<sup>[25]</sup>对胰胆管阻塞诱导的大鼠AP模型进行了研究,结果表明,在AP早期,胰腺腺泡OFR产生明显增加,同时胰腺谷胱甘肽(glutathione, GSH)明显减少,脂质过氧化反应在胰胆管阻塞6 h后明显增强,表明细胞的抗氧化作用减弱. Ramudo *et al*<sup>[26]</sup>研究显示,于胰胆管阻塞后6 h腺泡细胞产生TNF-α,此时胰腺发生的氧化应激反应最强烈,直到AP发生12 h后,单核细胞才产生TNF-α,认为TNF-α是AP早期转录水平增加较早的细胞因子,能促进炎症部位白细胞聚集和活化,活化的白细胞又可产生大量OFR.因此,致炎因子特别是TNF-α和氧化应激在AP中的相互作用形成了一个恶性循环<sup>[14]</sup>. Keck *et al*<sup>[27]</sup>的研究发现,在AP存在器官灌注急剧减少及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达增加,通过氧自由基清除剂二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)治疗后,能明显改善胰腺微循环,减少了ICAM-1表达和随后白细胞黏附.在大鼠AP中通过电镜观察发现,胰腺腺泡细胞内空泡形成、线粒体损伤、内质网膨胀、核染色质聚集,向核膜靠拢,其胰腺损伤伴随着组织中MDA水平的增加,以及过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(gluta-

### ■创新盘点

本文从氧化应激入手,总结了近5 a来国内外的研究情况,多方面探讨氧化应激在急性胰腺炎发病中的作用机制和不同抗氧化剂对急性胰腺炎的治疗作用.

## ■应用要点

目前对于急性胰腺炎的抗氧化治疗还主要集中在动物实验上,但其临床疗效尚有待于进一步证实,抗氧化治疗为今后急性胰腺炎的临床治疗提供了一个新的思路。

thione peroxidase, GPx)活力和总GSH水平下降<sup>[28]</sup>。由此可见,氧化应激在AP的发病中有重要作用,通过测定氧化应激指标可以反映疾病的严重程度。此外, Yoo *et al*<sup>[29]</sup>通过对大鼠慢性纤维化胰腺炎给予抗氧化剂DA-9601进行治疗后可以看出,氧化应激在慢性纤维化胰腺炎发病中也起着重要的作用。

**2.2 氧化应激对胰腺外主要器官的影响** AP最初局限在胰腺,随着疾病的发展可导致局部和全身并发症<sup>[14]</sup>,甚至多脏器功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),其中微循环障碍和ROS生成是两个重要的发病机制。早期产生的炎性介质诱发胰腺局部和胰腺外器官的细胞损伤,ROS是这些炎症介质的代表。在胰腺炎相关的MODS中,ROS直接造成细胞损伤,并调节细胞间的信号传导,并与白细胞活化、细胞因子产生、内皮功能障碍及微循环功能障碍有关。ROS除了影响细胞间的信号传导外,还影响细胞内的功能,激活转录因子NF- $\kappa$ B,从而调节炎症因子的表达<sup>[30]</sup>。在SAP,腹腔产生大量的胰腺炎相关性腹水(pancreatitis-associated ascitic fluids, PAAF),渗出物中含有多种被激活的酶类和具有生物活性的有毒物质,这些物质被吸收入血,激活单核巨噬细胞系统,释放各种炎性介质、细胞因子,引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),并相继出现休克、ARDS、心、肝、肾、消化道功能障碍甚至衰竭。(1)肝脏。肝脏是人体清除OFR的“门户”,肝脏内产生大量的还原型GSH发挥抗氧化作用。AP的多脏器损害以肝损害发生较早、更常见,肝损害的发生率和肝细胞受损程度与胰腺炎病情的轻重呈正相关<sup>[31]</sup>,其原因主要是胰腺与肝脏在解剖位置、生理功能和血流动力学方面关系密切。胰腺炎时,释放的各种炎症介质、毒性物质、OFR等均会导致肝细胞变性坏死和肝小叶细胞内线粒体、溶酶体破坏,使ATP合成障碍,磷酸化作用受阻,造成肝脏对营养物质、酶代谢和毒性产物清除等功能异常。临床上轻者可有胆红素和谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等酶的增高,重者则出现肝性脑病、低蛋白血症、凝血功能障碍甚至肝功能衰竭等。Esrefoglu *et al*<sup>[2]</sup>的研究表明,在蛙皮素诱导的AP大鼠中,胰腺和肝脏损伤与组织中MDA水平明显升高和CAT, GPx活力显著降低相关,并可以看到肝细胞变性、细胞内空泡形成、血管聚集、窦状扩张及炎症浸润。

Folch-Puy *et al*<sup>[32]</sup>研究发现,在AP中血浆TNF- $\alpha$ 水平增加, TNF- $\alpha$  mRNA在肝脏中严重过度表达,并伴有NF- $\kappa$ B的激活,通过原位杂交法显示, TNF- $\alpha$ 的过度表达主要集中在肝细胞,另外胰腺炎相关蛋白作为一种胰腺应激蛋白在AP中过度表达,通过他的释放可诱导肝脏TNF- $\alpha$ 表达及随后循环中TNF- $\alpha$ 水平增加;(2)肺脏。ARDS是SAP常见并发症,其临床表现为低氧和呼吸困难,ARDS与早期出现的循环衰竭将导致氧输送障碍,是患者死亡的重要原因。SAP因感染(内毒素)、休克等活化补体,激活分叶核细胞、单核巨噬细胞、肺泡上皮细胞和内皮细胞等,释放一系列介质和酶,包括OFR、血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、白三烯、血小板活化因子(PAF)、IL-2、TNF- $\alpha$ 及溶酶体酶等,导致肺泡上皮细胞和内皮细胞损伤,其中II型肺泡细胞在ARDS早期即受损,致表面活性物质合成减少或功能降低,导致肺泡表面张力增高和肺顺应性下降,发生肺泡水肿,这是SAP容易发生ARDS的机制之一。此外,胰蛋白酶等溢出消化道,可经门静脉、体循环及淋巴途径进入肺循环,直接损伤肺毛细血管和I, II型肺泡细胞,大量炎性介质进入体循环,导致全身广泛性损伤,最后出现MODS。Granell *et al*<sup>[33]</sup>研究表明,AP早期ARDS的发生与血液中促炎介质释放有关,在肺上皮细胞诱导P-选择蛋白(P-selectin)表达,这种表达与通过循环中的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)产生的超氧化物自由基有关。有实验证明OFR可以促进内源性ICAM-1表达,AP时大鼠肺组织ICAM-1基因过度表达,且与AP合并急性肺损伤的严重程度具有相关性<sup>[34]</sup>,生成大量的炎性因子和炎症递质,刺激肺血管内皮细胞表达黏附分子,如P-选择素(P-selectin)和E-选择素(E-selectin),促进中性粒细胞浸润,造成胰腺和肺组织损伤<sup>[35-36]</sup>。一方面,ICAM-1高表达可显著减少胰腺和肺毛细血管血流量,增加毛细血管通透性,降低毛细血管血流速度,引起胰腺和肺脏微循环障碍<sup>[37]</sup>;另一方面,ICAM-1高表达可诱导中性粒细胞在肺脏聚集,导致肺损伤<sup>[38]</sup>。Osman *et al*<sup>[39]</sup>通过兔胰管逆行注射50 g/L鹅脱氧胆酸和导管结扎诱导AP,能够产生大量的IL-8,30 min后给予IL-8 mAb WS-4处理,3-4 h后,血清中IL-8和TNF- $\alpha$ 明显下降,肺中CD11b和CD18阳性细胞数量和中性粒细胞浸润显著减少,认为IL-8在介导AP肺损伤中发挥着重要的作用;(3)肾脏。SAP时胰腺外器官损伤中肾功能障碍(胰性肾病)发生率约14%-43%,发

展至急性肾功能衰竭后死亡率高达71%-84%<sup>[40]</sup>. SAP肾损害的主要形态学表现为不同程度的肾小管上皮细胞变性坏死、肾小球淤血缺血、肾小管蛋白管型或红细胞管型, 以及中性粒细胞浸润. Gilgenast *et al*<sup>[41]</sup>研究表明, 给予30 g/L和50 g/L牛磺胆酸钠胰胆管内注射诱导AP后, 肾内MDA急剧升高, 说明氧化应激在SAP肾损伤中发挥了重要作用. 肾脏氧供应丰富, ROS产生机会较多, 和其他器官一样, 应激状态时肾脏内抗氧化酶功能降低, 脂质过氧化物堆积, ROS生成和清除平衡受到破坏. TNF- $\alpha$ 在SAP发展过程中, 可诱导IL-1 $\beta$ 和IL-6的产生, 并作用内皮细胞使其血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)活性降低, 加重肾缺血和形成血栓, 还能激活炎症细胞和一氧化氮(nitric oxide, NO)与OFR释放, 直接造成肾组织损害; (4)肠道. AP早期由于应激反应的发生, 为保证心脑血管等重要器官的血供, 肠壁血供减少, 肠黏膜灌注降低, 导致黏膜缺血、绒毛顶端细胞坏死脱落, 黏膜通透性增强, 免疫屏障功能下降, 引起肠道黏膜功能损害、细菌过量繁殖和大量内毒素产生, 发生肠道细菌移位, 激发MODS和SIRS. 小肠易发生缺血再灌注损伤是因为小肠血管内皮中的XO和黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XD)活性在体内各脏器中是最高的, 再灌注时易产生大量OFR, 造成肠道的氧化性损害; (5)心血管. AP心血管损害包括心功能改变、心律失常、休克、中毒性心肌炎、心包炎、心肌梗死等, 由于血管通透性增强, 胰腺区及腹腔广泛出血、渗出可导致有效循环血量不足, 发生心功能不全或休克. ROS可通过对Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP酶本身直接的损伤及对Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP酶所处微环境的改变, 导致Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP酶活力下降<sup>[42]</sup>. 细胞内产生的ROS所引起的继发性氧化应激反应对心肌细胞凋亡的发生也起着重要的作用<sup>[43]</sup>. OFR可以使细胞膜脂质过氧化、蛋白质变性、酶失活、细胞内DNA链断裂, 从而诱导细胞凋亡, 而抑制凋亡的基因Bcl-2主要分布于线粒体内膜、细胞内膜表面、核膜等膜结构, OFR使Bcl-2基因受阻, 进一步促进心肌细胞的凋亡<sup>[44]</sup>.

### 3 抗氧化治疗

AP氧化应激损害是OFR产生增加和抗氧化能力减弱的结果, 抗氧化剂可减少OFR产生或直接清除机体产生的OFR, 并增强机体的抗氧化能力.

#### 3.1 非酶性抗氧化剂 目前, 常用的非酶性抗氧化

剂有: 抗坏血酸维生素C、维生素E、甘露醇、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)等. 他们单用或联合应用能减少AP及其并发症的死亡率, 减轻细胞损害, 改善微循环, 减少组织脂质过氧化反应. 抗坏血酸维生素C和维生素E属于阻断性抗氧化剂, 已广泛用于各种疾病的抗氧化治疗. NAC作为一种黏液溶解剂, 在临床上主要用于治疗呼吸系统疾病. 近年来, 在AP实验动物应用NAC治疗, 可明显减轻胰腺组织损伤<sup>[2,28,45-46]</sup>及全身器官损伤. Sevillano *et al*<sup>[47]</sup>在阻断胰管制备AP的研究中, 通过测量MDA水平, 发现NAC可以在AP早期避免GSH降解, 防止胰腺细胞过氧化损伤, 并保持胰腺细胞内Ca<sup>2+</sup>内环境稳定, 防止胰腺的损伤. NAC还可以通过抑制ROS生成来抑制NF- $\kappa$ B活性, 进而减轻胰腺损伤<sup>[45]</sup>. Ramudo *et al*<sup>[46]</sup>通过建立大鼠AP的研究, 显示胰腺腺泡细胞TNF- $\alpha$ 产生明显增多, 6 h后促炎反应减弱, 胰胆管阻塞3 h后, 腺泡细胞无法产生IL-10, 而在NAC(50 mg/kg)治疗组, 维持和提高了AP早期胰腺细胞产生IL-10的能力, 减轻了腺泡细胞氧化性损伤. Esrefoglu *et al*<sup>[28]</sup>研究表明, 抗坏血酸维生素C和NAC联合治疗, 可有效的保护蛙皮素诱导的大鼠胰腺炎胰腺腺泡细胞的结构和组织抗氧化酶活性, 从而减轻胰腺损伤.

3.2 褪黑激素(melatonin, MLT) MLT是由松果体分泌的一种神经内分泌激素, 能有效清除羟自由基, 是目前发现的最强的羟自由基清除剂, 早期的实验证明, MLT清除羟自由基的能力高于GSH、甘露醇, 清除过氧化基团的能力强于维生素E. MLT还能通过改变SOD、GPx等酶活性, 提高机体抗氧化能力. MLT可能因其自由基清除和抗氧化活性, 包括对组织中性粒细胞浸润的抑制起到保护作用<sup>[48]</sup>, 已广泛用于实验性大鼠胰腺炎的治疗. 在蛙皮素诱导的大鼠AP中, 应用MLT治疗后, 能减少了局部PGs的生成, 且大剂量比小剂量更有效<sup>[49]</sup>. Esrefoglu *et al*<sup>[50]</sup>研究表明, 给予MLT治疗后, 通过观察脂质过氧化反应数量改变和抗氧化物酶如SOD, CAT, GPx和GSH水平变化, 认为MLT可有效减轻胰腺损伤. Munoz-Casares *et al*<sup>[51]</sup>研究了MLT腹腔注射对缺血再灌注损伤造成大鼠AP的影响, 通过测定氧化应激指标(SOD、CAT、GSH、脂过氧化物等)及腺体外分泌功能(脂肪酶、淀粉酶等), 认为MLT能够阻止氧化应激发生和组织损伤, 促进胰腺功能恢复.

### ■名词解释

1 活性氧(reactive oxygen species, ROS): 是指一组含有化学性质活泼的含氧功能基团的化合物, 包括含氧自由基、氢过氧化物、脂质过氧化物、脂质过氧化物等.

2 活性氮(reactive nitrogen species, RNS): 正常代谢产生的一氧化氮(NO)和过氧亚硝酸根(ONOO<sup>-</sup>), 因分子中有氮又称为活性氮分子, 在细胞代谢过程中具有重要意义.

3 胰腺炎相关性腹水(pancreatitis-associated ascitic fluids, PAAF): 是指含有胰酶的胰液渗漏进入腹腔, 引起慢性炎症, 导致大量液体在腹腔内聚集.



### ■同行评价

本文全面介绍了氧化应激的概念,与急性胰腺炎的关系和治疗进展,资料全面,条理清晰,文献较新,对急性胰腺炎的研究有一定指导意义。

3.3 硫辛酸(lipoic acid, LA) LA是一个二硫化合物,为硫辛酸乙酰转移酶的辅酶,具有氧化型(a-lipoic acid, ALA)和还原型(dihydro-lipoic acid, DHLA)。近来研究发现,LA具有强效的抗氧化作用,可以直接清除OFR,阻断脂质过氧化。LA诱导GSH的合成,恢复细胞氧化还原稳态,减少细胞氧化损伤<sup>[52]</sup>。LA可使氧化还原敏感性转录因子NF- $\kappa$ B失活,从而改善内皮细胞功能。LA还可以通过减少ROS,抑制许多氧化还原敏感信号通路。Park *et al*<sup>[53]</sup>实验研究表明,给予ALA(1 mg/kg) ip后,能够明显减轻胰腺重量/体质量及血清脂肪酶和淀粉酶水平。

3.4 硫氧还蛋白-1(Thioredoxin-1, TRX-1) TRX-1是一种内源性氧化还原蛋白,具有抗氧化和抗炎作用,对细胞具有保护作用。血清中TRX-1水平可以反映氧化应激状况<sup>[54]</sup>。Ohashi *et al*<sup>[55]</sup>通过ip胆囊收缩素类似物诱导AP,给予重组hTRX-1注射后,能够抑制中性粒细胞浸润,减少了胰腺和肺脏炎症,降低了死亡率。

3.5 蛋白酶抑制剂 蛋白酶抑制剂MG132可以抑制钙蛋白酶和组织蛋白酶活性,通过阻断蛋白酶体,诱导热休克蛋白72的表达。Letoha *et al*<sup>[56]</sup>在大鼠AP造模前给予MG132(10 mg/kg)预处理,显示MG132明显降低了血清淀粉酶、胰腺重量/体质量、胰腺髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的活化、致炎因子聚集及胰腺相关蛋白表达,胰腺和血清中GSH, MDA, SOD都得到了改善,能够明显抑制NF- $\kappa$ B的抑制物I $\kappa$ B降解和随后NF- $\kappa$ B活化,增加了热休克蛋白72表达。

3.6 DA-9601 DA-9601是一种具有抗炎和抗氧化作用的植物化学物质。Yoo *et al*<sup>[29]</sup>通过反复ip蛙皮素5 wk诱导大鼠慢性纤维化胰腺炎模型,并给予DA-9601进行治疗,治疗后与对照组相比,MPO和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)水平明显降低,细胞保护蛋白如热休克蛋白70、金属硫蛋白升高,对慢性纤维化胰腺炎的具有一定治疗作用。

3.7 复合抗氧化治疗(multiple antioxidant, MAOX) 抗氧化剂可以有效抑制脂质过氧化,从而减少组织的氧化性损伤,近来有人采用多种抗氧化剂联合治疗,起到更好的治疗作用。Hardman *et al*<sup>[57]</sup>采用硒(15 mg/kg)、维生素C(30 mg/kg)和NAC(300 mg/kg)联合治疗L-精氨酸诱导的AP,结果表明,AP以组织水肿、中性粒细胞浸润、腺泡细胞脱颗粒和血清淀粉酶升高为特点,早期给予MAOX治疗能够减少肺脏MPO和支气管

灌洗蛋白、腺泡膨胀、脱颗粒及胰腺实质炎症细胞浸润,说明早期应用MAOX治疗更能有效改善胰腺和肺脏损伤。

### 4 参考文献

- 1 Dryden GW Jr, Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 308-316
- 2 Esrefoglu M, Gul M, Ates B, Batcioglu K, Selimoglu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on cerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 259-264
- 3 Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 161-168
- 4 Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Crisafulli C, Menegazzi M, Malleo G, Suzuki H, Cuzzocrea S. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Shock* 2006; 25: 161-167
- 5 Dubinina EE. The role of reactive oxygen species as signal molecules in tissue metabolism in oxidative stress. *Vopr Med Khim* 2001; 47: 561-581
- 6 Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650
- 7 Martin KR, Barrett JC. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 71-75
- 8 Abu-Hilal M, McPhail MJ, Marchand L, Johnson CD. Malondialdehyde and superoxide dismutase as potential markers of severity in acute pancreatitis. *JOP* 2006; 7: 185-192
- 9 Tadao M, Yuji O. Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 10 Martinez-Burgos MA, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martinez-Victoria E, Manas M, Pariente JA. Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation in pancreatic acinar cells. *J Exp Biol* 2006; 209: 2156-2164
- 11 Watson F, Edwards SW. Stimulation of primed neutrophils by soluble immune complexes: priming leads to enhanced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevations, activation of phospholipase D, and activation of the NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 819-826
- 12 Buccellato LJ, Tso M, Akinci OI, Chandel NS, Budinger GR. Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6753-6760
- 13 Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 405-414
- 14 Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Vina J, Lopez-Rodas G, Sastre J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2775-2787
- 15 Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C,

- Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001; 96: 56-67
- 16 Li M, Cai JF, Chiu JF. Arsenic induces oxidative stress and activates stress gene expressions in cultured lung epithelial cells. *J Cell Biochem* 2002; 87: 29-38
- 17 Haddad JJ. Oxygen-sensitive pro-inflammatory cytokines, apoptosis signaling and redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002; 7: 1-14
- 18 Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 2002; 82: 1359-1368
- 19 Yoon SO, Yun CH, Chung AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 1597-1604
- 20 Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabrylewicz A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas* 2000; 21: 376-384
- 21 Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O, Malagarie-Cazenave S, Frisach MF, Mirault ME, Levade T. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 42867-42874
- 22 Klar E, Werner J. New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis. *Chirurg* 2000; 71: 253-264
- 23 Telek G, Regoly-Merei J, Kovacs GC, Simon L, Nagy Z, Hamar J, Jakab F. The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1252-1258
- 24 刘建生, 卫新革, 付极, 刘进, 袁耀宗, 吴云林. 急性胰腺炎与内皮素、一氧化氮和氧自由基关系研究. *中国医师杂志* 2003; 5: 28-29
- 25 Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 159-164
- 26 Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, de Dios I. Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol* 2005; 206: 9-16
- 27 Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3: 156-163
- 28 Esrefoglu M, Gul M, Ates B, Yilmaz I. Ultrastructural clues for the protective effect of ascorbic acid and N-acetylcysteine against oxidative damage on cerulein-induced pancreatitis. *Pancreatol* 2006; 6: 477-485
- 29 Yoo BM, Oh TY, Kim YB, Yeo M, Lee JS, Surh YJ, Ahn BO, Kim WH, Sohn S, Kim JH, Hahm KB. Novel antioxidant ameliorates the fibrosis and inflammation of cerulein-induced chronic pancreatitis in a mouse model. *Pancreatol* 2005; 5: 165-176
- 30 Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatol* 2005; 5: 492-500
- 31 张金华. 急性胰腺炎并肝损害52例临床分析. *中国综合临床* 2003; 19: 708-709
- 32 Folch-Puy E, Garcia-Movtero A, Iovanna JL, Dagorn JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D. The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNFalpha expression in hepatocytes. *J Pathol* 2003; 199: 398-408
- 33 Granell S, Serrano-Mollar A, Folch-Puy E, Navajas D, Farre R, Bulbena O, Closa D. Oxygen in the alveolar air space mediates lung inflammation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1640-1647
- 34 朱斌, 孙家邦, 张淑文, 李非, 刘爽, 崔叶青, 孙海晨. 粘附分子基因表达在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤中的作用. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 20-22
- 35 Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek O, Henry J, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg* 2000; 231: 213-222
- 36 Folch E, Prats N, Hotter G, Lopez S, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1535-1544
- 37 Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 240-246; discussion 247
- 38 罗昆仑, 何振平, 李昆, 段恒春. 坏死性胰腺炎时某些粘附分子表达对中性粒细胞在肺脏聚集的影响. *中华消化杂志* 1999; 19: 182-184
- 39 Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239
- 40 Pupelis G. Renal failure in acute pancreatitis. Timing of dialysis and surgery. *Przegl Lek* 2000; 57 Suppl 5: 29-31
- 41 Gilgenast O, Brandt-Nedelev B, Wiswedel I, Lippert H, Halangk W, Reinheckel T. Differential oxidative injury in extrapancreatic tissues during experimental pancreatitis: modification of lung proteins by 4-hydroxynonenal. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 932-937
- 42 游琪, 蔡久英. 氧化应激与心肌损伤的研究进展. *临床荟萃* 2005; 20: 1127-1129
- 43 Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420: 305-311
- 44 von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 2934-2941
- 45 Seo JY, Kim H, Seo JT, Kim KH. Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants. *Pharmacology* 2002; 64: 63-70
- 46 Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* 2005; 32: 125-131
- 47 Sevillano S, De la Mano AM, De Dios I, Ramudo

- L, Manso MA. Major pathological mechanisms of acute pancreatitis are prevented by N-acetylcysteine. *Digestion* 2003; 68: 34-40
- 48 Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yegen C, Yegen BC. Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 2004; 37: 267-275
- 49 Chen HM, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF. Melatonin reduces pancreatic prostaglandins production and protects against cerulein-induced pancreatitis in rats. *J Pineal Res* 2006; 40: 34-39
- 50 Esrefoglu M, Gul M, Ates B, Selimoglu MA. Ultrastructural clues for the protective effect of melatonin against oxidative damage in cerulein-induced pancreatitis. *J Pineal Res* 2006; 40: 92-97
- 51 Munoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Collado JA, Munoz-Castaneda JR, Ortega R, Cruz A, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 2006; 40: 195-203
- 52 Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 288-294
- 53 Park SJ, Seo SW, Choi OS, Park CS. Alpha-lipoic acid protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4883-4885
- 54 Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Fukui T, Kawasaki K, Watanabe N, Yodoi J, Okazaki K, Chiba T. Clinical significance of serum thioredoxin 1 levels in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32: 264-270
- 55 Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Fukui T, Watanabe N, Nakase H, Yodoi J, Okazaki K, Chiba T. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G772-781
- 56 Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Szalontai T, Varga I, Kaszaki J, Boros I, Duda E, Hackler L, Kurucz I, Penke B. The proteasome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1142-1151
- 57 Hardman J, Shields C, Schofield D, McMahon R, Redmond HP, Siriwardena AK. Intravenous antioxidant modulation of end-organ damage in L-arginine-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreatolgy* 2005; 5: 380-386

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

**本刊讯** 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展,由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与《World Journal of Gastroenterology》杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开。届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流,会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论,学习该领域国内外先进技术和理念,促进学术交流和学科发展。与会者将被授予国家I类继续教育学分12分。欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加。

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科 邮编: 150001 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389 E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐,统一安排食宿,费用自理)。报到日期: 2007-08-02。

# 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用

邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新慧, 李泽峰, 盛志勇

邹晓防, 胡森, 吕艺, 盛志勇 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室 北京市 100037

孙娜, 石新慧, 李泽峰, 中国人民解放军总医院第一附属医院检验科 北京市 100037

军队“十一五”医药卫生专项课题项目, No. 06Z055

通讯作者: 胡森, 100037, 北京市, 北京市中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs82080@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989139

收稿日期: 2007-02-25 接受日期: 2007-03-31

## Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells against oxidative injury

Xiao-Fang Zou, Sen Hu, Yi Lv, Na Sun, Xin-Hui Shi, Ze-Feng Li, Zhi-Yong Sheng

Xiao-Fang Zou, Sen Hu, Yi Lv, Zhi-Yong Sheng, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Na Sun, Xin-Hui Shi, Ze-Fen Li, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Supported by the Special Foundation of Military Medical Project during the 11<sup>th</sup> Five-Year Period, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037 Beijing, China. hs82080@yahoo.com.cn

Received: 2007-02-25 Accepted: 2007-03-31

## Abstract

**AIM:** To study the effects of carbachol on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidative injury of intestinal epithelial cells (IEC).

**METHODS:** IEC were cultured with the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* to induce the oxidative injury. IEC were divided into 3 groups: control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol/L) group and carbachol (100 μmol/L) group. The viability of IEC was measured by MTT assay. The level of lactate dehydrogenase (LDH) in culture media and the malondialdehyde (MDA) content in IEC were measured.

**RESULTS:** In compared with those in control group, LDH level ( $7.40 \pm 2.10$  vs  $0.81 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ ) and MDA content in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were sig-

nificantly elevated, and the viability of IEC was obviously decreased ( $37.25\% \pm 0.80\%$  vs  $100\% \pm 0.13\%$ ,  $P < 0.01$ ). However, in carbachol group, LDH level ( $4.64 \pm 1.31$  vs  $7.40 \pm 2.10$ ,  $P < 0.01$ ) and MDA content were lower while IEC viability was obviously higher than those in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $78.70\% \pm 2.80\%$  vs  $37.25\% \pm 0.80\%$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Carbachol can protect rat IEC from the oxidative injury.

**Key Words:** Carbachol; Intestinal epithelial cell; Rat; MTT assay

Zou XF, Hu S, Lv Y, Sun N, Shi XH, Li ZF, Sheng ZY. Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells against oxidative injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1273-1275

## 摘要

**目的:** 探讨卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞(intestinal epithelia cell, IEC)过氧化损伤的影响。

**方法:** 将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加入IEC培养液中制成IEC过氧化损伤模型。实验设对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(2.5 mmol/L)、卡巴胆碱组(卡巴胆碱100 μmol/L)。用四甲基偶氮唑盐(MTT)实验检测IEC的存活率,测定培养液中测乳酸脱氢酶(LDH)和细胞中丙二醛(MDA)含量。

**结果:** 与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组LDH ( $7.40 \pm 2.10$  vs  $0.81 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ )、MDA水平显著增高 ( $P < 0.01$ ), 细胞活力明显降低( $37.25\% \pm 0.80\%$  vs  $100\% \pm 0.13\%$ ,  $P < 0.01$ )。卡巴胆碱组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比, LDH漏出MDA形成明显减少( $4.64 \pm 1.31$  vs  $7.40 \pm 2.10$ ,  $P < 0.01$ ), 细胞的细胞活力显著增加 ( $78.70\% \pm 2.80\%$  vs  $37.25\% \pm 0.80\%$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 卡巴胆碱对大鼠IEC过氧化损伤具有保护作用。

**关键词:** 卡巴胆碱; 上皮细胞; 大鼠; MTT法

邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新慧, 李泽峰, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1273-1275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1273.asp>

## ■背景资料

肠上皮细胞和细胞间紧密连接是构成肠黏膜机械屏障的重要组成部分,与外界细菌及毒素直接接触.严重应激状态下,肠上皮细胞的损害使肠黏膜的通透性增加,造成细菌及内毒素的移位,引起肠源性内毒素血症和脓毒症,这与脓毒症和MODS的发生有密切关系.为此,减轻肠上皮细胞损害一直是临床研究热点之一。

## ■创新盘点

本实验以往研究表明,体内卡巴胆碱肠缺血再灌注引起的肠上皮细胞具有保护作用,但体外氧化应激时,卡巴胆碱是否对肠上皮细胞具有保护作用尚无报道,本文着重研究了体外氧化应激时卡巴胆碱对肠上皮细胞的作用。



## ■应用要点

乙酰胆碱在体内容易被胆碱酯酶水解而失去其作用,难以应用临床上。卡巴胆碱是一种胆碱能激动剂,作用于M和N胆碱受体,且N样作用强于乙酰胆碱,在体内不易被水解,可应用临床,发挥其抗炎作用。

## ■名词解释

胆碱能抗炎通路:胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新抗炎途径,是指中枢神经系统通过胆碱能神经及其递质乙酰胆碱(Ach)调节或对抗局部及全身炎症反应的通路。胆碱能抗炎通路与常规炎症反应的速度(数小时到数天)相比,神经信号极其迅速,且定位准确。

## 0 引言

细菌和内毒素的移位是严重烧(创)伤后常见的过程,也是引起严重严重烧(创)伤后多器官功能障碍的重要原因之一,而肠黏膜屏障功能损害是其发生的关键<sup>[1,3]</sup>。IEC是肠黏膜屏障的重要组成部分。因此,减轻IEC结构和功能损伤对严重烧(创)伤的治疗具有重要意义。前期研究表明,卡巴胆碱能显著减轻肠缺血再灌注损伤黏膜炎症和病理损害<sup>[4,6]</sup>,但卡巴胆碱在体外对IEC是否具有保护作用尚无研究。故本实验H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生·OH攻击损伤正常IEC基础上,观察卡巴胆碱对IEC的氧化损伤有否具有保护作用,为卡巴胆碱开发应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 正常IEC株由协和细胞学中心提供。卡巴胆碱美国Sigma公司;MTT、DMEM(高糖)均为天津天润善达生物科技有限责任公司产品;胎牛血清美国Gibico公司;2.5 g/L胰蛋白酶美国Hyclone公司;中性短效胰岛素浙江万邦药业股份有限公司;DMSO北京亚太精细化工公司;MDA检测试剂盒南京建成公司;其他试剂均为分析纯。二氧化碳恒温孵育箱,美国Queue System Company公司;超净工作台中国上海半导体设备一厂;倒置生物显微镜日本Olympus公司;日立7170型全自动生化分析仪日本日立公司;全波长多功能酶标仪美国Dynerx Technologies, Inc公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理方法 细胞培养在含50 mL/L胎牛血清和10 g/L胰岛素DMEM(高糖)培养液中,置37℃、饱和湿度含50 mL/L CO<sub>2</sub>和950 mL/L空气的培养箱中无菌培养。细胞培养至对数生长期。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组加入2.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(溶于无血清培养基中),卡巴胆碱组预先30 min给予卡巴胆碱(卡巴胆碱100 μmol/L)然后加入2.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,对照组只给无血清培养液。于处理后4 h收集细胞。

1.2.2 细胞LDH漏出量的检测 取对数生长期肠上皮细胞调整至10<sup>8</sup>/L,接种于24孔板上,每孔0.3 mL。置37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24 h后,弃原培养液,按上述方法处理各组,每组设6个复孔。到达反应时间后,留取上层培养液,用生化分析仪测LDH,取6孔平均值。

1.2.3 MTT检测 取对数生长期肠上皮细胞调整至10<sup>7</sup>/L,接种于96孔板上,每孔200 μL。置37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24 h后,弃原培养液,按上述方法处理各组,每组设6个复孔。处理4 h后,每孔

表 1 氧化应激时卡巴胆碱对IEC生存率和LDH漏出量的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	A <sub>490</sub>	细胞生存率 (%)	LDH漏出量 (U/L)
对照组	0.49 ± 0.01	100 ± 0.13	0.81 ± 0.12
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	37.25 ± 0.80 <sup>b</sup>	7.40 ± 2.10 <sup>b</sup>
卡巴胆碱组	0.38 ± 0.02 <sup>bd</sup>	78.70 ± 2.80 <sup>bd</sup>	4.64 ± 1.31 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>d</sup>P<0.01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

加入无血清培养基200 μL和MTT溶液20 μL(5 g/L)37℃继续培养4 h,小心吸去上清,每孔加入DMSO 150 μL,振荡10 min后,使结晶物充分溶解,空白对照调零,用酶标仪测定各孔波长在490 nm(A<sub>490</sub>)的吸光值(A)。细胞生存率计算公式<sup>[3]</sup>:细胞的生存率 = 处理组A<sub>490</sub>/正常组A<sub>490</sub> × 100%。

1.2.4 MDA检测 硫代巴比妥酸法检测细胞中MDA含量。

**统计学处理** 所的数据用SPSS11.0软件进行分析,数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,以数据不同进行方差分析和卡方检验。

## 2 结果

2.1 LDH漏出量和IEC生存率的变化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组细胞LDH漏出量显著高于对照组(P<0.01),卡巴胆碱组细胞LDH漏出量显低于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(P<0.01)。通过MTT实验检测各组的OD值间接反映细胞的生存率。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组IEC生存率明显低于对照组(P<0.01),卡巴胆碱组IEC生存率明显高于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(P<0.01)(表1)。

2.2 氧化应激时卡巴胆碱对MDA含量的影响 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组细胞MDA含量显著高于对照组和卡巴胆碱组(P均<0.01)(图1)。

## 3 讨论

IEC的主要功能包括吸收营养物质、构成肠黏膜屏障以及递呈抗原和分泌细胞因子等。IEC位于肠机械屏障的最外层,处于机体与外界抗原和毒素接触的第一线,时刻与外界抗原和毒素接触。IEC损伤后必然导致黏膜屏障功能破坏<sup>[7-8]</sup>,引起细菌和内毒素的移位,同时启动肠道局部和全身炎症及免疫反应,而这一过程在烧(创)伤后全身炎症反应和MODS的过程中起重要作用。因此,减轻IEC的损害,维持IEC的正常结构和功能是临床上治疗烧(创)伤后全身炎症反应和MODS的重要措施之一。

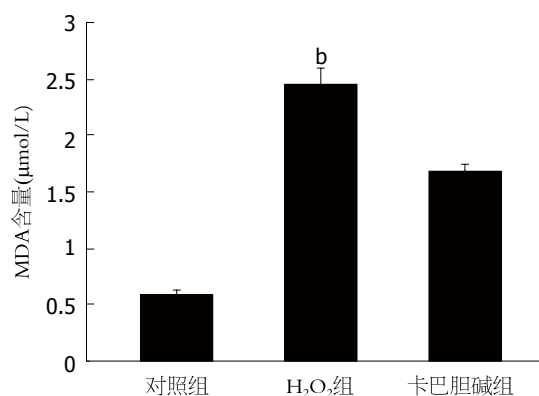


图1 氧化应激时卡巴胆碱对MDA含量的影响(mean ± SD,  $n = 6$ ). <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组和卡巴胆碱组.

胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新的神经-内分泌抗炎途径. Borovikova *et al*<sup>[9]</sup>研究发现, 副交感神经主要递质乙酰胆碱在体外能有效地抑制LPS刺激外周巨噬细胞释放致炎介质TNF- $\alpha$ . 与常规炎症反应的速度(数小时到数天)相比, 神经信号极其迅速, 这种调节特性对于维持炎症反应早期关键阶段的免疫激活是有益的. 神经系统对生理功能的控制是短暂的, 短期内如果没有进一步的神经传入信号, 反应细胞将恢复功能. 短暂抑制后免疫功能的恢复有助于在严重威胁或感染时产生必要且有效的免疫反应. 研究表明, 刺激迷走神经传出支可抑制大鼠内毒素血症时的全身炎症反应<sup>[10]</sup>. 卡巴胆碱是一种胆碱能激动剂, 作用于M和N胆碱受体, 在体内不易被水解. 本实验室前期研究发现卡巴胆碱在体内对肠组织具有保护作用. 研究表明, 卡巴胆碱能抑制肠缺血再灌注损伤模型血浆TNF- $\alpha$ 水平, 全身炎症反应, 同时对肠上皮细胞具有保护作用<sup>[11-12]</sup>, 但体外氧化应激时卡巴胆碱对IEC是否具有保护作用尚不清楚. 本实验设想卡巴胆碱对IEC氧化应激损伤具有一定的影响.

氧化应激是机体活性氧的产生过多和或机体抗氧化能力下降, 活性氧清除不足, 导致体内活性氧增多并引起细胞氧化损伤的病理过程. 在氧化应激过程中, 自由基所形成的氧化过度具有重要影响, 且羟自由基对这种损伤起主要作用<sup>[13]</sup>. 本实验中以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理体外培养的IEC, 模拟体内氧化应激损伤IEC情况. LDH是细胞受损时的敏感指标, 细胞受损时, 在细胞形态还没有发生改变之前就出现明显的改变. MDA反映细胞受氧化应激时脂质过氧化程度从而间接的反映细胞损伤的程度. 结果显示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可对IEC损

害作用, MDA含量升高并导致细胞生存率下降, 预先给予卡巴胆碱可减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对IEC损害作用, 抑制MDA的形成, 减轻氧化损伤, 提高细胞生存率, 从细胞水平证明体外氧化应激时卡巴胆碱对IEC具有保护作用, 但卡巴胆碱抗氧化损伤的机制有待进一步研究.

实验结果表明, 卡巴胆碱能减轻IEC氧化应激损伤. 本研究为临床治疗严重烧(创)后常见的肠屏障功能损害提供了新的有效途径, 对于防治严重烧(创)后全身炎症反应和MODS具有一定的意义.

#### 4 参考文献

- Fang WH, Yao YM, Shi ZG, Yu Y, Wu Y, Lu LR, Sheng ZY. Effect of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein on endotoxin translocation and lipopolysaccharide-binding protein/CD14 expression in rats after thermal injury. *Crit Care Med* 2001; 29: 1452-1459
- 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2029-2032
- Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 475-485
- 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 417-421
- 胡森, 曹卫红, 孙丹, 吕艺, 白玉梅, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血-再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 748-750
- Cinel I, Buyukafsar K, Cinel L, Polat A, Atici S, Tamer L, Oral U. The role of poly(ADP-ribose) synthetase inhibition in preventing endotoxemia-induced intestinal epithelial apoptosis. *Pharmacol Res* 2002; 46: 119-127
- Aranow JS, Fink MP. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Br J Anaesth* 1996; 77: 71-81
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 姜小国, 石德光, 胡森, 胜志勇. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎作用研究进展. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 59-61
- 邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇. 缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 625-628
- 姜小国, 胡森, 石德光, 晋桦, 吕艺, 韩翠华, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白介素-10含量的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 167-169
- Hata Y, Kawabe T, Hiraishi H, Ota S, Terano A, Ivey KJ. Hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity to cultured colonic epithelial cells. *Life Sci* 1997; 60: 2221-2230

#### 同行评价

本研究的重点是卡巴胆碱在体外对肠上皮细胞是否具有保护作用. 该科研课题的设计比较严谨, 实验对照的设计也较合理, 结果可信, 具有一定的临床指导意义.

## $\alpha$ -干扰素对活化的肝星状细胞早期凋亡的影响

车雷, 马力, 吴丹, 李智伟

### ■背景资料

目前, IFN- $\alpha$  已广泛应用于慢性肝炎的抗病毒治疗中, 人们发现 IFN- $\alpha$  具有不依赖于抗病毒作用的独立的抗肝纤维化作用, 但其作用机制尚不清楚。最近研究表明, 对作为肝纤维化中心环节的活化的 HSC 的影响可能是 IFN- $\alpha$  抗肝纤维化的主要机制之一。

车雷, 马力, 吴丹, 李智伟, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 李智伟, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院感染科. sy901015@sina.com  
电话: 024-83956860

收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-06

### Effects of interferon- $\alpha$ on the early apoptosis of activated hepatic stellate cells

Lei Che, Li Ma, Dan Wu, Zhi-Wei Li

Lei Che, Li Ma, Dan Wu, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sy901015@sina.com

Received: 2007-02-02 Accepted: 2007-03-06

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of interferon- $\alpha$  on the early apoptosis of activated hepatic stellate cells (HSCs), and to further explore the anti-fibrosis mechanism of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ).

**METHODS:** Rat HSCs were cultured *in vitro*, and then treated with different concentrations of IFN- $\alpha$  for 24 hours. The viable cell count was measured by MTT assay, and the early apoptosis of HSCs was detected by flow cytometry using AnnexinV/PI-staining.

**RESULTS:** MTT assay showed a decrease of HSCs after IFN- $\alpha$  treatment, and the absorbency was significantly different from that of the control cells when  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  U/L IFN- $\alpha$  was used ( $t = 2.82, 5.44$ , both  $P < 0.05$ ). Flow cytometry demonstrated that the early apoptosis rate of HSCs was increased with the elevation of IFN- $\alpha$  concentration, and the apoptosis rate was markedly different from that of the control cells when IFN- $\alpha$  was adopted at the concentrations of  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  U/L ( $t = 4.31, 5.07$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** IFN- $\alpha$  can induce the early apoptosis of HSCs, which is probably one of the

anti-fibrosis mechanism of interferon- $\alpha$ .

**Key Words:** Hepatic stellate cell; Interferon- $\alpha$ ; Liver fibrosis; Early apoptosis

Che L, Ma L, Wu D, Li ZW. Effect of interferon- $\alpha$  on the early apoptosis of activated hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1276-1279

### 摘要

**目的:** 研究IFN- $\alpha$ 对活化的大鼠肝星状细胞(HSC)凋亡的影响, 进一步探讨IFN- $\alpha$ 抗肝纤维化的机制。

**方法:** 将体外培养大鼠HSC分别给予不同浓度的IFN- $\alpha$ 作用24 h后, 采用四甲基偶氮唑蓝实验(MTT)测定活细胞数及应用流式细胞仪(flow cytometry)AnnexinV和PI双染方法将早期凋亡与中晚期凋亡和死细胞区分开, 从而测定HSC的早期凋亡情况。

**结果:** MTT实验观察到IFN- $\alpha$ 作用于大鼠活化的HSC后, 作用组活细胞数目减少,  $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个作用浓度组与对照组的A值比较有显著性差异( $t = 2.82, 5.44$ , 均 $P < 0.05$ )。流式细胞仪结果示HSC的早期凋亡率随干扰素浓度的增加而提高,  $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个作用浓度组与对照组比较早期凋亡率有显著性差异( $t = 4.31, 5.07$ , 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 诱导肝星状细胞早期凋亡可能是IFN- $\alpha$ 抗肝纤维化的机制之一。

**关键词:** 肝星状细胞;  $\alpha$ -干扰素; 肝纤维化; 早期凋亡

车雷, 马力, 吴丹, 李智伟.  $\alpha$ -干扰素对活化的肝星状细胞早期凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1276-1279  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1276.asp>

### 0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是大多数慢性肝病共有的病理改变, 涉及到组织病理学, 细胞生物学的多个环节, 并与细胞因子及分子水平的调节



有密切关系<sup>[1]</sup>, 是影响慢性肝炎预后的重要环节. 在目前尚无有效病因治疗方法的情况下, 减缓或阻止肝纤维化进程是一相当重要的治疗对策. 近年来通过研究发现 $\alpha$ -干扰素(interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )除抗病毒作用外还具有独立的抗肝纤维化的作用<sup>[2]</sup>, 但目前尚未能完全阐明其作用机制. 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是产生细胞外基质、参与肝纤维化形成的主要细胞. 既往已有实验表明 $\alpha$ -干扰素存在促进活化的HSC凋亡的作用<sup>[3]</sup>, 但对其作用于凋亡的哪个阶段未见明确报道. 我们旨在通过体外条件下观察 $\alpha$ -干扰素在不同作用浓度对活化的HSC早期凋亡率的影响, 进一步探讨 $\alpha$ -干扰素在抗肝纤维化中的作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 r-HSC99细胞系, 中国医科大学附属盛京医院感染科实验室提供. IFN- $\alpha$ (500 MU/支)购自天津华立达生物公司; MTT购自武汉博士德生物公司; AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物公司; 酶标仪为Labsystems Dragon公司产品; 流式细胞仪为美国BD公司产品.

1.2 方法 复苏冻存细胞株, 用含有100 mL/L胎牛血清的DMEM常规培养, 倒置显微镜下观察细胞, 待细胞生长状态良好, 并且细胞数目在 $1 \times 10^9$ /L以上时, 将细胞传代.

1.2.1 MTT检测活的HSC数目 将细胞生长状态良好, 并且细胞数目在 $1 \times 10^9$ /L以上的培养瓶中的细胞接种在96孔板中, 在加入含IFN- $\alpha$   $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  U/L的DMEM培养液中培养24 h后的各组HSC细胞(每组设有3个复孔)中加入MTT液50  $\mu$ L继续培养4 h后, 弃上清液, 加入二甲基亚砜(DMSO) 100  $\mu$ L, 震荡10 min, 上酶标仪于492 nm波长处测吸光度值, 代表各孔的细胞数.

1.2.2 流式细胞仪测HSC凋亡 将细胞生长状态良好, 并且细胞数目在 $1 \times 10^9$ /L以上的培养瓶中加入含IFN- $\alpha$   $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  U/L的DMEM培养液中培养24 h后, 调整待测细胞的浓度为 $1 \times 10^9$ /L, 取1 mL细胞, 1000 r/min 4℃离心10 min, 弃上清. 加入1 mL冷的PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, 1000 r/min, 4℃离心10 min, 弃上清. 将细胞悬于200  $\mu$ L Binding Buffer, 加入10  $\mu$ L AnnexinV-FITC和5  $\mu$ L PI, 轻轻混匀, 避光室温反应15 min, 加入300  $\mu$ L Binding Buffer, 在1 h内上机检测.

表 1 不同浓度组IFN- $\alpha$ 作用于HSC后MTT检测A值的结果( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD)

分组	A值
对照组	0.493 $\pm$ 0.0518
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^5$ U/L	0.4497 $\pm$ 0.0338
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^6$ U/L	0.4273 $\pm$ 0.0566
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^7$ U/L	0.3657 $\pm$ 0.0581
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^8$ U/L	0.2707 $\pm$ 0.0387

表 2 不同浓度组IFN- $\alpha$ 作用于HSC后流式细胞仪检测凋亡率及早期凋亡率的结果( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD)

分组	早期凋亡率	凋亡率
对照组	0.0327 $\pm$ 0.001652	0.0653 $\pm$ 0.0108
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^7$ U/L	0.0553 $\pm$ 0.008921	0.0995 $\pm$ 0.0093
IFN- $\alpha$ $1 \times 10^8$ U/L	0.0915 $\pm$ 0.0200	0.1513 $\pm$ 0.2396

**统计学处理** 所得结果采取均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD), 应用SPSS11.0统计软件对数据进行 $t$ 检验.

## 2 结果

2.1 MTT检测结果 分别应用IFN- $\alpha$ 浓度为IFN- $\alpha$   $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  U/L作用于活化的大鼠HSC, 应用MTT方法检测到的A值如表1. 给予不同浓度组IFN- $\alpha$ 作用于活化的HSC后, A值逐渐降低, 经统计学分析结果表明,  $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个作用浓度组与对照组的A值比较有显著性差异, 分别为 $t = 2.82$ 和 $t = 5.44 > t_{0.05/2(4)} = 2.132$ ,  $P < 0.05$ 有统计学意义, 其他浓度组无显著性差异. 说明IFN- $\alpha$ 在 $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个浓度组有明显的促进活化的HSC凋亡的作用, 而且此作用随浓度的增加而增强.

2.2 流式细胞仪检测结果 应用 $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个作用浓度组的IFN- $\alpha$ 作用于体外培养的活化的HSC后, 经Annexin V和PI双染上流式细胞仪检测结果(表2, 图1)IFN- $\alpha$ 作用组的右下象限中的红色标记点比对照组的右下象限中红色标记点明显增多, 表明早期凋亡的细胞增多, 说明IFN- $\alpha$ 有促进活化的HSC早期凋亡的作用. 正如表2显示, IFN- $\alpha$ 作用活化的HSC后凋亡率及早期凋亡率都随着浓度的增大而增加, 经统计学分析表明,  $1 \times 10^7$ 及 $1 \times 10^8$  U/L两个作用浓度组与对照组比较早期凋亡率有显著性差异, 分别 $t = 4.31$ 和 $t = 5.07 > t_{0.05/2(4)}$ ,  $P < 0.05$ 有统计学意义. 说明IFN- $\alpha$ 有诱导活化的HSC凋亡的作用, 并且

### ■ 研发前沿

HSC是肝脏中ECM主要的产生细胞, IFN- $\alpha$ 对活化的HSC的影响被认为是其抗肝纤维化作用的重要机制. 因此, 是目前抗肝纤维化研究的热点之一.

### ■应用要点

慢性肝炎是我国引起肝纤维化及肝硬化的主要原因, IFN- $\alpha$ 是目前慢性肝炎抗病毒治疗的主要药物, 已证实IFN- $\alpha$ 具有抗肝纤维化的作用, 但作用机制尚不清楚. 本研究通过IFN- $\alpha$ 对活化的HSC早期凋亡的影响, 为IFN- $\alpha$ 的临床应用提供理论依据.

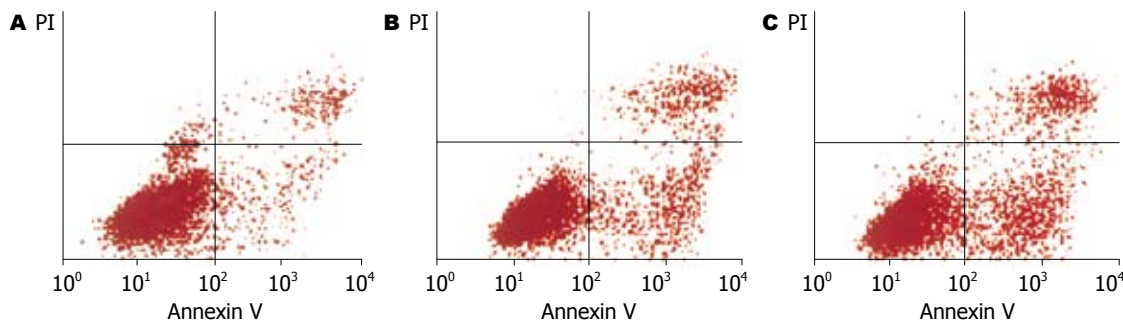


图1 流式细胞仪检测结果. A: 对照组; B: IFN- $\alpha$   $1 \times 10^7$  U/L; C: IFN- $\alpha$   $1 \times 10^8$  U/L.

还表明主要促进活化的HSC的早期凋亡.

### 3 讨论

目前认为肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度增多和异常沉积是肝纤维化的主要发生机制<sup>[4-6]</sup>. 当肝脏发生纤维化时有3个基本现象值得重视: (1)肝细胞外基质的增加; (2)肝星状细胞转变为肌纤维母细胞; (3)肝星状细胞胞质内视黄醇减少. 这3个现象都与肝星状细胞有关<sup>[7]</sup>, HSC的活化被认为是肝纤维化形成的中心环节. 因此清除活化的HSC成为抗肝纤维化的研究热点. 凋亡不引起溶酶体等细胞器的破坏, 凋亡细胞在数小时内被周围的细胞吞噬, 很少引起微环境的炎症反应, 是一种理想的清除活化HSC的方式<sup>[8]</sup>. 目前, IFN- $\alpha$ 作为抗病毒的药物已应用于肝炎的临床治疗中. 既往认为IFN- $\alpha$ 的抗病毒作用是因为能减轻肝细胞的炎症、坏死, 改善肝脏所处的微环境, 减少对肝细胞和肝脏非实质细胞(FSCs、Kupffer细胞和肝窦状内皮细胞)的刺激, 从而发挥抗纤维化的作用<sup>[9]</sup>. van Zonneveld *et al*<sup>[10]</sup>通过对1978-2002年165名应用 $\alpha$ -干扰素平均治疗16 wk的患者进行血清学和病理学的研究发现, 随着病毒的抑制血清中谷丙转氨酶逐渐恢复正常, 并且肝脏病理提示炎症及纤维化程度得到改善. 随着对IFN- $\alpha$ 研究的深入发现其具有不依赖抗病毒作用而独立的抗肝纤维化作用. Guerret *et al*<sup>[11]</sup>对用IFN- $\alpha$ 短期治疗后无明显病毒应答的24例CHC患者继续应用IFN- $\alpha$ 治疗, 以观察其对肝纤维化病变的影响. 将24例患者随机分为2组: 甲组13例, 用IFN- $\alpha$ 治疗不足1 a(平均疗程7.5 mo, 剂量313 MU); 乙组11例, IFN- $\alpha$ 治疗不少于1 a(平均疗程21.8 mo, 剂量791 MU). 于治疗前和治疗后1, 5 a分别作3次肝组织活检. 应用HAI评分法和比色法评价检测结果发现, 在IFN- $\alpha$ 治疗开始后5 a, 2组肝组织纤维化均有轻度好转, 而

与治疗剂量和疗程并无显著相关性. 由此表明, IFN- $\alpha$ 可能存在直接的抗肝纤维化作用, 而并非是仅仅通过抗病毒所引起的间接作用抗纤维化. 但对于IFN- $\alpha$ 的抗肝纤维化的机制尚不完全清楚.

我们应用IFN- $\alpha$ 作用于体外培养的活化的大鼠肝星状细胞, 结果发现IFN- $\alpha$ 作用组MTT及流式细胞仪检测结果均发现HSC的凋亡率增加, 并随浓度的增加而增加, 流式细胞仪检测结果的散点图在右下象限增加比较明显, 即早期凋亡率增加, 且具有统计学意义. 说明IFN- $\alpha$ 对HSC的凋亡有促进作用, 而且主要促进HSC的早期凋亡, 即凋亡的起始阶段, 并具有浓度依赖性. Annexin V是一种Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白, 能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合. 以标记了FITC的Annexin V作为荧光探针, 利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生. Propidium iodide(PI)是一种核酸染料, 他不能透过完整的细胞膜, 但在凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI能够透过细胞膜而使细胞核红染. Annexin V与PI匹配使用, 可将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来<sup>[12]</sup>. 本实验利用Annexin V与PI双染, 明确了IFN- $\alpha$ 主要对HSC的早期凋亡有促进作用.

HSC位于Disse间隙, 胞质富含类维生素A脂滴, 肝受损时被激活, 转化为肌成纤维细胞, 脂滴丢失, 形态改变, 表达多种细胞因子及受体大量增殖, 大量合成ECM, 表达平滑肌 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle atine,  $\alpha$ -SMA), 并具有收缩功能<sup>[13-14]</sup>. 近年来研究表明, HSC还能生成少量基质金属蛋白酶及其抑制剂参与ECM的产生和降解<sup>[15-16]</sup>. 故HSC的激活是肝纤维化的关键细胞. 所以促进HSC的凋亡具有重要意义, 一方面HSC数量的减少使ECM分泌减少, 另一方面使活化的HSC分泌的金属蛋白酶抑制剂减少, 促进ECM的降解<sup>[17]</sup>. 因此, HSC的凋亡在肝纤维化的



治疗中具有重要的作用. 通过基因芯片技术以及其他技术筛选IFN调节基因的表达, 发现有多种基因与凋亡有关, 除了IRF-1, STAT1, PKR, 还有促凋亡家族成员BCL-2, 几种caspase酶, 肿瘤坏死因子家族的受体以及受体的配体等, 这些基因中有的含有IFN刺激反应元件(ISRE), IFN- $\alpha$ 可以通过依赖或非依赖于P53的途径, 抑制细胞周期进程, 促进细胞凋亡<sup>[18]</sup>. 从本实验的研究中发现, IFN- $\alpha$ 对HSC的凋亡有着促进的作用, 进一步证实了IFN- $\alpha$ 具有独立的抗肝纤维化的作用, 这与汪谦 *et al*<sup>[19]</sup>所报道的在电镜下观察到IFN- $\alpha$ 作用于活化的HSC后, 可使HSC发生凋亡的早期形态学改变相符合. 并且本实验通过IFN- $\alpha$ 作用于体外培养的活化的HSC, 进一步阐明了IFN- $\alpha$ 主要促进HSC的早期凋亡. 说明IFN- $\alpha$ 对HSC凋亡的促进作用主要是在凋亡的起始阶段.

总之, IFN- $\alpha$ 所存在的促进HSC早期凋亡的作用可能是其所具有抗肝纤维化的机制之一. 我们从对HSC凋亡的影响角度出发, 揭示了IFN- $\alpha$ 抗肝纤维化的作用机制, 为临床上的应用提供了可靠的理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 张艺军, 杨希山, 吴平生, 张晓峰, 陈晓清, 曾建英. 血管紧张素 II 和洛沙坦对肝星状细胞合成胶原的影响. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1842-1845
- 2 Papatheodoridis GV, Petraki K, Cholongitas E, Kanta E, Ketikoglou I, Manesis EK. Impact of interferon-alpha therapy on liver fibrosis progression in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2005; 12: 199-206
- 3 许伟华, 吕晓霞, 朱菊人.  $\alpha$ 干扰素对肝星状细胞凋亡及其基因表达的影响. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 633-634
- 4 Giannelli G, Antonaci S. Immunological and molecular aspects of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Histol Histopathol* 2005; 20: 939-944
- 5 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 6 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 7 蒋业贵, 李兆申. 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1443-1446
- 8 Rippe RA. Life or death: the fate of the hepatic stellate cell following hepatic injury. *Hepatology* 1998; 27: 1447-1448
- 9 Ishibashi K, Kashiwagi T, Ito A, Tanaka Y, Nagasawa M, Toyama T, Ozaki S, Naito M, Azuma M. Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology* 1996; 24: 27-31
- 10 van Zonneveld M, Honkoop P, Hansen BE, Niesters HG, Murad SD, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 39: 804-810
- 11 Guerret S, Desmouliere A, Chossegros P, Costa AM, Badid C, Trepo C, Grimaud JA, Chevallier M. Long-term administration of interferon-alpha in non-responder patients with chronic hepatitis C: follow-up of liver fibrosis over 5 years. *J Viral Hepat* 1999; 6: 125-133
- 12 郑骏年, 谢叔良, 陈家存, 黄健. 流式细胞术定量检测细胞凋亡3种方法的比较研究. 中国免疫学杂志 1999; 15: 467-469
- 13 Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32: 32-38
- 14 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001; 42: 1-8
- 15 Schlaf G, Schmitz M, Heine I, Demberg T, Schieferdecker HL, Gotze O. Upregulation of fibronectin but not of entactin, collagen IV and smooth muscle actin by anaphylatoxin C5a in rat hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1165-1174
- 16 Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005; 41: 1074-1084
- 17 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
- 18 de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 912-920
- 19 汪谦, 张可飞, 陈伟锋, 王维平. 干扰素- $\alpha$ 1b对激活鼠星状细胞的影响. 中华实验外科杂志 2005; 22: 300-301

#### ■同行评价

本文从实验中观察到, IFN- $\alpha$ 作用于大鼠活化的HSC后, 作用组活细胞数目减少, 流式细胞仪结果显示HSC的早期凋亡率随干扰素浓度的增加而提高, 说明诱导肝星状细胞早期凋亡是IFN- $\alpha$ 抗肝纤维化的机制之一. 文章有一定的科学性、创新性和可读性.

电编 张敏 编辑 张焕兰

# 急诊胃镜诊治急性上消化道非曲张静脉破裂出血42例

刘辉, 柏健鹰, 王雷, 张朋彬

## ■背景资料

非静脉曲张破裂出血是上消化道出血的主要原因之一, 主要治疗手段包括内科保守治疗及手术治疗。这类消化道出血, 经内科保守治疗后, 仍有1/3患者需要急诊手术治疗。而通过内镜进行局部止血治疗, 可明显减少患者出血量及输血量, 减少住院时间, 降低死亡率。

刘辉, 重庆三峡中心医院消化内科 重庆市万州区 404000  
柏健鹰, 王雷, 张朋彬, 第三军医大学附属新桥医院消化内科 重庆市 400037  
重庆市医学重点研究室建设项目(渝卫科教), No. [2007] 14  
通讯作者: 刘辉, 404000, 重庆市, 重庆三峡中心医院消化内科.  
liuhui62512@sina.com  
电话: 023-58137950 传真: 023-58103079  
收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-02-13

## Emergent gastroscopy in the treatment of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: an analysis of 42 cases

Hui Liu, Jian-Ying Bai, Lei Wang, Peng-Bin Zhang

Hui Liu, Department of Gastroenterology, Three Gorge Central Hospital, Wanzhou District, Chongqing 404000, China

Jian-Ying Bai, Lei Wang, Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Supported by the Key Medical Laboratory Construction Program of Chongqing Municipality, No. [2007] 14

Correspondence to: Hui Liu, Department of Gastroenterology, Three Gorge Central Hospital, Wanzhou District, Chongqing 404000, China. liuhui62512@sina.com

Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-02-13

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficiency of gastroscopic epinephrine injection with heat probe coagulation in the treatment of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding (ANVUGIB).

**METHODS:** Forty-two cases of ANVUGIB (including 13 cases of gastric ulcer, 25 cases of duodenal ulcer, and 4 cases of Dieulafoy's disease) were treated with gastroscopic epinephrine injection plus heat probe coagulation.

**RESULTS:** Bleeding was controlled in 38 (90.5%) of 42 cases. The rebleeding rate was 23.7% (9/38), and the surgery rate was 19.0% (8/42). No death occurred.

**CONCLUSION:** Epinephrine injection plus heat probe coagulation is an effective method for the treatment of acute upper gastrointestinal non-

variceal bleeding.

**Key Words:** Emergent gastroscopy; Epinephrine; Heat probe coagulation; Acute upper digestive tract active bleeding

Liu H, Bai JY, Wang L, Zhang PB. Emergent gastroscopy in the treatment of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: an analysis of 42 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1280-1282

## 摘要

**目的:** 观察注射肾上腺素及热探头凝固疗法对上消化道非曲张静脉破裂出血的治疗作用。

**方法:** 对42例上消化道活动性出血患者(13例胃溃疡, 25例十二指肠球部溃疡, 4例Dieulafoy's病)进行局部注射肾上腺素及热探头凝固治疗。

**结果:** 42例患者经首次治疗后, 有38例(90.5%)出血停止(消化性溃疡35/38, Dieulafoy's病3/4), 再出血率为23.7%(9/38)。手术率为19.0%(8/42), 无死亡发生。

**结论:** 局部注射肾上腺素及热探头凝固法是治疗上消化道非静脉曲张破裂出血的有效手段。

**关键词:** 急诊胃镜; 肾上腺素; 热凝固法; 急性上消化道出血

刘辉, 柏健鹰, 王雷, 张朋彬. 急诊胃镜诊治急性上消化道非曲张静脉破裂出血42例. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1280-1282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1280.asp>

## 0 引言

上消化道出血是消化系统常见的急症。常用治疗方法为内科保守疗法及外科手术治疗。近年来, 经内镜对上消化道出血进行诊治得到了广泛应用。我们对42例上消化道活动性非静脉曲张破裂出血患者进行了注射肾上腺素及热探头凝固治疗, 取得了较好的效果, 结果如下。

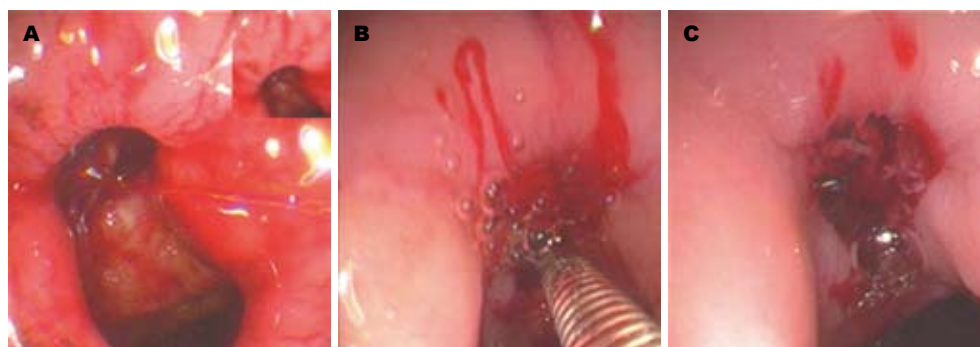


图1 十二指肠球部溃疡并出血治疗前后变化. A: 十二指肠球部溃疡喷射状出血; B: 十二指肠球部溃疡并出血注射治疗中; C: 十二指肠球部溃疡并出血注射治疗后, 出血停止, 局部可见少许血凝块.

#### ■同行评价

本研究运用局部注射肾上腺素及热探头凝固治疗, 取得了较好的疗效, 与国外的相关报道相一致. 该方法具有操作方便、价格低廉等特点, 是治疗上消化道非静脉曲张破裂出血行之有效的方法.

表1 内镜治疗上消化道非静脉曲张破裂出血效果

出血原因	<i>n</i>	首次治疗止血率	再出血率	手术率
胃溃疡	13	84.6%(11/13)	27.3%(3/11)	23.1%(3/13)
十二指肠球部溃疡	25	96.0%(24/25)	20.8%(5/24)	12.0%(3/25)
Dieulafoy's病	4	75.0%(3/4)	33.3%(1/3)	50.0%(2/4)

## 1 材料和方法

1.1 材料 42例患者中, 男34例, 女8例, 年龄18-54(平均26.5)岁. 其中胃溃疡13例, 十二指肠球部溃疡25例, Dieulafoy's病4例. 上述疾病患者均因呕血和/或黑便而就诊, 在行内镜检查时, 病变处有鲜血渗出或呈喷射样, 即判断为活动性上消化道出血并行内镜下治疗. 所有胃溃疡出血患者均进行了组织活检, 以排除恶性溃疡.

1.2 方法 用注射针(NM-1K, Olympus)将1:10 000肾上腺液在出血灶周围及出血灶处进行多点注射, 每点注射0.5-1 mL, 直至出血停止(图1). 每例患者注射总量约6-15 mL, 平均9 mL. 注射止血后, 用热探头(CD-202, Olympus)在出血点处进行热凝固治疗, 电流25-30 W, 治疗2-3次. 经上述治疗止血成功后, 每日给予患者洛赛克40 mg静滴, 持续3 d, 后改为洛赛克20 mg口服. 经内镜治疗止血治疗后, 若患者在住院观察治疗期间再次出现呕血和(或)黑便, 内镜下发现原病灶再出血, 则行第二次内镜下治疗. 若经上述处理后不能止血, 或经第二次治疗后再次出血者, 即行手术治疗.

## 2 结果

42例患者经首次治疗后, 有38例(90.5%)出血停止(消化性溃疡35/38, Dieulafoy's病3/4), 再出血率为23.7%(9/38). 手术率为19%(8/42), 无死亡发生(表1).

## 3 讨论

目前, 对于非静脉曲张破裂性上消化道出血, 主要治疗手段包括内科保守治疗及手术治疗. 这类消化道出血, 经内科保守治疗后, 仍有1/3患者需要急诊手术治疗<sup>[1-2]</sup>. 而通过内镜进行局部止血治疗, 可明显减少患者出血量及输血量, 减少住院时间, 降低死亡率<sup>[3-7]</sup>. 内镜下治疗非静脉曲张破裂出血措施有多种, 主要包括热凝固疗法、注射疗法及血管夹法<sup>[8]</sup>. 热凝固疗法主要应用热探头及氩等离子电凝产生高温, 使局部血液凝固而达到治疗效果<sup>[9-10]</sup>. 注射疗法主要注射肾上腺素或凝血酶等通过压迫和收缩血管而达到止血效果<sup>[11]</sup>. 在这些治疗方法中, 每个方法均具有明显的治疗效果, 但是结合应用效果比单个疗法效果好<sup>[12]</sup>. 目前最常用而且最经济的方法是内镜下注射肾上腺素及热凝固疗法<sup>[13]</sup>. 肾上腺素常用浓度为1:10 000, 于出血灶周围及病灶处进行注射, 通过注射产生压迫作用及肾上腺素的血管收缩作用而止血. 为提高止血效果, 降低再出血率, 常在注射止血后采取进一步措施使局部血管形成血栓, 热凝固疗法是其中手段之一. Chung *et al*<sup>[14]</sup>发现注射肾上腺素止血后, 加用热凝固治疗可使再出血率降低, 减少了输血量及住院时间, 降低了手术率. 在本组治疗中, 再出血率为23.7%, 与相关文献报道相当.

Dieulafoy's病占上消化道非静脉曲张破裂出血的1%-5.8%<sup>[15]</sup>, 目前常用的内镜下治疗手段

包括注射肾上腺素及热凝固法、血管夹法及套扎法。在应用注射肾上腺素及热凝固法治疗的4例患者中,效果较差,手术率达50%。与常规治疗上消化道出血相仿,在内镜治疗活动出血病灶后,应静脉应用质子泵抑制剂,抑制胃酸分泌,提高胃腔内pH值,减少纤溶作用,促进血小板聚集,从而降低再出血率,减少输血量及手术率<sup>[5,16-17]</sup>。

内镜下注射肾上腺素及热凝固法治疗上消化道活动性非静脉曲张破裂出血有较好效果,加用质子泵抑制剂能进一步降低再出血率,提高治疗效果。

#### 4 参考文献

- 1 Laine L. Endoscopic therapy for bleeding ulcers: room for improvement? *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 557-560
- 2 Cook DJ, Guyatt GH, Salena BJ, Laine LA. Endoscopic therapy for acute nonvariceal upper gastrointestinal hemorrhage: a meta-analysis. *Gastroenterology* 1992; 102: 139-148
- 3 Non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage: guidelines. *Gut* 2002; 51 Suppl 4: iv1-6
- 4 Chua TS, Fock KM, Ng TM, Teo EK, Tan JY, Ang TL. Epinephrine injection therapy versus a combination of epinephrine injection and endoscopic hemoclip in the treatment of bleeding ulcers. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1044-1047
- 5 Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW. Systematic review and meta-analysis: proton-pump inhibitor treatment for ulcer bleeding reduces transfusion requirements and hospital stay-results from the Cochrane Collaboration. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 169-174
- 6 Andriulli A, Annese V, Caruso N, Pilotto A, Accadia L, Niro AG, Quitadamo M, Merla A, Fiorella S, Leandro G. Proton-pump inhibitors and outcome of endoscopic hemostasis in bleeding peptic ulcers: a series of meta-analyses. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 207-219
- 7 王孟春, 张丽瑶, 王彩霞, 孙思予. 氩等离子电凝联合复方五倍子喷洒治疗消化道出血32例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1924-1925
- 8 Cipolletta L, Bianco MA, Marmo R, Rotondano G, Piscopo R, Vingiani AM, Meucci C. Endoclips versus heater probe in preventing early recurrent bleeding from peptic ulcer: a prospective and randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 147-151
- 9 Lin HJ, Tseng GY, Perng CL, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Comparison of adrenaline injection and bipolar electrocoagulation for the arrest of peptic ulcer bleeding. *Gut* 1999; 44: 715-719
- 10 Cipolletta L, Bianco MA, Rotondano G, Piscopo R, Prisco A, Garofano ML. Prospective comparison of argon plasma coagulator and heater probe in the endoscopic treatment of major peptic ulcer bleeding. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 191-195
- 11 Gevers AM, De Goede E, Simoons M, Hiele M, Rutgeerts P. A randomized trial comparing injection therapy with hemoclip and with injection combined with hemoclip for bleeding ulcers. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 466-469
- 12 Barkun A, Bardou M, Marshall JK. Consensus recommendations for managing patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann Intern Med* 2003; 139: 843-857
- 13 Chau CH, Siu WT, Law BK, Tang CN, Kwok SY, Luk YW, Lao WC, Li MK. Randomized controlled trial comparing epinephrine injection plus heat probe coagulation versus epinephrine injection plus argon plasma coagulation for bleeding peptic ulcers. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 455-461
- 14 Chung SS, Lau JY, Sung JJ, Chan AC, Lai CW, Ng EK, Chan FK, Yung MY, Li AK. Randomised comparison between adrenaline injection alone and adrenaline injection plus heat probe treatment for actively bleeding ulcers. *BMJ* 1997; 314: 1307-1311
- 15 Walmsley RS, Lee YT, Sung JJ. Dieulafoy's lesion: a case series study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3574-3577
- 16 Lau JY, Sung JJ, Lee KK, Yung MY, Wong SK, Wu JC, Chan FK, Ng EK, You JH, Lee CW, Chan AC, Chung SC. Effect of intravenous omeprazole on recurrent bleeding after endoscopic treatment of bleeding peptic ulcers. *N Engl J Med* 2000; 343: 310-316
- 17 Khuroo MS, Khuroo MS, Farahat KL, Kagevi IE. Treatment with proton pump inhibitors in acute non-variceal upper gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 11-25

电编 张敏 编辑 张焕兰



# 胃癌Runx3基因的甲基化

杨少辉, 戴冬秋

杨少辉, 戴冬秋, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271477, 30572162  
教育部留学回国人员科研启动基金项目, No. 2002-247  
教育部“高等学校博士学科点专项科研基金”资助项目, No. 20050159001  
通讯作者: 戴冬秋, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科. daidq63@163.com  
电话: 024-83283560  
收稿日期: 2006-10-27 接受日期: 2007-02-08

## Methylation status of Runx3 gene in human gastric cancer

Shao-Hui Yang, Dong-Qiu Dai

Shao-Hui Yang, Dong-Qiu Dai, Department of Oncological Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271477, No. 30572162; the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2002-247; and the Special Scientific Research Foundation for High School Doctor Subject, State Education Ministry, No. 20050159001  
Correspondence to: Dr. Dong-Qiu Dai, Department of Oncological Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. daidq63@163.com  
Received: 2006-10-27 Accepted: 2007-02-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the methylation status of Runx3 gene and human primary gastric cancer.

**METHODS:** The methylation status of Runx3 gene in 38 gastric carcinoma specimens, the corresponding normal gastric mucosa and lymph nodes was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR).

**RESULTS:** Aberrant methylation of Runx3 gene was detected in 73.7% of gastric cancer specimens, 65.8% of lymph nodes and 21.1% of the corresponding normal mucosa, and there were significant differences between the former two and the latter. Runx3 methylation was significantly correlated with the tumor size ( $P = 0.021$ ), but not with the general types, differentiation degree, invasion depth and growth style of gastric cancer.

**CONCLUSION:** Aberrant methylation of Runx3 gene is a common event in the occurrence and progression of gastric cancer, which may provide useful information for the early diagnosis and assessment of lymph node metastasis.

**Key Words:** Gastric cancer; Methylation-specific polymerase chain reaction; Methylation; Runx3

Yang SH, Dai DQ. Methylation status of Runx3 gene in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1283-1287

### 摘要

**目的:** 探讨Runx3基因甲基化与胃癌的关系。

**方法:** 采用MSP法检测38例配对胃癌组织、癌旁正常组织和转移淋巴结中Runx3基因甲基化的情况。

**结果:** 73.7%的胃癌组织中存在Runx3基因异常甲基化, 而相应的癌旁正常组织和转移淋巴结中该基因的甲基化率分别为21.1%和65.8%。癌组织和转移淋巴结中Runx3基因甲基化的发生率显著高于癌旁正常组织( $P < 0.05$ )。胃癌组织中, 该基因甲基化与肿瘤大小显著相关( $P = 0.021$ ), 但与肿瘤大体类型、分化程度、浸润深度及生长方式等临床病理特征无关。

**结论:** Runx3基因异常甲基化是胃癌发生、发展过程中的频繁事件, 通过检测胃黏膜组织及淋巴结中该基因的甲基化情况, 可能会对胃癌的早期诊断及判断淋巴结的微转移提供一定的参考价值。

**关键词:** 胃癌; Runx3基因; 甲基化

杨少辉, 戴冬秋. 胃癌Runx3基因的甲基化. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1283-1287  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1283.asp>

### 0 引言

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其发生、发展与多种肿瘤抑制基因和肿瘤相关基因

### ■背景资料

DNA甲基化是哺乳动物细胞基因表达调控的重要方式之一, 研究发现, 恶性肿瘤组织中普遍存在着肿瘤抑制基因启动子高甲基化的现象, 通过去甲基化试剂干预, 一些胃癌细胞株可以恢复这些基因的功能。

# ■创新盘点

淋巴结转移是胃癌转移的主要途径,以往对胃癌甲基化的研究主要集中于胃癌组织和癌旁正常组织,本研究首次采用MSP法同时检测了胃癌组织、癌旁正常组织和转移淋巴结中Runx3基因的甲基化现象。

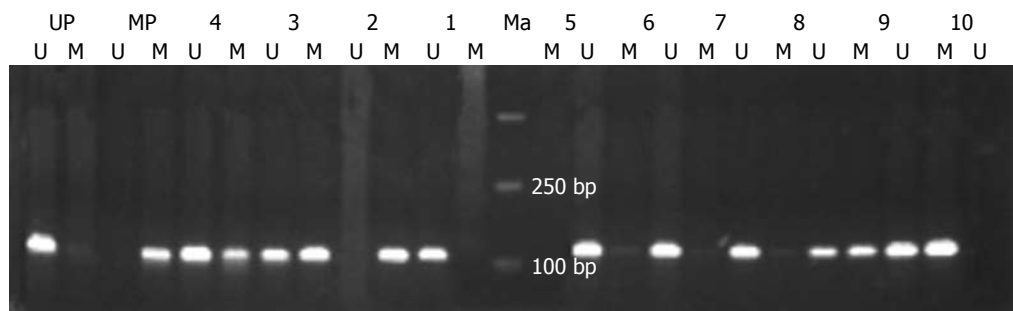


图1 Runx3基因在胃癌组织中的表达。Ma: marker DL2000; MP: 甲基化阳性对照; UP: 甲基化阴性对照; 1-10: 实验标本; M: 甲基化产物; U: 非甲基化产物。

的失活有关。目前的研究发现,胃癌中许多肿瘤抑制基因和肿瘤相关基因的失活是由于基因启动子区的异常甲基化引起的,通过去甲基化试剂干预,一些胃癌细胞株可以恢复这些基因的功能<sup>[1-3]</sup>。Runx3蛋白是TGF- $\beta$ 超家族信号传导通路下游的一个转录因子,介导TGF- $\beta$ 生长抑制的功能,在哺乳动物的发育及组织分化过程中发挥重要作用,对防止肿瘤的发生及遏制肿瘤的发展具有重要意义<sup>[4]</sup>。胃癌中,Runx3基因功能缺失严重,但突变率很低,提示存在其他的失活方式。鉴于Runx3基因启动子区具有典型的CpG岛序列,我们采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)法检测了胃癌原发灶、癌旁正常组织及转移淋巴结中Runx3基因的甲基化状态,以期揭示Runx3基因甲基化与胃癌发生、发展以及与临床病理特征的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学附属第一医院肿瘤外科2005-02/08手术切除的胃癌组织,相应的癌旁正常组织和转移淋巴结。所取组织离体后立即一分为二,一份液氮中速冻10 min,然后置-70℃冰箱中保存。另一份以40 g/L甲醛溶液固定,制作常规病理切片,HE染色,确定病理诊断。所有胃癌患者术前均未行化疗或放疗,男26例,女性2例,年龄为36-80(中位57)岁。所有癌旁组织经病理检查未发现肿瘤细胞,所取淋巴结组织经病理证实存在癌细胞。正常对照标本取自无消化系统疾病及任意肿瘤的正常人外周血,EDTA抗凝。hydroquinone购自Fluka公司, sodium bisulfite购自Sigma公司, Wizard DNA Clean-Up System购自Promega公司, Taq酶购自大连宝生物公司。甲基化酶Sss I为New England公司产品,引物委托大连宝生物公司合成。

1.2 方法 常规酚/氯仿抽提法提取DNA, -20℃暂

存。取4  $\mu$ g DNA, 去离子水稀释至90  $\mu$ L, 按文献[5]中的方法进行DNA预处理, 之后用Wizard DNA Clean-up System纯化, 方法按说明书操作。用50 mL TE溶解DNA, -20℃贮存备用。冰上配制PCR反应体系(20  $\mu$ L): 去离子水13.2  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, sodium bisulfite修饰后的DNA模板2  $\mu$ L, 引物(0.01 mol/L) 各0.5  $\mu$ L, Taq酶( $5 \times 10^6$  U/L) 0.2  $\mu$ L。95℃预变性5 min之后进行40个循环的反应: 95℃变性20 s, 55℃复性20 s, 72℃延伸30 s。最后一个循环后延伸7 min。RUNX3甲基化特异性引物序列: 正向: 5'-ATA ATA GCG GTC GTT AGG GCG TCG-3'; 反向: 5'-GCT TCT ACT TTC CCA CTT CTC ACA-3'; 产物大小115 bp。Runx3非甲基化特异性引物: 正向: 5'-ATA ATA GTG GTT GTT AGG GTG TTG-3'; 反向: 5'-ACT TCT ACT TTC CCA CTT CTC ACA-3'; 产物大小115 bp。GenBank Accession No. AL023096。取5  $\mu$ L PCR产物在25 g/L琼脂糖凝胶上电泳, GeneFinder染料染色。每批标本均同时扩增甲基化酶Sss I修饰和未修饰的正常人外周血DNA作为甲基化阳性和阴性对照。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行Fisher's精确检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

用Runx3甲基化特异性引物和Runx3非甲基化特异性引物扩增甲基化酶Sss I修饰(甲基化阳性对照)和未修饰(甲基化阴性对照)的正常人外周血DNA时, 分别只有M引物和U引物得到预期大小的扩增片段(图1), 提示实验技术及所用引物和试剂正确, 实验结果可信。Runx3基因在胃癌组织、癌旁正常组织和转移淋巴结中均存在甲基化修饰, 其阳性率分别是73.7%, 21.1%, 65.8%, 部分甲基化特异性PCR检测结果见图1。

表 1 38例不同组织Runx3基因甲基化与胃癌临床病理特点的关系(%)

临床病理特征	<i>n</i>	癌旁组织 甲基化	原发灶 甲基化	转移淋巴结 甲基化
肿瘤大小				
≤5 cm	14	1(7.1)	7(50.0)	7(50.0)
>5 cm	24	7(29.2)	21(87.5) <sup>a</sup>	18(75.0)
Borrmann分型				
Borrmann I + II	1	0(0)	1(100.0)	1(100.0)
Borrmann III	31	7(22.6)	23(74.2)	20(64.5)
Borrmann IV	5	1(20.0)	4(80.0)	4(80.0)
生长方式				
巢状+团状	15	3(20.0)	10(66.7)	10(66.7)
弥漫性	23	5(21.7)	18(78.3)	15(65.2)
分化程度				
高/中分化	13	3(23.1)	10(76.9)	8(61.5)
低分化	25	5(20.0)	18(72.0)	17(68.0)
浸润深度				
T1+2	26	4(15.4)	19(73.1)	16(61.5)
T3+4	12	4(33.3)	9(75.0)	9(75.0)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 肿瘤大小≤5 cm者.

结果表明胃癌组织与转移淋巴结中甲基化率无差异( $P > 0.05$ ), 两者与癌旁正常组织比较分别存在差异( $P < 0.01$ ). 原发灶中, Runx3基因甲基化与癌灶大小相关( $P = 0.021$ ), 但与肿瘤大体类型、分化程度、浸润深度及生长方式等临床病理特征无关(表1).

### 3 讨论

DNA甲基化是具有可逆性与遗传性的一种基因修饰方式, 是指DNA双螺旋中, 胞嘧啶核苷的嘧啶环第5位碳原子在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)介导下以S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体而发生甲基化<sup>[6]</sup>. 目前普遍认为, DNA异常甲基化改变是除缺失与突变之外导致肿瘤抑制基因失活的第3种机制. Kang *et al*<sup>[7]</sup>研究了一系列胃癌癌前病变组织和癌组织中12个基因的甲基化状态, 发现平均每例胃癌组织中有5.2个基因存在甲基化. 可见肿瘤抑制基因发生甲基化是胃癌形成过程中的频繁事件, 其在肿瘤的形成和发展中的作用及其作为分子治疗的靶向的潜在价值不容忽视. Runx3蛋白是TGF- $\beta$ 超家族信号传导通路下游的一个转录因子, Li *et al*<sup>[8]</sup>发现, 缺乏Runx3基因的小鼠胃黏膜上皮细胞增殖加快, 而其凋亡受到抑制, 使黏膜明显增厚, 并且细胞对生长抑制因子(例如TGF- $\beta$ )表

现出拮抗效应, 表明Runx3基因是胃上皮细胞生长和增殖的调控者. 大约一半以上的胃癌组织和更高比例的胃癌细胞株中, Runx3基因表达明显降低甚至缺失<sup>[9-12]</sup>, 将外源性Runx3基因转入Runx3缺失的裸鼠, 结果显示转基因组的胃癌细胞集落大小和数目均明显少于对照组<sup>[10]</sup>. 与之相比, 目前虽然已经发现多种与胃癌相关的肿瘤抑制基因, 但他们与胃癌的相关性偏小, 因而, Runx3很可能是与胃癌发生相关的一个关键性基因<sup>[7]</sup>. Guo *et al*<sup>[13]</sup>以化疗药物处理Runx3基因高表达的胃癌细胞系, 发现其对化疗药物的敏感性显著提高, 说明Runx3基因对胃癌的治疗也具有重要的意义. 目前的研究发现, Runx3基因在肿瘤中很少发生突变<sup>[8,14-15]</sup>, 却存在很高的甲基化率<sup>[16-17]</sup>. 我们采用MSP法检测了38例胃癌组织中Runx3基因的甲基化情况, 发现73.7%(28/38)的胃癌组织中, Runx3基因启动子存在高甲基化, 这与先前报道的甲基化率基本相似<sup>[8-11,15]</sup>. 证实Runx3基因启动子甲基化是胃癌中的频繁事件. 我们研究发现, 胃癌组织中该基因甲基化与肿瘤大小显著相关, 肿瘤长>5 cm者发生基因甲基化的几率大于长径≤5 cm者. Waki *et al*<sup>[18]</sup>认为, 就胃黏膜组织而言, Runx3基因甲基化具有非常高的癌组织特异性. 在他们的实验中, 只有年龄≥77岁的非胃癌个体的胃黏膜才存在

### ■应用要点

本研究发现, Runx3基因甲基化是胃癌发生、发展过程中的频繁事件, 通过检测胃黏膜组织中该基因的甲基化情况, 有助于胃癌的早期诊断, 而检测胃癌相应淋巴结中该基因的甲基化情况有可能成为发现胃癌微转移的新方法.

## ■名词解释

甲基化特异性PCR: 用亚硫酸氢钠处理DNA后, 未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变。据此, 设计甲基化特异性引物(假设模板链与引物结合的片段中胞嘧啶发生甲基化)和非甲基化特异性引物(假设模板链与引物结合的片段中胞嘧啶未发生甲基化)对模板进行PCR扩增。

该基因甲基化, 即使在胃癌患者的癌旁正常组织, Runx3基因甲基化率也仅为8%(7/93)。但在我们的研究中, 癌旁正常组织Runx3基因甲基化率却高达21.1%(8/38)。对于两项研究结果间的差异, 我们认为主要是标本构成不同引起的。在Waki *et al*<sup>[18]</sup>研究发现, 35.5%(33/93)的患者为早期胃癌, 而我们的患者中只有2.6%(1/38)是早期胃癌, 绝大多数是进展期胃癌, 且已经出现淋巴结转移。我们推测, 一方面我们所检测的癌旁组织的性质更接近癌组织, 其发生甲基化的可能性要高。Kim *et al*<sup>[10]</sup>研究发现, Runx3基因在慢性胃炎、肠化生和胃腺瘤、胃癌组织中的甲基化率呈递增趋势( $P < 0.05$ )。遗憾的是我们无法得知Waki *et al*<sup>[18]</sup>所检测的癌旁组织的病理性质, 因而不能作出较为明确的比较。另一方面, 虽然我们所检测的癌旁组织经病理证实无癌细胞, 但可能已经有形态学无法观察到的癌细胞发生或浸润。我们对癌旁正常组织的检测分析同时也说明Runx3基因甲基化是胃癌发生的早期事件, 除了检测癌组织和癌旁正常组织Runx3基因甲基化情况外, 我们还首次检测了转移淋巴结中该基因的甲基化情况。由于转移淋巴结中存在与原发灶同质的癌细胞, 因而转移淋巴结中Runx3基因的甲基化趋势与原发灶基本一致是容易理解的。另外, 不同于原发灶, 92.1%(35/38)转移淋巴结标本都得到了Runx3非甲基化特异性引物的扩增片段, 这可能是由于Runx3基因不仅在胃黏膜细胞中表达, 他在T淋巴细胞的发育过程中也具有重要作用<sup>[19]</sup>。既然我们在存在癌细胞转移的淋巴结中可以检测到Runx3基因的甲基化, 且阳性率是如此之高, 那我们是否可以通过检测淋巴结中Runx3基因的甲基化状态来判断癌细胞的微转移呢? 这有待于我们进一步研究。

我们的研究发现, Runx3基因甲基化与肿瘤大体类型、生长方式、浸润深度等临床病理特征无明显的相关性, 这可能与我们所采用的样本量小有关, 有待于扩大样本量以进一步研究。

## ■同行评价

本文用甲基化特异性PCR的方法检测了胃癌、转移淋巴结及癌旁组织中Runx3基因的甲基化情况, 文章书写规范, 方法可靠, 结果可信, 有一定的学术价值。

## 4 参考文献

- Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, Kwon JG, Sohn YK, Kwak EK, Kim JW. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 236-241
- Homma N, Tamura G, Honda T, Jin Z, Ohmura K, Kawata S, Motoyama T. Hypermethylation of Chfr and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias. *Virchows Arch* 2005; 446: 120-126

- Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 131-142
- Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167
- Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
- Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itoharu S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- Oshimo Y, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Ito Y, Chayama K, Yasui W. Frequent loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Pathobiology* 2004; 71: 137-143
- Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- Guo WH, Weng LQ, Ito K, Chen LF, Nakanishi H, Tatematsu M, Ito Y. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor. *Oncogene* 2002; 21: 8351-8355
- Sakakura C, Hagiwara A, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ito K, Yamagishi H, Yazumi S, Chiba T, Ito Y. Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor C/EBPβ in gastric cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 221-228
- Guo C, Ding J, Yao L, Sun L, Lin T, Song Y, Sun L, Fan D. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1. *Int J Cancer* 2005; 116: 155-160
- Mori T, Nomoto S, Koshikawa K, Fujii T, Sakai M, Nishikawa Y, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, Nakao A. Decreased expression and frequent allelic inactivation of the RUNX3 gene at 1p36 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 380-388
- 曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏. Runx3基因在胃癌中的表达及其表达下调机制. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 250-255
- Suzuki M, Shigematsu H, Shames DS, Sunaga N, Takahashi T, Shivapurkar N, Iizasa T, Frenkel EP, Minna JD, Fujisawa T, Gazdar AF. DNA methylation-associated inactivation of TGFβ-related genes DRM1/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers. *Br J Cancer* 2005; 93: 1029-1037
- Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC. RUNX3 inactivation by



- point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 9347-9354
- 18 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 19 Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002; 111: 621-633

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

# 2007 中西医结合肝胆胰疾病难点与热点论坛

**本刊讯** 由中国中西医结合学会普通外科专业委员会、天津市南开医院主办, 山东省中西医结合学会、青岛市南区人民医院承办, 中国中西医结合临床外科杂志社、世界华人消化杂志社协办的2007中西医结合肝胆胰疾病难点与热点论坛定于2007-07-06/08在青岛市召开. 参加会议者可获得国家级 I 类继续教育学分.

## 1 专题讲座

黎洁良(解放军304医院): 外科抗生素的应用; 崔乃强(天津市南开医院): 胆道再次手术的处理方式; 任建安(南京军区总医院): 外科危重病的治疗进展; 大柳治正(日本近畿大学): 外科营养研究新进展; 李强(天津医科大学附属肿瘤医院): 肝癌外科治疗现状; 刘彤(天津医科大学总医院): 胃癌根治术中医药在小肠移植中的应用价值; 刘续宝(四川大学华西医学院): 胰腺癌和慢性胰腺炎的关系; 夏庆(四川大学华西医学院): 重症急性胰腺炎中西医结合临床指南(2007); 齐清会(大连医科大学附属医院): MODS胃肠运动功能障碍和中西医结合治疗; 傅强(天津市南开医院): 通里攻下法对腹部外科MODS的治疗; 马骏(天津医科大学): 科研统计在临床医学中的应用.

## 2 征文内容

(1)肝脏外科: 肝癌的外科治疗、肝内胆管结石的肝切除; (2)胰腺外科: 重症急性胰腺炎、胰腺癌的治疗; (3)胆道外科: 胆石成因研究、胆道再手术经验及中西医结合治疗、医源性胆道损伤及预防、胆道内引流术、十二指肠镜、胆道镜在胆胰外科的应用; (4)微创外科: 微创技术在肝胆胰外科应用.

## 3 征文要求

全文要求4000字以内, 并附600字摘要. 报送会议的文章必须是未公开发表过(包括会议及杂志). 投稿时请附软盘, 用word软件输入, 注明作者姓名、单位、邮编并加盖公章(或附介绍信). 投稿地址: 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院科研科 沈啸洪, 王洁, 陈玮(收); 邮编: 300100; 或发邮件至nkyykyk@126.com. 截稿日期: 2007-06-10.

# 腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$ 表达与胃癌腹膜转移的关系

赵东晖, 徐惠绵, 孙秀菊, 张世浦

## ■背景资料

腹膜转移是胃癌术后患者最常见的复发形式, 是影响患者预后的重要因素之一。研究腹膜转移的过程、机制, 探寻其早期诊断和治疗方法, 对改善胃癌的治疗效果具有重要的理论和实践意义。

赵东晖, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001  
孙秀菊, 中国医科大学医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001  
张世浦, 沈阳医学院沈洲医院普外科 辽宁省沈阳市 110002  
辽宁省科学技术计划资助项目, No. 2005225005  
沈阳医学院科学研究基金资助项目, No. 20061004  
通讯作者: 徐惠绵, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科, huimianxu@163.com  
电话: 024-83283555 传真: 024-22703578  
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-08

## Expression of CD44 and integrin $\beta 1$ in peritoneal lavage fluid and their correlations with the peritoneal metastasis of gastric cancer

Dong-Hui Zhao, Hui-Mian Xu, Xiu-Ju Sun, Shi-Pu Zhang

Dong-Hui Zhao, Hui-Mian Xu, Department of Oncological Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Xiu-Ju Sun, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Shi-Pu Zhang, Department of General Surgery, Shenzhou Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning Province, China

Supported by the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2005225005, and the Research Foundation of Shenyang Medical College, No. 20061004

Correspondence to: Hui-Mian Xu, Department of Oncological Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. huimianxu@163.com

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of CD44 and integrin  $\beta 1$  mRNA in peritoneal lavage fluid and their correlations with the peritoneal metastasis of gastric cancer.

**METHODS:** The samples of peritoneal lavage fluid were collected during operation from 50 patients with gastric cancer. The expression of CD44 and integrin  $\beta 1$  was detected at mRNA level by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the examination of peritoneal lavage cytology (PLC) was also performed. All the cases were divided into dif-

ferent groups according to the invasion depth of foci, serosal types, results of PLC, peritoneal metastasis and TNM stages. Then the expression of CD44 and integrin  $\beta 1$  mRNA was compared among various groups.

**RESULTS:** The expression of CD44 mRNA was closely related to serosal types ( $F = 4.59, P < 0.05$ ), peritoneal metastasis ( $t = 2.655, P < 0.05$ ), results of PLC ( $t = 3.126, P < 0.01$ ) and TNM stages ( $t = 3.453, P < 0.01$ ). Integrin  $\beta 1$  mRNA expression was significantly higher in patients with peritoneal metastasis than that without metastasis ( $t = 2.241, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of CD44 and integrin  $\beta 1$  mRNA in peritoneal lavage fluid is related to the peritoneal metastasis-related factors and TNM stages of gastric cancer, detection of their levels is helpful to evaluate the progression, prognosis and early diagnosis of gastric cancer.

**Key Words:** Stomach neoplasm; Peritoneal metastasis; CD44; Integrin  $\beta 1$

Zhao DH, Xu HM, Sun XJ, Zhang SP. Expression of CD44 and integrin  $\beta 1$  in peritoneal lavage fluid and their correlations with the peritoneal metastasis of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1288-1291

## 摘要

**目的:** 探讨腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA表达与胃癌腹膜转移的关系。

**方法:** 收集50例胃癌患者的腹腔液标本, 用RT-PCR法检测其中CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA的表达, 同时行腹腔液细胞学(PLC)检查。按病灶浸润深度、浆膜类型、PLC检查结果、腹膜转移情况和TNM分期分组, 比较不同组之间CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA的表达水平。

**结果:** 腹腔液CD44 mRNA表达水平与浆膜类型( $F = 4.59, P < 0.05$ )、腹膜转移有关( $t = 2.655, P < 0.05$ ), 与PLC检查( $t = 3.126, P < 0.01$ )和TNM

## ■研究前沿

对黏附分子、蛋白水解酶、肿瘤转移相关基因等在腹膜转移发生、发展过程中作用的研究, 已经成为目前学界的热点, 但多数研究以细胞株为对象, 与临床实际情况尚有距离。

分期密切相关( $t = 3.453, P < 0.01$ ); 腹膜转移组的整合素 $\beta 1$  mRNA表达明显高于未转移组的水平( $t = 2.241, P < 0.05$ ).

**结论:** 腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA表达与胃癌腹膜转移相关因素及TNM分期密切相关, 检测其水平有助于估计胃癌病程进展和患者预后, 对腹膜转移的早期诊断也有一定价值.

**关键词:** 胃肿瘤; 腹膜种植性转移; CD44; 整合素 $\beta 1$

赵东晖, 徐惠绵, 孙秀菊, 张世浦. 腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$ 表达与胃癌腹膜转移的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1288-1291

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1288.asp>

## 0 引言

胃癌术后腹膜转移是影响患者长期生存的重要因素之一. 目前认为, 黏附分子CD44和整合素 $\beta 1$ 在腹膜转移的早期阶段发挥了重要作用<sup>[1]</sup>. 我们采用逆转录聚合酶链式反应, 即RT-PCR法检测胃癌患者腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA的表达, 旨在探讨其表达水平与胃癌腹膜转移和病程进展的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2004-08/2005-01中国医科大学第一临床学院肿瘤外科50例胃癌手术患者的腹腔液. 根据病灶浸润深度、浆膜类型<sup>[2]</sup>、腹腔液细胞学(peritoneal lavage cytology, PLC)检查结果、有无肉眼腹膜转移及TNM分期进行分组. 细胞总RNA提取试剂TRIzol Reagent(Gibco BRL公司), 逆转录试剂盒Reverse Transcription System A3500、Taq DNA合成酶、PCR反应缓冲液(Promega公司), CD44、整合素 $\beta 1$ 及内对照 $\beta$ -actin的PCR引物(上海生工生物工程有限公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 腹腔液收集和PLC检查** 手术中开腹后, 于直肠-膀胱凹陷(女性为直肠-子宫凹陷, 即Douglas腔)置入一根导尿管, 注入无菌生理盐水100 mL, 轻轻搅拌后抽出; 如有自然腹水则直接抽取, 混血标本弃用. 将腹腔液送中国医科大学第一临床学院细胞病理室, 以2000 r/min离心10 min, 取少许沉渣涂片, 行巴氏(Papanicolaou)染色, 在显微镜下行PLC检查. 结果由两名病理学专家共同判定. 其余沉渣于-80℃冰箱中保存.

**1.2.2 细胞总RNA提取** 取出保存的沉渣, 按照

TRIzol试剂说明书进行细胞总RNA提取. 将提取的RNA溶于10  $\mu$ L的无RNA酶水中, 于-80℃冰箱保存.

**1.2.3 RT-PCR检测** 取1  $\mu$ L RNA溶解液, 参照逆转录试剂盒说明书的比例加样, 进行逆转录反应. 反应条件为: 42℃, 60 min; 99℃, 5 min; 4℃, 5 min. 以cDNA为模板进行PCR扩增. CD44引物序列: 5'-GACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC-3'和5'-GATGCCAAGATGATCAGCCATTCTGGAA-3', 产物片段482 bp; 整合素 $\beta 1$ 引物序列: 5'-GTGGAGAATGTATACAAGCAGG-3'和5'-CTAATGTAAGGCATCACAGTC-3', 产物片段486 bp; 内对照 $\beta$ -actin引物序列5'-TATCCAGGCTGTGCTATCCC-3'和5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3', 产物片段320 bp. CD44 PCR反应条件: 变性: 95℃, 1 min; 退火: 55℃, 1 min; 延伸: 72℃, 1 min; 共30个循环; 整合素 $\beta 1$  PCR反应条件: 变性: 95℃, 45 s; 退火: 57℃, 45 s; 延伸: 72℃, 1 min; 共30个循环. 取PCR产物10  $\mu$ L行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 以GDS8000自动成像仪拍下电泳图像; 采用Gel-work-ID软件, 分析图像, 计算目的基因表达的相对定量值.

**统计学处理** 不同浸润深度、浆膜类型间的比较用方差分析, PLC是否阳性、有无腹膜转移及不同TNM分期期间的比较用 $t$ 检验.

## 2 结果

**2.1 CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA表达水平与腹膜转移及其相关因素的关系** CD44 mRNA表达水平与浆膜类型和腹膜转移有关, 与PLC结果密切相关; 整合素 $\beta 1$  mRNA表达水平与腹膜转移有关(图1, 表1).

**2.2 CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA表达水平与胃癌TNM分期的关系** TNMIII+IV期病例腹腔液中CD44 mRNA表达水平显著高于I+II期病例的水平. 整合素 $\beta 1$  mRNA表达水平在两组间无统计学差异(表2).

## 3 讨论

腹膜转移是进展期胃癌术后最常见的复发形式, 其发生是一系列复杂过程的综合结果, 涉及黏附、降解、移动、血管生成、免疫逃避等多方面机制. 在转移发生的初始阶段, CD44和整合素 $\beta 1$ 介导的黏附过程发挥了重要作用<sup>[1,3-4]</sup>.

人类CD44基因位于第11号染色体短臂, 其编码的黏附分子CD44是一种分布极为广泛的

### ■相关报道

徐惠绵、王夫景 *et al*检测了胃癌患者腹腔液中CEA mRNA的表达, 发现腹腔液CEA检测较传统的细胞学检查更加敏感, 对腹膜转移的预测和早期发现具有重要意义, 从而为此方面研究提供了新的手段和思路.

### ■创新盘点

本文将RT-PCR等先进研究手段应用于临床标本的检测, 使结论更接近临床实际, 具有明显的可操作性和实践意义.

# ■名词解释

浆膜类型: 张文范 *et al* 提出, 根据胃癌浆膜的大体形态不同, 将其分为正常型、反应型、结节型、腱状型和多彩弥漫型, 各类型由轻到重, 反映了胃癌病灶侵袭浆膜的程度。

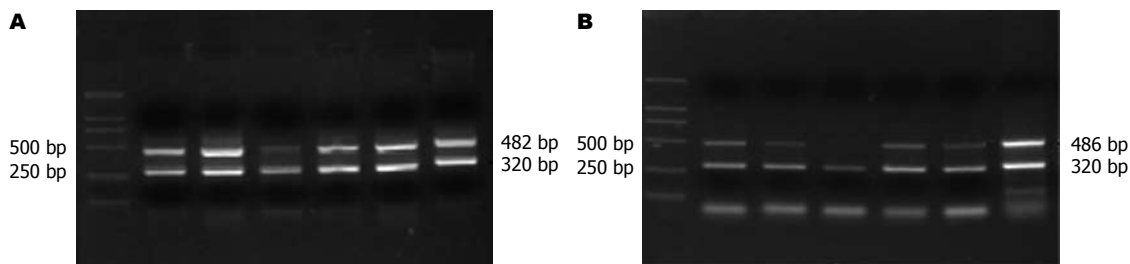


图1 CD44和整合素β1 mRNA RT-PCR电泳图. A: CD44; B: 整合素β1; 最左侧为DNA Marker.

细胞表面透明质酸受体. 许多学者认为, CD44基因和蛋白的异常表达与肿瘤的侵袭、转移行为密切相关, 并可能是癌细胞获得浸润、转移能力的决定因素之一<sup>[5]</sup>. CD44除了参与黏附过程外, 还可通过促进肿瘤细胞释放蛋白水解酶, 协助其逃避人体的免疫监视, 加速细胞迁移速率等机制促进转移<sup>[3,6]</sup>. 体外实验证实, CD44在腹膜转移进程中发挥着重要的促进作用<sup>[7-8]</sup>, 通过转染反义寡核苷酸或基因敲除等方式处理肿瘤细胞, 可以明显地抑制其增生、转移潜能<sup>[9-10]</sup>. 本研究显示, 腹腔液中CD44 mRNA的表达在PLC检查阳性组明显高于阴性组( $P<0.01$ ), 并与浆膜类型和腹膜转移等因素有关( $P<0.05$ ), 提示CD44 mRNA表达水平与腹膜转移及其相关因素之间存在着密切联系; 随着腹膜转移的进展, 腹腔液中CD44 mRNA的表达水平逐渐增高.

整合素β1是整合素家族的主要亚基, 在许多肿瘤细胞系和人类实体肿瘤中出现高表达, 并与肿瘤的浸润性、低分化趋向和转移等恶性表型密切相关<sup>[11-12]</sup>. 和CD44一样, 整合素β1能够增强肿瘤细胞对间皮细胞和细胞外基质的黏附能力, 还能促进肿瘤细胞对蛋白水解酶的释放和活化, 促进肿瘤血管生成, 并加速肿瘤细胞迁移<sup>[13-15]</sup>. 本研究中, 腹腔液整合素β1 mRNA表达水平与腹膜转移有关( $P<0.05$ ); 此外, 随着病灶浸润的加深、浆膜受侵的加重和PLC阳性结果的出现, 其表达水平也有升高趋势, 但是没有统计学意义. 由此, 我们认为, 腹腔液中整合素β1 mRNA的表达与胃癌腹膜转移进程有关, 也是促进腹膜转移发生的重要因素之一. 但与CD44 mRNA相比, 整合素β1 mRNA的表达仅在形成肉眼腹膜转移后才表现出与无转移组之间的差异; 这表明, 在腹膜转移进程中, 整合素β1可能比CD44更迟发挥作用.

在腹膜转移的早期诊断方面, PLC检查目前被公认为最重要的手段, 但是由于细胞学诊断本身的复杂性和结果判定时难以避免的主

表1 CD44和整合素β1 mRNA表达与腹膜转移及其相关因素的关系(mean ± SD)

项目	n	CD44	整合素β1
浸润深度			
黏膜+黏膜下	5	0.702 ± 0.077	0.680 ± 0.124
肌层+浆膜下	31	0.793 ± 0.265	0.682 ± 0.122
穿透浆膜	14	0.869 ± 0.246	0.778 ± 0.149
浆膜类型			
正常+反应型	9	0.623 ± 0.111 <sup>a</sup>	0.648 ± 0.130
结节型	14	0.737 ± 0.217	0.688 ± 0.138
腱状+多彩型	27	0.901 ± 0.255	0.740 ± 0.144
PLC检查			
阴性	31	0.726 ± 0.189 <sup>d</sup>	0.679 ± 0.132
阳性	19	0.934 ± 0.282	0.757 ± 0.151
腹膜转移			
阴性	38	0.756 ± 0.247 <sup>e</sup>	0.686 ± 0.125 <sup>e</sup>
阳性	12	0.961 ± 0.179	0.781 ± 0.138

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 结节型、腱状+多彩型; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs PLC检查阳性;

<sup>e</sup> $P<0.05$  vs 腹膜转移阳性.

表2 CD44和整合素β1 mRNA表达与胃癌TNM分期的关系(mean ± SD)

TNM分期	n	CD44	整合素β1
I + II 期	19	0.667 ± 0.129 <sup>b</sup>	0.666 ± 0.117
III + IV 期	31	0.890 ± 0.262	0.735 ± 0.141

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs III + IV 期.

观性, 其正确诊断率存在着较大波动, 一般仅为40%-60%. 近来的研究将免疫细胞化学检查与之结合起来, 提高了诊断的特异性. 应用新兴的生物学技术, 在分子水平对腹膜转移进行预测和早期诊断, 也是该领域的发展趋势之一. 已有学者发现, 腹腔液中CEA mRNA的表达是诊断、预测胃癌腹膜转移的一个良好指标<sup>[7,16]</sup>. 本研究中, CD44和整合素β1 mRNA在所有腹腔液中均有表达, 因此, 其单纯定性检测不能用于腹膜转移的诊断; 主要原因在于, CD44和整合素β1



在腹腔液其他细胞成分中也有广泛表达, 不象CEA那样, 在肿瘤细胞中的表达比较特异。然而, 如前所述, PLC阳性组的CD44 mRNA表达水平明显高于阴性组的水平; 这表明, 用定量方法检测腹腔液中的CD44 mRNA表达可能成为传统PLC检查的一个有益补充, 对胃癌腹膜转移的早期诊断和预测具有重要意义。

我们还发现, 随着胃癌TNM分期的进展, 腹腔液中CD44和整合素 $\beta 1$  mRNA的表达均呈上升趋势; TNMIII+IV期病例的CD44 mRNA表达水平高于I+II期的水平( $P<0.01$ )。这一结果提示, 腹腔液中CD44 mRNA的表达水平在一定程度上反映了胃癌的病程进展, 并可以作为估计胃癌预后的一个重要指标。

#### 4 参考文献

- 1 戴冬秋. 胃癌腹膜转移研究之策略. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1049-1051
- 2 张文范, 张荫昌, 陈峻青. 胃癌. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 301-302
- 3 Okamoto I, Tsuiki H, Kenyon LC, Godwin AK, Emlet DR, Holgado-Madruga M, Lanham IS, Joynes CJ, Vo KT, Guha A, Matsumoto M, Ushio Y, Saya H, Wong AJ. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 441-447
- 4 Takatsuki H, Komatsu S, Sano R, Takada Y, Tsuji T. Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by  $\alpha 3\beta 1$  integrin (VLA-3). *Cancer Res* 2004; 64: 6065-6070
- 5 牟兆新, 侯振江. CD44及其在肿瘤研究中的进展. 医学综述 2006; 12: 341-343
- 6 Yasuda M, Tanaka Y, Fujii K, Yasumoto K. CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol* 2001; 13: 1309-1319
- 7 徐惠绵, 陈峻青, 王舒宝. 胃癌的腹膜亚临床转移检测及阻断治疗研究. 中国肿瘤临床 2002; 29: 134-137
- 8 Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L, Skubitz AP. CD44 and  $\beta 1$  integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol* 1999; 154: 1525-1537
- 9 荆雪宁, 张玲, 王芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛. 瞬时转染CD44反义寡核苷酸抑制人胃癌MGC80-3细胞增生并诱导凋亡. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2551-2554
- 10 Weber GF, Bronson RT, Ilagan J, Cantor H, Schmits R, Mak TW. Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 2281-2286
- 11 Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res* 2002; 107: 305-329
- 12 李兴睿, 郭悦青, 易继林. 整合素 $\beta 1$ 和固生蛋白Tenascin共表达与肝癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 100-103
- 13 Burleson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR Jr, Skubitz AP. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 170-181
- 14 Deryugina EI, Ratnikov BI, Strongin AY. Prinomastat, a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases, has a complex effect on migration of breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003; 104: 533-541
- 15 唐雪莲, 李静, 耿美玉. 整合素与肿瘤转移. 中国药理学通报 2005; 21: 1164-1167
- 16 王夫景, 高岩, 黄跃南, 佟伯峰, 张秀云, 杨维良. 腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹膜微转移的临床意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2148-2150

#### ■同行评价

本文研究了腹腔中CD44和整合素 $\beta 1$ 表达与胃癌腹膜转移的关系, 在胃癌腹膜转移方面的研究具有一定的科学性和可读性, 进一步充实了该领域的研究。

电编 何基才 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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2007-04-18)

# 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响

卢高峰, 唐芙爱, 郑鹏远, 马 军, 白经修

## ■背景资料

DC与CHB的发生、发展关系很密切, 通过上调DC介导的特异性免疫反应来清除体内的病毒从理论上来说是可行的。ETV作为目前临床上最强的CHB抗病毒药之一, 对于机体免疫系统的影响未见报道, 研究ETV对于CHB患者DC影响有助于更深入的探讨核苷类似物的抗病毒机制。

卢高峰, 唐芙爱, 郑鹏远, 马军, 白经修, 郑州大学第二附属医院消化科 河南省郑州市 450014

河南省卫生厅医学创新人才工程项目, No. 2004-47

通讯作者: 唐芙爱, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. lugaofeng@zzu.edu.cn

电话: 0371-65036928

收稿日期: 2007-03-14 接受日期: 2007-04-13

## **In vitro effect of entecavir on the function of dendritic cells derived from chronic hepatitis B patients**

Gao-Feng Lu, Fu-Ai Tang, Peng-Yuan Zheng, Jun Ma, Jing-Xiu Bai

Gao-Feng Lu, Fu-Ai Tang, Peng-Yuan Zheng, Jun Ma, Jing-Xiu Bai, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China

Supported by the Innovation Talent Project from Health Department of He'nan Province, No. 2004-47

Correspondence to: Fu-Ai Tang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China. lugaofeng@zzu.edu.cn

Received: 2007-03-14 Accepted: 2007-04-13

## **Abstract**

**AIM:** To investigate the effect of entecavir (ETV) on the function of dendritic cells (DC) derived from patients with chronic hepatitis B (CHB) *in vitro*.

**METHODS:** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from CHB patients and healthy controls. After proliferation under induction, the cells were cultured by routine method. Then ETV was added to co-incubate with the cells on the 4<sup>th</sup> day. On day 8, DC were collected for the detection of phenotypes and mixed lymphocytic reactions.

**RESULTS:** After 8 days of cultivation, the differentiation of DC in the healthy controls was better than that in ETV-treated group, while ETV-treated group had a better differentiation than CHB group. In comparison with those in the healthy controls, the levels of CD1a ( $35.73 \pm$

$3.12$  vs  $62.31 \pm 5.22$ ), CD80 ( $28.19 \pm 1.64$  vs  $45.38 \pm 3.10$ ), CD83 ( $22.24 \pm 2.14$  vs  $40.63 \pm 7.21$ ) and HLA-DR ( $36.74 \pm 0.98$  vs  $56.05 \pm 3.89$ ) expression were significantly decreased in CHB group (all  $P < 0.01$ ). However, the levels of CD83 ( $27.41 \pm 9.23$  vs  $22.24 \pm 2.14$ ,  $P < 0.05$ ), CD80 ( $32.67 \pm 7.82$  vs  $28.19 \pm 1.64$ ,  $P < 0.05$ ) and HLA-DR ( $40.84 \pm 5.57$  vs  $36.74 \pm 0.98$ ,  $P < 0.01$ ) expression were markedly increased in ETV-treated group as compared with those in CHB group. The capacity to stimulate proliferation of the allogeneic lymphocytes in ETV-treated group was higher than that in CHB group ( $1.53 \pm 0.09$  vs  $1.45 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Entecavir can enhance the biological activity of DC derived from CHB patients and play an indirect antiviral function by regulating the host's immune system.

**Key Words:** Chronic hepatitis B; Dendritic cell; Entecavir; Cell phenotype; Mixed lymphocytic reaction

Lu GF, Tang FA, Zheng PY, Ma J, Bai JX. *In vitro* effect of entecavir on the function of dendritic cells derived from chronic hepatitis B patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1292-1296

## **摘要**

**目的:** 研究恩替卡韦(ETV)对慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血树突状细胞(dendritic cell, DC)功能的影响。

**方法:** 体外常规分离CHB患者及健康人外周血单个核细胞, 诱导扩增后常规培养。第4天将其与一定浓度的恩替卡韦共培养, 第8天收获DC进行细胞表型、同种异体混合淋巴细胞反应等相关检测。

**结果:** 细胞培养8 d时DC形态分化健康对照组优于CHB ETV处理组, CHB ETV处理组优于CHB组; CHB组CD1a ( $35.73 \pm 3.12$  vs  $62.31 \pm 5.22$ ,  $P < 0.01$ ), CD80( $28.19 \pm 1.64$  vs  $45.38 \pm 3.10$ ,  $P < 0.01$ ), CD83 ( $22.24 \pm 2.14$  vs  $40.63 \pm 7.21$ ,  $P < 0.01$ )及HLA-DR ( $36.74 \pm 0.98$  vs  $56.05 \pm 3.89$ ,  $P < 0.01$ )表达明显低于健康对照组, 而

ETV处理组与CHB组相比CD83 ( $27.41 \pm 9.23$  vs  $22.24 \pm 2.14$ ,  $P < 0.05$ ), CD80 ( $32.67 \pm 7.82$  vs  $28.19 \pm 1.64$ ,  $P < 0.05$ )及HLA-DR ( $40.84 \pm 5.57$  vs  $36.74 \pm 0.98$ ,  $P < 0.01$ )显著高表达; 淋巴细胞增殖能力测定ETV处理组DC刺激同种异体T淋巴细胞增殖能力较CHB组增强( $1.53 \pm 0.09$  vs  $1.45 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 恩替卡韦作为治疗CHB的新一代核苷类药物, 除了直接抑制乙肝病毒DNA合成外, 也能够增强CHB患者外周血DC的功能, 通过调节机体的免疫系统发挥间接抗病毒作用.

**关键词:** 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 恩替卡韦; 细胞表型; 混合淋巴细胞反应

卢高峰, 唐芙蓉, 郑鹏远, 马军, 白经修. 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1292-1296  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1292.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内抗原递呈能力最强的细胞, 也是唯一能激活初始T淋巴细胞的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC), 在抗病毒的细胞免疫中起重要作用<sup>[1]</sup>. 慢性乙肝(chronic hepatitis B, CHB)形成的重要原因之一是患者自身DC功能低下<sup>[2-3]</sup>; 恩替卡韦(entecavir, ETV)为一新型口服核苷类药物, 在细胞内经磷酸化后, 与脱氧胞嘧啶核苷(dCTP)竞争进入病毒合成中的DNA链, 终止病毒DNA的复制<sup>[4]</sup>. 本研究通过检测ETV对CHB患者外周血DC功能的影响, 进一步探讨ETV治疗CHB的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 按"慢性乙型肝炎防治指南"<sup>[5]</sup>为标准, 选择郑州大学第二附属医院消化科门诊和住院患者25例, 年龄18-42(中位29)岁, 男23例, 女2例. 血清学检查乙肝标记皆为HBsAg, HBeAg, HBcAb三项阳性, HBV-DNA  $> 10^8$  copies/L(PCR方法), ALT 1550-7001 nkat/L. 所有患者在实验抽血前3 mo内未接受干扰素、胸腺肽、拉米夫定等抗病毒或免疫调节药物治疗, 未应用过糖皮质激素等免疫抑制剂, 排除合并HCV, HIV等病毒感染, 排除自身免疫相关的其他疾病. 10名健康志愿者作为健康对照, 年龄中位数26岁. RPMI1640培养基为美国Gibco BRL公司产品; 淋巴细胞分离液为天津市津脉基因测绘技术

有限公司产品; 重组人白细胞介素4(rhIL-4)、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、荧光标记鼠抗人HLA-DR-FITC, CD80-PE, CD83-PE, CD1a-PE mAb, 对照抗体IgG-FITC, IgG-PE为美国R&D公司产品; 胎牛血清(FCS)为杭州四季青公司产品; ETV(商品名: 博路定)由中美上海施贵宝制药有限公司提供, 完全培养基成分含: 100 mL/L FBS的RPMI1640培养基, 加入细胞因子rhGM-CSF和rhIL-4, 终浓度均为10  $\mu$ g/L.

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集与DC培养** 参考相关文献<sup>[6-7]</sup>分别采集CHB患者和健康志愿者抗凝外周静脉血20 mL, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC), 生理盐水洗涤( $1000 \text{ r/min} \times 10 \text{ min}$ ), 共2次; 以无血清RPMI1640培养基悬浮沉淀细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^9/\text{L}$ - $2 \times 10^9/\text{L}$ ; 按每孔1 mL加入24孔细胞培养板中,  $37^\circ\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 培养箱中温育3 h后, 以 $37^\circ\text{C}$ 预热的RPMI1640培养基轻轻洗去悬浮细胞, 所得贴壁细胞大部分即为单核细胞. 每孔加入2 mL完全培养基, 置于 $37^\circ\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养, 隔天半量换液, 培养第4天, 按以下分组: (1)健康人对照; (2)CHB阴性对照; (3)CHB患者DC+ETV(0.05 mg/L). 继续培养.

**1.2.2 DC形态观察及表型检测** 通过倒置显微镜进行细胞形态学观察; 第8天收集细胞(以下简称DC8). 用流式细胞仪进行细胞表型分析.

**1.2.3 同种异体混合淋巴细胞反应** 取健康人外周血, 如前法获得单个核细胞后置入24孔细胞培养板,  $37^\circ\text{C}$ 培养2 h, 取非贴壁细胞即为淋巴细胞作为反应细胞; 上述收获的部分DC8用丝裂霉素C(50 mg/L)孵育30 min后, 分别以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 加入96孔平底培养板, 每组各3个复孔, 每组再加入同种T淋巴细胞 $2 \times 10^5$ , 终体积为200  $\mu\text{L}$ , 培养72 h, 于培养结束前4 h每孔加入MTT 20  $\mu\text{L}$ , 终止培养, 离心弃去孔内培养液, 每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解. 自动酶联检测仪检测570 nm波长的A值, 结果用3孔均值表示. 设单独DC, T细胞和培养基空白对照孔. 并计算刺激指数(SI)表示增殖情况.  $\text{SI} = \text{实验组A值} / (\text{反应细胞对照组A值} + \text{刺激细胞对照组A值})$ .

**统计学处理** 数据采用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用SPSS10.0统计软件包进行方差检验处理分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验. 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准.

### ■同行评价

本文进行了恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能影响的体外研究, 文章立意具有一定的新颖性, 实验设计比较合理, 采用方法较为成熟, 有一定的临床指导意义.

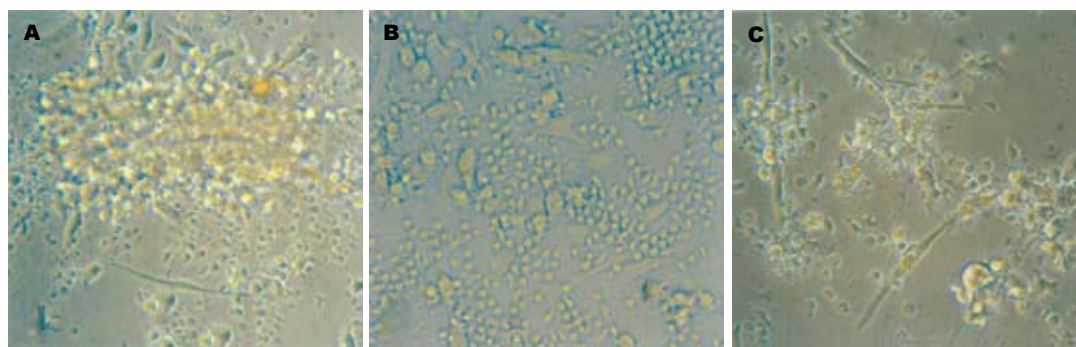


图1 体外培养第8天树突状细胞形态( $\times 400$ ). A: 健康对照组; B: CHB对照组; C: ETV处理组.

表1 培养第8天各组树突状细胞表型分子的表达(mean  $\pm$  SD, %)

分组	CD1a	CD83	CD80	HLA-DR
健康对照	62.31 $\pm$ 5.22	40.63 $\pm$ 7.21	45.38 $\pm$ 3.10	56.05 $\pm$ 3.89
CHB对照	35.73 $\pm$ 3.12 <sup>b</sup>	22.24 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>	28.19 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>	36.74 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>
ETV处理	38.34 $\pm$ 6.22 <sup>b</sup>	27.41 $\pm$ 9.23 <sup>bc</sup>	32.67 $\pm$ 7.82 <sup>bc</sup>	40.84 $\pm$ 5.57 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 健康对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs CHB对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs CHB对照组.

## 2 结果

**2.1 DC形态观察** 倒置显微镜下, 培养24 h后可见细胞呈集落生长, 3 d后细胞数目明显增多, 体积开始逐渐增大, 胞体拉长; 8 d时健康对照组可见培养液中漂浮着颜色较深、云雾状的细胞团; ETV处理组细胞多方向长突起, 呈不规则状; CHB阴性对照组变形细胞较少(图1).

**2.2 DC表型检测** 收集培养第8天DC, 用FITC标记的鼠抗人HLA-DR, CD80和用PE标记的CD83和CD1a抗体, 用流式细胞仪分析显示, DC表型分子CD1a, CD83, CD80和HLA-DR的表达水平, 健康对照组最高, CHB阴性对照组最低, 三组间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与CHB阴性对照组相比ETV处理组DC高表达CD83, CD80和HLA-DR(表1).

**2.3 淋巴细胞增殖能力测定** 淋巴细胞增殖能力的高低反映了DC的功能状态. 健康对照组DC刺激同种异体T淋巴细胞增殖能力最强( $1.79 \pm 0.10$ ), ETV组其次( $1.53 \pm 0.09$ ), CHB对照组最弱( $1.45 \pm 0.12$ ), 三组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 两两比较组间差异也具有统计学意义( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

乙型病毒性肝炎慢性化的重要机制之一是免疫耐受, 感染乙肝病毒后首先启动一系列非特异

性早期应答, 包括干扰素, NK细胞及枯否氏细胞的活化; 彻底清除病毒则有赖于HBV特异性T细胞<sup>[8]</sup>. 体内CTL的激活需要未致敏的T淋巴细胞同时接受两个信号, 一个信号是外源性抗原肽经APC加工处理后与MHC I类分子结合并递呈在APC表面, 被T淋巴细胞的T细胞受体所识别; 另一个信号是APC表面表达的协同刺激分子, 即B7分子(如CD80), 被T淋巴细胞的CD28分子所识别. 只有T淋巴细胞同时接受APC所提供的这样两个信号时, 才能被激活<sup>[9]</sup>. 正常情况下HBV分泌的各种抗原可刺激机体产生多克隆的、HBV抗原特异性的CTL应答, 杀伤携带HBV的靶细胞. 慢性肝炎患者体内树突状细胞抗原递呈功能缺陷, 不能把病毒抗原的信号传递给机体的免疫系统, 患者仅产生弱的或检测不到的针对HBV特异的CTL反应, 所以不能清除体内的病毒, 造成感染的慢性化, 诱导机体内HBV抗原特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞大幅度下降, 导致机体内抗原特异性T细胞免疫耐受, 造成CHB的发生<sup>[10]</sup>. 因此, 如果能增强APC的功能, 则可能有助于慢性乙型肝炎的治疗, 我们应用树突状细胞免疫治疗CHB已取得初步成效<sup>[11-12]</sup>.

机体内的APC, 尤其是DC是特异性免疫应答的关键细胞, 启动和介导特异性T细胞免疫应答<sup>[13-14]</sup>. DC广泛分布于血液、肝、脾、淋巴结以及其他非免疫组织器官中, 数量极微, 仅占所

在器官全部细胞的1%以下, 但却是机体内最重要的、功能最强的抗原递呈细胞, 能诱导免疫应答的产生, 同时在诱导免疫耐受和参与免疫应答的调节中也起着重要作用<sup>[15-16]</sup>。一般来讲, 外周血来源的DC前体细胞在GM-CSF/IL-4的刺激下培养3-5 d后主要分化为未成熟DC, 摄取、加工抗原或接受某些刺激因素后随之分化为成熟DC<sup>[17]</sup>。后者加工、处理抗原能力弱, 递呈抗原能力强<sup>[18]</sup>。DC摄取抗原并将其处理成具有免疫原性的多肽, 通过交叉递呈, 与MHC I类分子结合后, 以MHC-抗原肽复合物的形式表达于细胞膜表面, 其膜表面的协同刺激分子与T细胞表面相应配体结合, 激活CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞, 进而激活CTL, 产生免疫应答<sup>[19-20]</sup>。若DC膜表面协同刺激分子表达缺陷, 则影响其与T细胞表面相应配体结合, 从而影响机体产生正常免疫应答; 本实验结果表明, CHB患者DC表面低表达CD80、CD83和HLA-DR等共刺激分子, 从免疫应答方面阐明了乙肝病毒感染慢性化的部分机制。

核苷(酸)类似物是目前公认的治疗CHB的药物之一, 能够在细胞内经磷酸化后, 与脱氧胞嘧啶核苷(dCTP)竞争进入病毒合成中的DNA链, 终止病毒DNA的复制, 拉米夫定是该类药物的代表, 张冬云 *et al*<sup>[21]</sup>曾通过实验发现拉米夫定具有促进CHB患者外周血DC分化成熟的功能; 恩替卡韦作为治疗CHB的新一代核苷类药物, 能够较快抑制乙肝病毒的复制, 降低患者外周血中HBV DNA载量<sup>[22]</sup>, 但其对于慢性乙肝患者机体免疫功能的影响尚不太清楚。我们通过研究CHB患者的外周血DC发现ETV与DC共孵育后提高了DC表面CD80、CD83、HLA-DR的表达, 在本实验中, 为避免促成熟细胞因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等对DC的成熟的影响, 我们未加任何此类因子; DC表型分子表达上调可能与T淋巴细胞形成共刺激通路而传递抗原信息, 继而激活体内HBV特异性免疫反应; 而与适当浓度恩替卡韦共孵育的DC刺激淋巴细胞增殖能力增强, 也可部分证明这一点, 这初步提示ETV除了直接抑制乙肝病毒DNA合成外, 也能够通过调节机体的免疫系统发挥间接抗病毒作用。为开展DC免疫治疗和临床应用ETV治疗CHB提供了更多理论依据。

#### 4 参考文献

- 1 Akbar SM, Inaba K, Onji M. Upregulation of MHC class II antigen on dendritic cells from hepatitis

- B virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a T-cell-dependent antigen. *Immunology* 1996; 87: 519-527
- 2 Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-4649
- 3 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 4 Sims KA, Woodland AM. Entecavir: a new nucleoside analog for the treatment of chronic hepatitis B infection. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1745-1757
- 5 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 6 Duperrier K, Eljaafari A, Dezutter-Dambuyant C, Bardin C, Jacquet C, Yoneda K, Schmitt D, Gebuhrer L, Rigal D. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J Immunol Methods* 2000; 238: 119-131
- 7 Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 1999; 94: 845-852
- 8 Furukawa S, Akbar SM, Hasebe A, Horiike N, Onji M. Production of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells from immunosuppressed murine hepatitis B virus carrier: evaluation of immunogenicity of antigen-pulsed dendritic cells in vivo. *Immunobiology* 2004; 209: 551-557
- 9 任淑萍, 包木胜, 高新, 于永利, 王丽颖. HSP65-MUC1/HSP65抗体免疫复合物对人树突状细胞的活化作用. 吉林大学学报 2005; 31: 182-185
- 10 Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42
- 11 郑鹏远, 白蓉, 娄海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚新, 徐建强. HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1735-1738
- 12 郑鹏远, 娄海山, 王永红, 唐芙爱, 白蓉, 司方明, 白经修, 琚新. 特异性免疫治疗母婴传播所致慢性乙型肝炎23例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1824-1827
- 13 Chinen J, Shearer WT. Basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 411-418
- 14 Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 2002; 36: 734-741
- 15 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811
- 16 Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dhodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 15-25



- 17 De Vleeschouwer S, Arredouani M, Ade M, Cadot P, Vermassen E, Ceuppens JL, Van Gool SW. Uptake and presentation of malignant glioma tumor cell lysates by monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 372-382
- 18 Rouard H, Leon A, Klonjowski B, Marquet J, Tenneze L, Plonquet A, Agrawal SG, Abastado JP, Eloit M, Farcet JP, Delfau-Larue MH. Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* 2000; 241: 69-81
- 19 Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005; 434: 83-88
- 20 Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 2004; 288: 123-134
- 21 张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 姜惠萍, 唐芙蓉, 白经修, 祁元明. 拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1693-1698
- 22 Robinson DM, Scott LJ, Plosker GL. Entecavir: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 2006; 66: 1605-1622; discussion 1623-1624

电编 何基才 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 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、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、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》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工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

## 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进39例

李璐, 曾争, 尹彪, 蔺小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元

李璐, 曾争, 尹彪, 蔺小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271182  
国家“十五”攻关课题 No. 2001BA705B06  
通讯作者: 徐小元, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院感染疾病科, yangpin@public3.bta.net.cn  
电话: 010-66551122-2370  
收稿日期: 2007-01-30 接受日期: 2007-03-06

### Partial splenic embolization for liver cirrhosis accompanied by hypersplenism: an analysis of 39 cases

Lu Li, Zheng Zeng, Biao Yin, Xiao-Hong Lin, Hua Wan, Na Huo, Jing-Hang Xu, Xiao-Yuan Xu

Lu Li, Zheng Zeng, Biao Yin, Xiao-Hong Lin, Hua Wan, Na Huo, Jing-Hang Xu, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271182 and the National Key Foundation during the Tenth Five-Year Plan Period, No. 2001BA705B06

Correspondence to: Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Peking University, 77 Xishiku Street, Beijing 100034, China. yangpin@public3.bta.net.cn

Received: 2007-01-30 Accepted: 2007-03-06

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of partial splenic embolization (PSE) in the treatment of patients with liver cirrhosis accompanied by hypersplenism and investigate the complications associated with PSE.

**METHODS:** Thirty-seven cases of liver cirrhosis accompanied by hypersplenism who had received PSE (totally 39 times) were analyzed retrospectively. The observation time was from 0.1 to 60 months. The observation indexes included leukocyte count, hemoglobin, platelet count and side effects.

**RESULTS:** After PSE, leukocyte and platelet counts were higher than those before PSE ( $P < 0.05$ ). No significant changes occurred in hemoglobin after PSE (except 15 months). Larger-area embolization produced a better efficacy

than smaller-area one in short term, but not in long term. The side effects that happened most frequently were abdominal pain (94.9%) and fever (100%), and other ones included electrolyte disorder (12.8%), pleura effusion (30.8%) and peritonitis (30.8%). Severe side effects were fulminant hepatitis (7.7%) and splenic abscess (5.1%). The incidence rate of fulminant hepatitis was higher in patients with Child C stage than that in A and B stage (40% vs 2.9%,  $P < 0.05$ ), and other side effects had no significant correlations with Child-Pugh classification and embolized area ( $P > 0.05$ ). The common side effects were more severe in patients with gigantic spleen.

**CONCLUSION:** PSE is an effective method in the treatment of hypersplenism and the embolized area should be determined according to the liver function of patients.

**Key Words:** Hypersplenism; Splenic embolization; Embolization area; Efficacy; Complication

Li L, Zeng Z, Yin B, Lin XH, Wan H, Huo N, Xu JH, Xu XY. Partial splenic embolization for liver cirrhosis accompanied by hypersplenism: an analysis of 39 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1297-1301

### 摘要

**目的:** 评价部分性脾动脉栓塞术(PSE)治疗肝硬化脾功能亢进的疗效及其并发症。

**方法:** 回顾性研究采用PSE治疗的37例患者(共治疗39次), 观察时间为0.1-60 mo. 观察指标主要为外周血WBC, Hb, PLT计数以及术后各种不良反应。

**结果:** 白细胞及血小板计数术后各个时期均高于术前水平( $P < 0.05$ )。血色素值(除术后15 mo外)无明显变化。栓塞面积较大者近期疗效好于栓塞面积小者, 远期疗效大致相同。常见的不良反应有腹痛(94.9%)和发热(100%), 其他还有电解质紊乱(12.8%), 胸腔积液(30.8%), 腹膜炎(30.8%), 严重的不良反应有重症肝炎(7.7%), 脾脓肿(5.1%)。重症肝炎发生率在Child C级组高于Child A, B级组(40% vs 2.9%),

### ■背景资料

自1973年Maddison首先选用自身血凝块经导管血管栓塞脾动脉治疗肝硬化脾功能亢进, 随着介入医学的发展, 部分脾动脉栓塞术(PSE)已广泛运用于治疗门脉高压、Gaucher's病引起的脾亢、重型地中海贫血、原发性血小板减少性紫癜等, 并取得了良好效果。但是也不乏引起严重并发症的报道。

## ■相关报道

脾血回流淤滞和脾动脉血流增加是肝硬化门脉高压时脾大和脾亢发生的主要原因。有研究证实, PSE在纠正血液学指标紊乱的同时也改善了肝脏储备功能, 可减少食管静脉曲张破裂出血的次数。栓塞面积的大小影响近期疗效以及远期复发, 但是也有报道曾有术后发生肝功能衰竭且死于脓毒血症、重症肺炎及脾脓肿的患者。

$P < 0.05$ ), 其余不良反应与Child分级及栓塞面积无相关性( $P > 0.05$ )。巨脾者的常见不良反应表现略重。

**结论:** PSE是治疗脾功能亢进的有效办法, 但应根据患者肝功能的个体差异掌握合适的栓塞面积。

**关键词:** 脾功能亢进; 脾栓塞术; 栓塞面积; 疗效; 并发症

李璐, 曾争, 尹彪, 简小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元. 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进39例. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1297-1301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1297.asp>

## 0 引言

脾功能亢进是肝硬化门脉高压的常见并发症, 易导致感染及出血, 而且影响了抗病毒药物(如干扰素)的应用。内科药物治疗效果甚微, 外科脾切除术虽然能改善外周血细胞与血小板计数, 但可以引起严重并发症, 如重症肺炎、败血症等, 围手术期死亡率也较高, 这些缺点限制了其在临床的应用<sup>[1]</sup>。近年来, 随着介入医学的发展, 部分脾动脉栓塞术(partial splenic embolization, PSE)已广泛运用于治疗门脉高压、Gaucher's病引起的脾亢、重型地中海贫血、原发性血小板减少性紫癜等, 并取得了良好效果。这方面国内外已有不少报道<sup>[2-3]</sup>。我们旨在通过回顾性研究PSE治疗肝硬化脾亢39例, 探讨PSE的有效性和安全性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 患者来自于2001-2006年我科行PSE的肝炎肝硬化患者(表1)。全部病例均经胃镜或B超及血常规化验证实为肝硬化所致脾大, 脾功能亢进。肝功能情况采用Child-Pugh分级评价。

**1.2 方法** 37例均采用Seldinger法经股动脉插管至脾动脉近端达脾门或脾中、下极分支, 造影了解脾血管及血流情况, 将小碎颗粒明胶海绵与造影剂、部分合用庆大霉素8万U充分混合后注入脾动脉及分支, 栓塞后行脾动脉造影, 目测法估计栓塞范围在25%-75%, 拔管后穿刺点加压包扎。术后常规静脉滴注抗生素至少3 d, 根据患者情况可酌情延长。分别于术前及术后2 d, 1, 2, 3 wk, 1, 3, 6, 9, 15 mo, 3, 5 a观察血象变化及肝功能等。观察体温变化、腹痛、胸腔积液、腹膜炎、脾脓肿等不良反应的发生情况。腹痛

表 1 患者情况

特征	数据
总例数	37
脾栓塞次数	39
2次者	2
1次者	35
年龄(岁) $M$ (min, max)	46.84(31, 70)
性别(男/女)	27/10
合并肝癌者	1
观察时间(mo) $M$ (min, max)	2(0.1, 60)
诊断	
乙型肝炎肝硬化	27
丙型肝炎肝硬化	3
酒精性肝硬化	2
乙肝合并丁型肝炎肝硬化	1
乙肝合并酒精性肝硬化	2
隐源性肝硬化	2
Child-Pugh A/B/C	16/18/5
栓塞面积(%) $M$ (min, max)	40(25, 75)
<50%者/≥50%者	26/13

情况分为0级: 无痛; 1级(轻度疼痛): 虽有疼痛但可忍受, 并能正常生活, 睡眠不受干扰; 2级(中度疼痛): 疼痛明显不能忍受, 要求服用止痛药物, 睡眠受干扰; 3级(重度疼痛): 疼痛剧烈不能忍受, 需要镇痛药物, 睡眠严重受到干扰, 可伴有植物神经功能紊乱或被动体位。

**统计学处理** 采用SPSS12.0统计软件处理。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。观察5 a者仅1例, 未纳入统计。对病例采用自身前后对照。术后各个时期与术前外周血象比较采用Wilcoxon配对秩和检验。并用箱图显示动态变化。栓塞面积与术后各个时期WBC, Hb, PLT的变化值的关系采用Spearman等级相关分析。不同组栓塞面积(按<50%和≥50%分为两组)术后并发症(包括电解质紊乱、产生胸腔积液、腹膜炎、重症肝炎、脾脓肿等)的发生率的比较采用 $\chi^2$ 检验及Fisher检验。栓塞面积与其他并发症(包括发热持续时间、疼痛程度)的关系采用Spearman等级相关分析。不同Child分级组(分为A, B级与C级两组)术后并发症(包括电解质紊乱、产生胸腔积液、腹膜炎、重症肝炎、脾脓肿等)的发生率的比较采用 $\chi^2$ 检验及Fisher检验。Child分级与其他并发症(包括发热持续时间、疼痛程度)的关系采用Spearman相关分析。

## 2 结果

## 2.1 PSE前后外周血细胞变化的长期观察结果

表 2 术后不同时期外周血WBC( $\times 10^9/L$ )与术前比较的Wilcoxon秩和检验结果

时期	<i>n</i>	M	Z值	P值
术前	39	2.29		
术后2 d	29	7.20	-4.638	<0.001
术后1 wk	34	6.045	-4.924	<0.001
术后2 wk	29	4.800	-4.217	<0.001
术后3 wk	22	4.450	-3.458	0.001
术后1 mo	21	4.270	-3.528	<0.001
术后3 mo	12	3.470	-1.156	0.248
术后6 mo	7	3.800	-2.366	0.018
术后9 mo	6	4.380	-2.201	0.028
术后15 mo	6	3.460	-2.201	0.028
术后3 a	6	4.045	-1.992	0.046

表 3 术后不同时期外周血Hb(g/L)与术前比较的Wilcoxon秩和检验结果

时期	<i>n</i>	M	Z值	P值
术前	39	99.0		
术后2 d	29	104.0	-2.090	0.037
术后1 wk	34	110.5	-1.287	0.198
术后2 wk	29	102.0	-0.887	0.375
术后3 wk	22	99.0	-0.761	0.447
术后1 mo	21	103.0	-0.296	0.768
术后3 mo	12	105.5	-1.159	0.247
术后6 mo	7	107.0	-0.314	0.753
术后9 mo	6	121.5	-0.944	0.345
术后15 mo	6	126.0	-1.992	0.046
术后3 a	6	109.0	-0.943	0.345

依次记录患者PSE前后外周血WBC, 并对其进行比较. 术后各个时期的WBC值与术前相比,  $P<0.05$ , 提示差异有统计学意义. 结合平均数, 可以认为术后各个时期的WBC值均高于术前水平. 从图1可以看出, 术后2 d左右WBC即明显升高, 术后2 wk后趋于稳定(表2). 依次记录患者PSE前后外周血Hb, 并对其进行比较. 术后2 d和15 mo外周血Hb与术前相比 $P<0.05$ , 提示差异有统计学意义. 可以认为术后2 d和15 mo外周血Hb高于术前水平. 其他术后各期Hb与术前相比 $P>0.05$ , 差异无统计学意义. 尚不能认为术后其他各期Hb与术前相比有差异(表3). 依次记录患者PSE前后外周血PLT, 并对其进行比较. 除术后15 mo的PLT值与术前相比 $P>0.05$ 外, 其余各个时期PLT与术前相比 $P<0.05$ , 差异有统计学意义. 结合平均数, 可以认为除术后15 mo外, 其余各期PLT均高于术前水平. 从图2可以看出, PLT在

表 4 术后不同时期PLT( $\times 10^9/L$ )与术前比较的Wilcoxon秩和检验结果

时期	病例数( <i>n</i> )	M	Z值	P值
术前	39	41.0		
术后2 d	29	48.0	-2.855	0.004
术后1 wk	34	75.0	-4.659	<0.001
术后2 wk	29	99.0	-4.595	<0.001
术后3 wk	22	76.0	-4.198	<0.001
术后1 mo	21	86.0	-3.946	<0.001
术后3 mo	12	63.0	-2.550	0.011
术后6 mo	7	88.0	-2.207	0.027
术后9 mo	6	79.5	-2.201	0.028
术后15 mo	6	82.0	-1.153	0.249
术后3 a	6	70.0	-2.201	0.028

表 5 栓塞面积与术后各个时期WBC和PLT变化值的Spearman相关分析

	术后 2 d	术后 1 wk	术后 2 wk	术后 1 mo	术后 15 mo	术后 3 a
WBC						
相关系数 $r$	0.584	0.571	0.543	-0.109	-0.309	-0.309
P值	0.001	<0.001	0.002	0.934	0.552	0.552
PLT						
相关系数 $r$	0.488	0.356	0.329	-	0.772	0.370
P值	0.007	0.039	0.081	-	0.072	0.470

术后2 d左右即开始升高, 2 wk达到高峰, 此后逐渐回落(表4).

2.2 栓塞面积对疗效的影响 我们对栓塞面积和术后各个时期WBC和PLT较术前的变化值进行Spearman相关分析(表5). 可以看出, 栓塞面积与术后早期WBC和PLT的升高值存在相关关系, 与长期WBC和PLT升高关系不大.

2.3 PSE术后并发症以及与Child分级和栓塞面积的关系 严重并发症难治性腹水发生2例, 1例为Child B级, 栓塞面积为45%, 另1例为Child C级, 栓塞面积为30%. 发生重症肝炎3例, 两例为Child C级, 栓塞面积分别为60%及40%, 且分别于术后2 wk和2 mo后死亡, 1例虽为Child B级, 但评分较高(11分), 栓塞面积为35%. 脾脓肿发生2例, 1例为Child A级, 栓塞面积为40%, 1例为Child B级, 栓塞面积为40%. 其他并发症的发生情况见表6. 电解质紊乱多表现为低钾或高钾血症, 低钠低氯血症. 未发现胰腺受损及门静脉血栓形成.

Child A, B级胸腔积液的发生率为29.4%,

#### ■创新盘点

本研究显示, 栓塞面积大者近期疗效好于栓塞面积小者, 但远期疗效大致相当, 与其他研究不甚一致. 此外, 重型肝炎发生率与术前Child分级有关, 而与栓塞面积无关, 其他并发症与术前Child分级以及栓塞面积无相关性, 个案分析中发现巨脾者不良反应较多, 但未出现严重致死性的并发症.



### ■同行评价

本文研究方法可靠, 结果可信, 结论对临床具有一定的参考价值, 具有一定的学术水平.

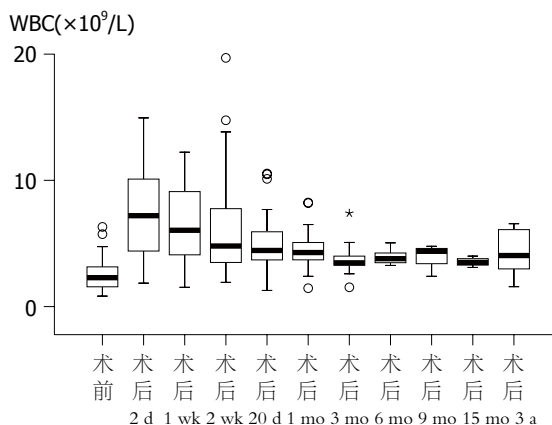


图 1 PSE前后外周血WBC的箱图.

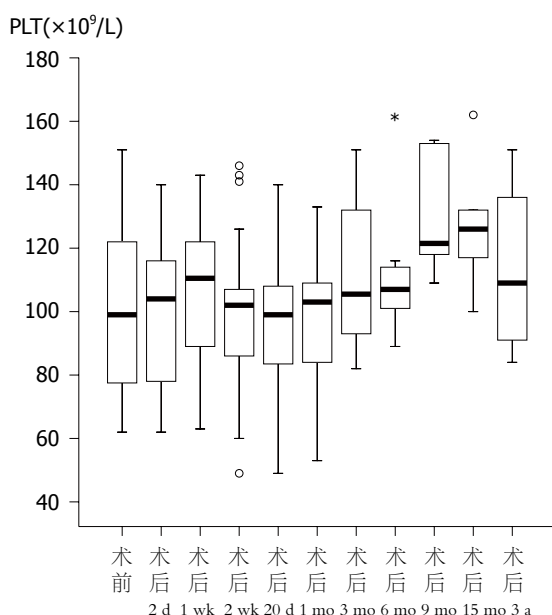


图 2 PSE前后外周PLT的箱图.

Child C级为40%, 使用Fisher检验,  $P = 0.634$ . Child A, B级电解质紊乱的发生率为11.8%, Child C级为20%, 使用Fisher检验,  $P = 0.517$ . Child A, B级腹腔感染的发生率为29.4%, Child C级为40%, 使用Fisher检验,  $P = 0.634$ . Child A, B级重症肝炎发生率为2.9%, Child C级为40%, 使用Fisher检验,  $P = 0.038$ . Child A, B级脾脓肿发生率为5.9%, Child C级为0%, 使用Fisher检验,  $P = 1.000$ . 可以看出, C级患者重型肝炎发生率高于B, C级者, Child分级与重型肝炎的发生率有关. Child分级与其他并发症的发生关系不大.

栓塞面积与术后发热持续时间的Spearman相关系数 $r = 0.059$ ,  $P = 0.723$ . 与疼痛程度的Spearman相关系数 $r = 0.186$ ,  $P = 0.257$ . 均无统计学意义. 尚不能认为栓塞面积等级与上述并发症等级有相关关系. 栓塞面积<50%组胸腔积液

表 6 PSE术后1 mo内并发症( $n = 39$ )

并发症	发生人数 $n(\%)$
胸腔积液	12(30.8)
双侧	8(20.5)
单侧	4(10.3)
一过性腹水增多	13(33.3)
胆红素一过性增高	18(46.2)
胆红素持续升高	3(7.7)
腹腔感染	12(30.8)
长期发热 <sup>1</sup>	9(23.1)
疼痛	37(94.9)
1级/2级/3级	17/11/9
电解质紊乱	5(12.8)
肾功能受损	2(5.1)

<sup>1</sup>发热时间超过2 wk.

的发生率为34.6%,  $\geq 50\%$ 组为23.1%, 使用Fisher检验,  $P = 0.741$ . 栓塞面积<50%组电解质紊乱的发生率为7.7%,  $\geq 50\%$ 组为23.1%, 使用Fisher检验,  $P = 0.310$ . 栓塞面积<50%组腹腔感染的发生率为26.9%,  $\geq 50\%$ 组为41.7%, 使用Fisher检验,  $P = 0.486$ . 栓塞面积<50%组重症肝炎的发生率为7.5%,  $\geq 50\%$ 组为8.3%, 使用Fisher检验,  $P = 1.000$ . 栓塞面积<50%组脾脓肿发生率为8.3%,  $\geq 50\%$ 组为0%, 使用Fisher检验,  $P = 0.544$ . 说明栓塞面积 $\geq 50\%$ 组与<50%组相比上述并发症的发生率差别无统计学意义.

### 3 讨论

脾血回流淤滞和脾动脉血流增加是肝硬化门脉高压时脾大和脾亢发生的主要原因<sup>[4]</sup>. 1973年Maddison首先选用自身血凝块经导管血管栓塞脾动脉治疗肝硬化脾功能亢进. 通过阻断部分脾动脉血流, 减少脾内血流量, 使脾实质发生梗死, 减少血细胞的破坏场所是其主要的治疗机制. 此外Noguchi *et al*<sup>[5]</sup>报道, PSE术后血小板升高还与免疫机制有关. 还有研究证实, PSE在纠正血液学指标紊乱的同时也改善了肝脏储备功能<sup>[6]</sup>. Palsson *et al*<sup>[7]</sup>报道, PSE可减少食管静脉曲张破裂出血的次数( $n = 25$ ,  $4.3 \pm 2.9$  vs  $1.1 \pm 1.3$ ,  $P < 0.001$ ).

我们的研究显示, 术后各期的WBC值较术前相比均有升高. Hb值在术后2 d和15 mo时高于术前水平, 其余术后早期及术后3 a与术前相比均无明显升高. PLT值除术后15 mo的各期均高于术前水平. 与其他研究结果大致相同. 提示



PSE是一种解决脾亢的有效方法。

肝硬化门脉高压的持续存在和发展是术后脾脏增生,引起脾亢复发的主要原因。文献报道,栓塞面积的大小对近期疗效以及远期复发的控制发挥着重要作用。Palsson *et al*<sup>[7]</sup>对26例行PSE的患者进行研究发现,栓塞面积与PLT的升高值存在相关性( $r = 0.53, P = 0.003$ )。Sangro *et al*<sup>[8]</sup>对27例PSE患者进行随访(平均 $13.9 \pm 2.2$  mo),发现7例患者出现复发(他们将 $WBC < 3.5 \times 10^9/L$ 或者 $PLT < 100 \times 10^9/L$ 定义为复发)。平均复发时间为 $5.1 \pm 1.1$  mo,复发的7例患者栓塞面积均在50%或以下。差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。复发组与未复发组年龄、性别组成、术前脾脏大小、食管静脉曲张程度、腹水程度、血细胞计数具有可比性。复发者术后7 d的PLT值明显低于未复发者 $[(140.174 \pm 11.515) \times 10^9/L \text{ vs } (198.000 \pm 21.863) \times 10^9/L, P < 0.01]$ 。提示术后7 d的PLT值可大致推断治疗效果。

我们的研究发现,栓塞面积等级与术后2 d,术后1 wk,术后2 wk的WBC变化值及术后2 d,术后1 wk的PLT变化值有相关关系。提示栓塞面积大者近期疗效好于栓塞面积小者,但远期疗效大致相当,与其他研究不甚一致。我们考虑这可能与观察时间长的病例数少有关,而且栓塞前的脾脏体积不一,仅用百分数来代表栓塞面积大小以及栓塞面积通过目测法来估计也可能引起偏倚。

栓塞后综合征包括腹痛、发热、呕吐等是PSE常见的并发症,患者大多数可以耐受,或通过使用止痛剂、退热剂等缓解症状。但是也可见一些严重的并发症。Vujic和Lauver报道3例PSE术后发生肝功能衰竭且死于脓毒血症、重症肺炎及脾脓肿的患者<sup>[9]</sup>。Sakai *et al*<sup>[10]</sup>随访17例PSE患者,其中2例出现脾脓肿,且伴有菌血症和细菌性腹膜炎。1例进展为肝功能衰竭及多器官功能障碍,术后2 mo死亡。1例经过B超引导下脾脓肿引流后逐渐好转。此两例均为Child B级。

我们的研究发现,PSE术后出现表5所列的并发症。3例胆红素持续升高者最终出现了肝功能衰竭,术后重症肝炎者3例均发生于肝功能为Child C级以及Child B级评分较高者。术后难治性腹水2例发生于肝功能为B级与C级者。但是2例脾脓肿,其中1例发生于A级,另1例发生于B级。似不好解释,可能与个体差异有一定关系。在所有病例中,有2例患者为巨脾,达到平脐水平。2例肝功能均为Child B级,其中1例栓塞面积

为35%,另1例为50%。2例术后不良反应略重,均出现双侧胸腔积液和电解质紊乱,发热时间超过2 wk,疼痛程度均在2级以上。出现胸腔积液者以双侧为多,与文献报道不一致。一过性腹水增多可能与术后补液增多有关。术后一过性胆红素增高经过治疗后均回复至术前水平。对并发症与Child分级以及栓塞面积的关系我们做了Spearman相关分析以及 $\chi^2$ 检验,发现并发症中重型肝炎发生率与Child分级有关,而与栓塞面积无关。其他并发症与Child分级以及栓塞面积无相关性。

基于以上结果,我们认为对肝硬化脾亢的患者,不应盲目的追求栓塞效果而提高栓塞面积,而应根据患者的肝功能个体差异掌握合适的栓塞范围。对于巨脾的患者,建议分次栓塞,每次栓塞应少于35%。术前准备及术中无菌操作也很重要。对于Child C级患者,最好先给予充分的支持治疗,使肝功能改善至Child B或者评分下降后再行PSE。对Child B级患者也应慎重。

#### 4 参考文献

- 1 Cullingford GL, Watkins DN, Watts AD, Mallon DF. Severe late postsplenectomy infection. *Br J Surg* 1991; 78: 716-721
- 2 朱康顺,单鸿,李征然,沈新颖,孟晓春,关守海,姜在波,黄明声.部分性脾栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进的远期疗效观察. *中华放射学杂志* 2004; 38: 732-736
- 3 王文明,王保华,盛玉国,李乃选,荆秀荣,段新武,许春华.部分脾脏栓塞术治疗肝硬化门脉高压合并脾机能亢进的临床研究. *医学影像学杂志* 2004; 14: 458-460
- 4 黄廷庭.门静脉高压症外科学.北京:人民卫生出版社,2002: 225-226
- 5 Noguchi H, Hirai K, Aoki Y, Sakata K, Tanikawa K. Changes in platelet kinetics after a partial splenic arterial embolization in cirrhotic patients with hypersplenism. *Hepatology* 1995; 22: 1682-1688
- 6 Murata K, Shiraki K, Takase K, Nakano T, Tameda Y. Long term follow-up for patients with liver cirrhosis after partial splenic embolization. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1212-1217
- 7 Palsson B, Hallen M, Forsberg AM, Alwmark A. Partial splenic embolization: long-term outcome. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 387: 421-426
- 8 Sangro B, Bilbao I, Herrero I, Corella C, Longo J, Belouqui O, Ruiz J, Zozaya JM, Quiroga J, Prieto J. Partial splenic embolization for the treatment of hypersplenism in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 309-314
- 9 Witte CL, Ovitt TW, Van Wyck DB, Witte MH, O'Mara RE, Woolfenden JM. Ischemic therapy in thrombocytopenia from hypersplenism. *Arch Surg* 1976; 111: 1115-1121
- 10 Sakai T, Shiraki K, Inoue H, Sugimoto K, Ohmori S, Murata K, Takase K, Nakano T. Complications of partial splenic embolization in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 388-391

电编 张敏 编辑 张焕兰

## 抑癌基因WWOX在肝外胆管癌中的表达

顾军, 王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕

### ■背景资料

WWOX是位于染色体脆性位点,与多种蛋白相互作用,调节凋亡,在多种肿瘤中表达减低或缺失,表达恢复后可以抑制肿瘤生长,促进细胞凋亡,与多种肿瘤特别是激素相关肿瘤及消化道肿瘤的预后相关。胆管癌预后恶劣,早期发现困难,治疗效果差,对其分子发病机制的研究可以加深对胆管癌的了解。

顾军, 中国人民解放军第123医院肿瘤科 安徽省蚌埠市 233015  
王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕, 第二军医大学附属长海医院肿瘤科 上海市 200433

上海市科委自然科学基金资助项目, No. 04ZR14003

通讯作者: 王雅杰, 200433, 上海市第二军医大学附属长海医院肿瘤科, yajiewa@yahoo.com

电话: 0552-4973709 传真: 0552-4973709

收稿日期: 2006-10-17 接受日期: 2007-02-08

### Expression of WW domain-containing oxidoreductase gene in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma

Jun Gu, Mei Wang, Ya-Jie Wang, Yong-Mei Li, Yang Yuan, Chun-Yan Xue

Jun Gu, Department of Oncology, the 123<sup>rd</sup> Hospital of Chinese PLA, Bengbu 233015, Anhui Province, China  
Mei Wang, Ya-Jie Wang, Yong-Mei Li, Yang Yuan, Chun-Yan Xue, Department of Oncology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Supported by the Natural Science Research Programs of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, No. 04ZR14003

Correspondence to: Ya-Jie Wang, Department of Oncology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. yajiewa@yahoo.com

Received: 2006-10-17 Accepted: 2007-02-08

### Abstract

**AIM:** To determine the expression of WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) messenger RNA (mRNA) and protein, and evaluate its clinicopathological significance in human extrahepatic cholangiocarcinoma (ECC).

**METHODS:** Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry (UIP method) were used to detect the expression of WWOX mRNA and protein respectively in 21 ECC patients and 5 cases of normal bile duct tissues. The results were comparatively analyzed with the clinicopathological characteristics.

**RESULTS:** The expression of WWOX mRNA was significantly lower in ECC than that in nor-

mal bile duct tissues ( $8.936 \times 10^{-7} \pm 3.253 \times 10^{-7}$  vs  $1.079 \times 10^{-6} \pm 1.735 \times 10^{-7}$ ,  $P < 0.001$ ), and the loss of mRNA was observed in 47% of the cases ( $t = 10.145$ ,  $P < 0.001$ ). Loss of WWOX protein expression was found in 57% of ECC specimens. Both mRNA and protein expression had a significant correlation with the histological grading, and the correlation coefficients were -0.583 and -0.840, respectively. However, WWOX expression had no correlations with other clinicopathological factors such as age, sex, clinical staging or the status of preoperative hepatic function ( $P > 0.05$ ). Poorly differentiated ECC had markedly lower expression of WWOX than moderately or well differentiated one ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Alterations of WWOX expression may be involved in the tumorigenesis of cholangiocarcinoma, which may serve as an indicator for predicting the invasion of ECC.

**Key Words:** Extrahepatic cholangiocarcinoma; WWOX mRNA; WWOX protein; Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Gu J, Wang M, Wang YJ, Li YM, Yuan Y, Xue CY. Expression of WW domain-containing oxidoreductase gene in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1302-1305

### 摘要

**目的:** 检测WWOX mRNA及其编码蛋白在肝外胆管癌中的表达, 分析其临床病理学意义。

**方法:** 用Real Time RT-PCR方法定量分析21例胆管癌组织WWOX mRNA表达情况, 5例肝移植的正常胆管组织作为对照; 采用UIP法染色检测相应病理切片的蛋白表达情况, 并比较mRNA和蛋白在不同分级组织中的表达差异。

**结果:** WWOX mRNA在肝外胆管癌中的表达显著低于正常胆管组织( $8.936 \times 10^{-7} \pm 3.253 \times 10^{-7}$  vs  $1.079 \times 10^{-6} \pm 1.735 \times 10^{-7}$ ,  $P < 0.001$ ), 47%表达缺失; 蛋白表达的缺失频率为57%, 其mRNA及蛋白表达与组织学分级有显著相关( $r = -0.583$ ,  $-0.840$ ,  $P < 0.001$ ), 而年龄、性

别、术前肝功能及临床分期无显著相关性. 低分化胆管癌组织中的表达显著低于分化较好的肿瘤组织( $P<0.05$ ).

**结论:** WWOX表达改变参与胆管癌的发病, 可作为预测肝外胆管癌生物侵袭性的有效指标.

**关键词:** 肝外胆管癌; WWOX; 实时RT-PCR; 免疫组织化学

顾军, 王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕. 抑癌基因WWOX在肝外胆管癌中的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1302-1305  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1302.asp>

## 0 引言

肝外胆管癌(extrahepatic cholangiocarcinoma, ECC)是高度恶性的肿瘤, 其发病机制尚不明确, 缺乏有效的早期诊断手段和分子生物学标记, 有必要对其分子生物学改变进行研究<sup>[1]</sup>. WWOX基因是近年鉴定出的新抑癌基因, 在多种肿瘤的发生、发展中起重要作用, 已经成为研究热点<sup>[2]</sup>. 通过对21例胆管癌组织和5例正常胆管组织的WWOX基因的表达情况研究, 判定WWOX基因在胆管细胞癌发病中所起的作用, 为基因治疗寻找新的靶点打下基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集东方肝胆外科医院及长海医院2004-01/11手术切除的21例胆管癌新鲜标本, 均为腺癌. 其中男14例, 女7例, 平均年龄58.8岁. 组织学分级: 高分化6例, 中分化6例, 低分化9例. 分期: I期2例, II期8例, III期10例, IVA期1例. 5例正常胆管组织标本来自肝移植患者. 新鲜肿瘤组织立即放入液氮4 h, 后转至-80℃冰箱储存; 其余组织送病理科行病理诊断及组织学分级, 所有患者切片用UIP法行免疫组化染色, 切片评估由2位有经验的病理学家完成.

组织总RNA快速抽提试剂盒购自华舜公司, dNTPs, SYBR<sup>®</sup> Premix En Taq<sup>™</sup>, miniBEST plasmid Purification kit Ver 2.0, pMD18<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems均为TaKaRa公司产品, Power Script Reverse Transcriptase购自Clontech公司, 2400型GeneAmp PCR system为GeneAmp公司产品, LightCycler realtime PCR系统为Roche Diagnostics公司产品, 兔抗鼠WWOX (28-42)多克隆抗体购自Calbiochem公司, Simple Stain

MAXPO (MULTI)试剂盒购自Nichirei公司, 引物由上海生工公司合成.

### 1.2 方法

**1.2.1 荧光定量RT-PCR** 按照已经发表的WWOX基因mRNA序列(GenBank ID: NM-016373), 分析并选择其保守序列区段, 设计上游引物: 5'-GAGAGGCTGATCCAAGAACG-3'; 下游引物为5'-ACTCTTGCGGATCTGTGTTG-3', 预计扩增产物152 bp, 在国际公用数据库检索无相似序列. 100 mg组织常规抽提后, 取0.5 μg总RNA, 按试剂盒说明组成10 μL反应体系, 42℃孵育60 min, 70℃反应6 min灭活逆转录酶, 合成cDNA第一链. 将cDNA一链产物1 μL分别加入PCR反应液、dNTP、上下游引物和Taq酶, 94℃ 30 s预变性, 随后94℃变性10 s, 62℃退火15 s, 72℃延伸20 s, 共30个循环, 72℃延伸5 min. 产物经纯化、回收并电泳鉴定, 操作按试剂盒说明.

纯化PCR产物1 μL加入pMD18-T载体中, 16℃过夜连接; 将10 μL连接产物插入100 μL大肠杆菌DH5α感受态细菌中, 常规蓝白斑筛选并PCR扩增确认成功插入WWOX基因. 挑取菌落白菌, Amp+LB液体培养基37℃、200 r/min过夜培养, 取其上层菌液4 mL, 进行质粒DNA抽提纯化并经PCR反应扩增、电泳鉴定, 计算出质粒DNA含量为251.4 mg/L, 分别稀释为 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  mg/L, 作为标准品; 用Green I 嵌合荧光法检测, Tag反应液中分别加入WWOX上下游引物、标准品或组织样品1 μL组成20 μL反应体系. 预变性95℃, 10 s, 20℃/s, 1个循环, 然后95℃变性, 5 s, 20℃/s, 60℃退火20 s, 20℃/s, 45循环; 循环结束后自动进行熔解曲线分析. RUN Lingtacycler Version 5.32软件自动分析各项参数, 计算模板的初始含量.

**1.2.2 免疫组化染色** 采用UIP法染色, 石蜡切片常规脱蜡至水, 热抗原修复, 抗WWOX多抗工作浓度1:200, 阳性着色定位于肿瘤细胞和(或)基质细胞胞质内, 呈褐色颗粒. 阳性判断按文献标准, 阴性对照以PBS代替一抗.

**统计学处理** 应用SPSS11.5软件包进行统计分析, 计量资料行方差分析, 计数资料用Fisher精确检验, Spearman法检验相关性. 检验显著性水准:  $P<0.05$ .

## 2 结果

**2.1 荧光定量RT-PCR结果** 根据标准品Ct值计算直线回归方程:  $Y = 11.16 - 4.215X$ , X为样品的

### ■创新盘点

本研究用WWOX表达质粒作为标准品, 比用“管家基因”作为内对照标准品有一定优势, 其定量准确, 结论可靠, 对定量低丰度基因敏感性高. 同时, 定量RT-PCR与相应标本的免疫组化对照, 可以明确mRNA与蛋白表达之间的差异, 对进一步研究基因的转录变体与蛋白功能的关系提供线索. 有关胆管癌分子发病机制和分子预后指标的研究较少, 本研究证实WWOX基因在胆管癌中高频缺失, 且缺失发生与组织分级显著相关, 证明该基因的改变在胆管癌分子发病中起一定的作用, 可预测肿瘤的侵袭性.

### ■应用要点

WWOX蛋白与p53基因及众多核转录因子的相互作用日益受到重视, 成为一个新的热点. 针对恢复WWOX基因功能的研究已经在体内及体外显示抑制肿瘤生长的作用, 包括Ad-WWOX、逆转启动子高甲基化和siRNA等方法均显示令人鼓舞的结果. 临床研究也发现与性激素相关肿瘤的预后显著相关, 有望成为一个预后判断的独立标记, 作为治疗的靶基因有着巨大的潜力.

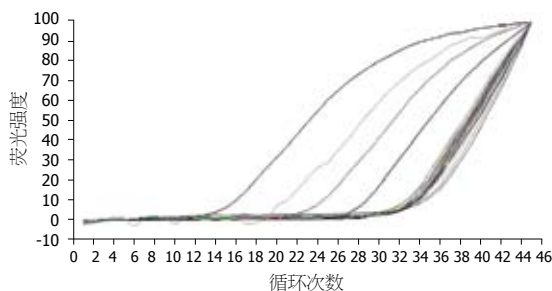


图1 WWOX质粒标准品和胆管癌样品扩增曲线.

Ct值, Y为样品浓度的对数值, 正常胆管WWOX mRNA浓度为 $1.079 \times 10^{-6} \pm 1.735 \times 10^{-7} \mu\text{g/L}$ , 胆管癌组织为 $8.936 \times 10^{-7} \pm 3.253 \times 10^{-7} \mu\text{g/L}$ , 14/21例(66.67%)低于正常均值. 熔解曲线无明显杂峰, 表明无引物二聚体和非特异扩增(图1).

2.2 免疫组化染色结果 阳性染色为9例, 阴性为12例, 阴性率为57.14%(12/21例), 其中高分化表达阴性1例(1/6, 16.67%), 中分化3例阴性(3/6, 33.33%), 低分化8例阴性(8/9, 88.89%). 腺癌细胞质呈棕色颗粒, 部分间质细胞染色(图2).

2.3 统计分析 14/21例(66.67%)胆管癌组织WWOX mRNA浓度低于正常均值, 比正常胆管明显降低( $t = 10.145, P < 0.001$ ), 差异有统计学意义. 用样本mRNA含量比正常均值降低30%作为判断基因的表达缺失的标准, 10例(47.62%)表达缺失. 高分化组比低分化组的mRNA含量更低, 差异有统计学意义( $P = 0.012$ ), 但高分化组和中分化组、中分化组和低分化组比较差异无统计学意义, mRNA含量与年龄、性别、临床分期及术前肝功能状况差异无统计学意义; 蛋白表达亦与组织的分化有关( $\chi^2 = 7.843, P = 0.020$ ), 与其他临床特征差异无统计学意义(表1). Spearman分析发现肿瘤组织的mRNA含量及蛋白表达和胆管癌的分化程度呈负相关( $r = -0.583, P = 0.007; r = -0.840, P < 0.001$ ).

### 3 讨论

众多研究发现, 含WW域的氧化还原酶基因(WWOX)在多种肿瘤, 尤其是消化道肿瘤和激素相关肿瘤中的启动和进展阶段起重要作用. 作用机制是以Tyr33磷酸化的方式与P53协同诱导凋亡, 是凋亡途径中的必需分子伴侣<sup>[2-5]</sup>. 如基因缺失或Tyr33未磷酸化, S期未修复的DNA逃逸细胞周期“检查点”, 启动实体细胞突变的进程<sup>[6-7]</sup>, 并促进bcl-2和bcl-xL表达, 抑制凋亡, 促进肿瘤进展<sup>[8-9]</sup>.

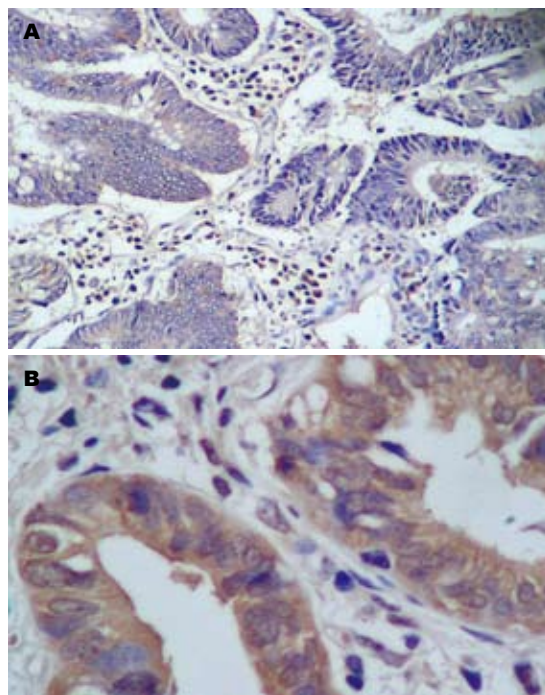


图2 不同分化亚型胆管癌免疫组织化学染色情况. A: 中高分化胆管癌, WWOX染色阳性,  $\times 100$ ; B: 高分化胆管癌, WWOX胞质着色,  $\times 400$ .

WWOX基因在消化道肿瘤中有高频的杂合性缺失(LOH), 且与组织分化程度相关, 但胆管癌中的表达程度尚未见报道. 本研究用Real Time RT-PCR法定量分析WWOX mRNA在胆管癌中的表达, 发现正常胆管组织表达量基本恒定, 胆管癌组织表达明显低, 差异有统计学意义; 低分化组织其mRNA比高分化组织缺失更明显, 差异有统计学意义( $P = 0.012$ ), 与其他临床因素差异无统计学意义, 说明WWOX基因的缺失与分化程度相关, 与文献的结论相似<sup>[10-11]</sup>. 文献以半定量PCR的电泳图片灰度扫描比对照低30%为表达的缺失, 尤其是在判定LOH时<sup>[5-6, 10-11]</sup>. 用样本mRNA含量比正常均值降低30%作为判断基因的表达减低或缺失的标准, 发现其与免疫组化观察的蛋白表达情况基本一致, 14/21例表达低于正常均值, 其中10例表达含量减低大于30%. 免疫组化发现蛋白缺失12例, 其中高分化组织1例, 低分化腺癌8例, 差异有统计学意义, 与其他临床因素差异无统计学意义. 14例胆管癌标本WWOX mRNA含量低于正常均值, 10例超过30%; 而12例免疫组化阴性表达, 定量减低30%以内的3个标本对应的染色阴性, 一例超过30%的肿瘤标本免疫组化染色阳性, 表明蛋白表达和mRNA水平还存在一些差异, 原因之一可能



表 1 胆管癌患者临床病理情况和mRNA表达、免疫组化染色情况

	<i>n</i>	mRNA含量		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	免疫组化		$\chi^2$	<i>P</i> 值
		均数( $10^{-7}$ $\mu$ g/L)	标准误( $10^{-7}$ $\mu$ g/L)			阳性	阴性		
年龄分组 <50岁	7	7.326	3.165	1.675	0.11	1	6	3.5	0.159
$\geq 50$ 岁	14	9.741	3.092			8	6		
性别 女	7	8.038	2.029	0.889	0.385	3	4	0.01	0.676
男	14	9.385	3.705			6	8		
疾病分期 I+II 期	10	8.724	3.665	0.974	0.764	4	6	0.064	0.575
III+IV期	11	9.129	2.997			5	6		
分化程度 高分化	6	11.102	2.051	2.916	0.012 <sup>a</sup>	5	1	7.843	0.02 <sup>a</sup>
中分化	6	9.351	3.807			3	3		
低分化	9	7.215	2.789			1	8		
术前肝功 正常	9	8.179	2.394	0.919	0.369	6	3	3.646	0.087
异常	12	9.533	3.775			3	9		
蛋白表达 阴性	12	7.334	3.221	2.065	0.053				
阳性	9	11.072	1.789						

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 低分化。

是肿瘤标本中包含痕量的正常组织RNA, 定量检测高度敏感, 而免疫组化染色敏感性相对低; 另外, 部分异常拼接的mRNA也可能不翻译成蛋白<sup>[11]</sup>。

本组研究结果证实WWOX基因在胆管癌中高频缺失, 且缺失发生与组织分级显著相关, 证明该基因的改变在胆管癌的分子发病中起一定的作用, 可预测肿瘤的侵袭性。目前研究已表明, 该基因可以作为预后预测因子<sup>[12]</sup>, 作为肿瘤基因治疗或生物治疗目标基因。

#### 4 参考文献

- 1 Yoon JH, Gores GJ. Diagnosis, Staging, and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003; 6: 105-112
- 2 Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-2145
- 3 Ried K, Finnis M, Hobson L, Mangelsdorf M, Dayan S, Nancarrow JK, Woollatt E, Kremmidiotis G, Gardner A, Venter D, Baker E, Richards RI. Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1651-1663
- 4 Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jornvall H, Oppermann U. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/

- reductases. *J Biol Chem* 2002; 277: 25677-25684
- 5 Chen ST, Chuang JI, Cheng CL, Hsu LJ, Chang NS. Light-induced retinal damage involves tyrosine 33 phosphorylation, mitochondrial and nuclear translocation of WW domain-containing oxidoreductase *in vivo*. *Neuroscience* 2005; 130: 397-407
- 6 Palakodeti A, Han Y, Jiang Y, Le Beau MM. The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 71-76
- 7 Chang NS. A potential role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (review). *Int J Mol Med* 2002; 9: 19-24
- 8 Chang NS, Doherty J, Ensign A, Lewis J, Heath J, Schultz L, Chen ST, Oppermann U. Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1347-1354
- 9 Chang NS, Doherty J, Ensign A. JNK1 physically interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 9195-9202
- 10 Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 878-881
- 11 Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R, Huebner K, Edmonds P, Croce CM. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3053-3058
- 12 Nunez MI, Rosen DG, Ludes-Meyers JH, Abba MC, Kil H, Page R, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Liu J, Mills GB, Aldaz CM. WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome. *BMC Cancer* 2005; 5: 64

#### ■同行评价

本文采用Real-Time RT-PCR及免疫组化分别探讨了WWOX RNA和蛋白在肝外胆管癌组织中的表达, 内容比较新颖, 设计合理, 有较好的理论意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰



# STAT5信号转导通路及其靶基因产物与结直肠癌恶性潜能的关系

欧云蕊, 马向涛, 余力伟

## ■背景资料

STAT5蛋白异常激活与多种恶性肿瘤发生、发展及预后密切相关, 但是关于STAT5信号转导通路研究与结直肠癌的研究尚处于初期。深入研究STAT5信号转导通路作用机制有可能为治疗结肠癌提供新的理论和实验基础。

欧云蕊, 马向涛, 余力伟, 北京海淀医院外科 北京市 100080  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271269  
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京海淀医院外科, xiangtao\_ma@pku.org.cn  
电话: 010-62639764 传真: 010-62583027  
收稿日期: 2007-01-08 接受日期: 2007-02-09

## Constitutive activation of STAT5 pathway and overexpression of target gene products correlate with malignant potential in human colorectal carcinoma

Yun-Song Ou, Xiang-Tao Ma, Li-Wei Yu

Yun-Song Ou, Xiang-Tao Ma, Li-Wei Yu, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271269

Correspondence to: Dr. Xiang-Tao Ma, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, 29 Zhongguancun Avenue, Haidian District, Beijing 100080, China. xiangtao\_ma@pku.org.cn  
Received: 2007-01-08 Accepted: 2007-02-09

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) and target gene products including Cyclin D1 and Caspase-3 in human colorectal carcinoma (CRC), and to explore the mechanism in the tumorigenesis of CRC.

**METHODS:** Primary colorectal cancer and adjacent normal mucosal specimens were obtained from 60 patients undergoing CRC resection at Beijing Haidian Hospital from December 2003 to December 2005. Western blot analysis was used to measure the expression of STAT5, p-STAT5, Cyclin D1, and Caspase-3 in the cancerous and adjacent normal tissues.

**RESULTS:** The levels of p-STAT5, Cyclin D1, and Caspase-3 protein were increased in the cancer tissues as compared with those in the normal ones ( $P = 0.028, 0.035, 0.046$ ). Over-expression of

p-STAT5 was correlated with TNM staging ( $P = 0.026$ ), and Caspase-3 expression was also associated with TNM staging in CRC ( $P = 0.041$ ). Caspase-3 was in a positive linear correlation with p-STAT5 in tumor ( $r = 0.412, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** STAT5 signaling pathway may play an important role in the tumorigenesis of CRC, and detection of STAT5 and its target gene products may predict the malignant potential of CRC.

**Key Words:** Colorectal neoplasm; Signal transduction; Signal transducer and activator of transcription 5; Cyclin D1; Caspase-3; Western blot

Ou YS, Ma XT, Yu LW. Constitutive activation of STAT5 pathway and overexpression of target gene products correlate with malignant potential in human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1306-1309

## 摘要

**目的:** 分析STAT5及其靶基因产物Cyclin D1与Caspase-3在结直肠癌组织中的表达情况, 探讨STAT5及其靶基因产物在结直肠癌发病机制中的作用。

**方法:** 收集北京海淀医院外科2003-12/2005-12经手术切除的结直肠癌标本60例, 应用Western blot检测60例结直肠癌组织、正常黏膜中STAT5及其靶基因产物Cyclin D1与Caspase-3表达。

**结果:** p-STAT5, Cyclin D1及Caspase-3表达水平在结直肠癌组织中明显高于正常黏膜( $P = 0.028, 0.035, 0.046$ ); p-STAT5表达水平与分期相关( $P = 0.026$ ); Caspase-3与分期相关( $P = 0.041$ )。p-STAT5与Caspase-3在结直肠癌组织中表达情况呈线性相关( $r = 0.412, P < 0.05$ )。

**结论:** STAT5信号转导通路可能在结直肠癌发生过程中起重要作用, 检测结直肠癌中STAT5及其靶基因产物的表达可以反映肿瘤

的恶性潜能。

**关键词:** 结直肠癌; 信号转导; 转录信号转导子与激活子; Cyclin D1; Caspase-3; Western blot

欧云松, 马向涛, 余力伟. STAT5信号转导通路及其靶基因产物与结直肠癌恶性潜能的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1306-1309  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1306.asp>

## 0 引言

STAT5是转录信号转导子与激活子家族(signal transducers and activators of transcription, STATs)的重要成员, 该通路接受生长因子、细胞因子等细胞外信号刺激, 作用于细胞核内特异的DNA片段, 调控靶基因转录, 影响细胞的增殖、分化和凋亡<sup>[1-2]</sup>. STAT5蛋白异常激活与多种恶性肿瘤发生、发展及预后密切相关, 但是关于STAT5信号转导通路与结直肠癌的研究尚处于初期<sup>[3-4]</sup>. 本研究应用Western blot检测STAT5(p-STAT5)及其靶基因产物Cyclin D1与Caspase-3在结直肠癌组织中的表达, 分析STAT5及其靶基因产物与结直肠癌恶性潜能的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集北京海淀医院外科2003-12/2005-12经手术切除的结直肠癌标本60例, 年龄27-81(中位65)岁; 术后病理组织学类型包括: 高分化腺癌16例, 中分化腺癌30例, 低分化腺癌14例; 肿瘤分期按照国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期, 分为I期1例、II期30例、III期19例、IV期10例. 于手术切除肿瘤后15-20 min内采集结直肠癌组织及癌旁肠黏膜组织作为对照(距肿瘤边缘大于5 cm), 立即置于液氮中保存. 患者在手术前未接收化疗或者放疗并且签署知情同意书. Western blot中用的PVDF膜购自美国Millipore公司, 显影用的胶片购自美国Kodak公司. 所有抗体购自美国Santa Cruz公司. 预染标准分子质量蛋白购自美国GIBCO/BRL公司. ECL化学发光试剂盒购自英国Amersham公司. 浓缩蛋白分析液购自美国Bio-Rad公司. 其他试剂均为分子生物学纯度购自美国Sigma公司。

**1.2 方法** 组织于裂解缓冲液中裂解(150 mmol/L NaCl; 10 g/L过氧胆酸钠; 10 g/L Triton X-100; 1 g/L十二烷基磺酸钠; 10 mmol/L Tris, pH7.2; 1 mmol/L正钒酸钠; 1 mmol/L苯甲磺酰氟; 1 mmol/L氟化钠; 0.1 mmol/L抑肽酶, 1 mmol/L亮

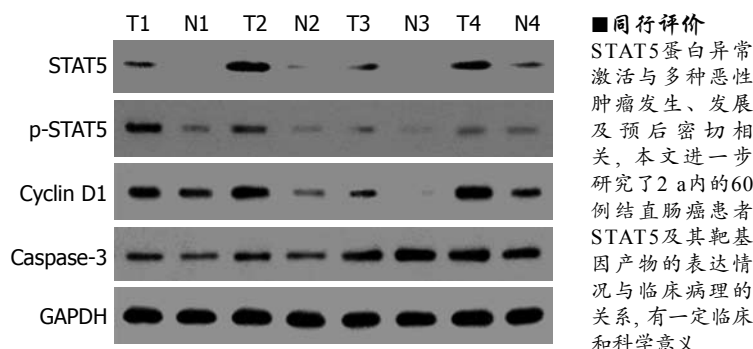


图1 STAT5通路成员在结直肠癌及正常肠黏膜组织中的表达. T: 结直肠癌组织; N: 正常肠黏膜组织。

抑蛋白酶肽). 裂解液在4℃条件下13 000 *g*离心30 min. 蛋白浓度测定Bradford法: 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品, 根据蛋白定量试剂盒(美国Bio-Rad公司)说明绘制蛋白定量标准曲线, 用分光光度计595 nm下测光密度值, 计算提取液蛋白浓度。

**1.2.1 Western blot** 将蛋白提取物与2×十二烷基磺酸钠(SDS) 上样缓冲液按1:1混合(125 mmol/L Tris-HCl, pH6.8; 40 g/L十二烷基磺酸钠; 200 mL/L甘油; 100 g/L 2-巯基乙醇)后100℃水浴下加热5 min. 取总蛋白50 μg, 100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到PVDF膜上. 电泳时在聚丙烯酰胺凝胶中加入预染标准分子质量蛋白作为指示. 转膜后用TBST缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L氯化钠, 5 g/L Tween-20)与50 g/L牛血清白蛋白封闭30 min. 封闭后, 加入一抗STAT5, p-STAT5, Cyclin D1, Caspase-3, 工作浓度1:1000, GAPDH作为内参照, 于4℃条件下孵育过夜, 用TBST(每次5 min)洗膜后, 与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育30 min, 工作浓度1:1000. 然后用ECL化学发光试剂盒检测杂交信号. 用PhosphorImager图像分析仪(美国Molecular Dynamics公司)测定条带的吸光度(A值), 以A值代表蛋白的相对表达量。

**统计学处理** 用SPSS12.0软件完成. 采用独立样本 $t$ 检验、配对样本 $t$ 检验, Pearson相关性分析,  $P<0.05$ 时表示差异有显著性。

## 2 结果

结直肠癌组织中p-STAT5, Cyclin D1及Caspase-3蛋白表达水平明显高于癌旁肠黏膜(图1, 表1). 结直肠癌组织中p-STAT5与Caspase-3表达水平与TNM分期相关( $P<0.05$ ). Pearson相关性分析显示p-STAT5与Caspase-3在结直肠癌组织中表达

### ■同行评价

STAT5蛋白异常激活与多种恶性肿瘤发生、发展及预后密切相关, 本文进一步研究了2 a内的60例结直肠癌患者STAT5及其靶基因产物的表达情况与临床病理的关系, 有一定临床和科学意义。

表 1 p-STAT5, Cyclin D1与Caspase-3表达情况与结直肠癌临床病理特征的关系(mean  $\pm$  SD)

项目	n	p-STAT5		Cyclin D1		Caspase-3	
		平均倍数 <sup>1</sup>	P值	平均倍数 <sup>1</sup>	P值	平均倍数 <sup>1</sup>	P值
性别							
男性	32	2.7 $\pm$ 0.4	0.821	4.1 $\pm$ 0.4	0.913	3.7 $\pm$ 0.4	0.746
女性	28	2.5 $\pm$ 0.3		4.3 $\pm$ 0.5		3.3 $\pm$ 0.3	
年龄 (岁)							
$\geq 65$	26	2.8 $\pm$ 0.4	0.736	4.8 $\pm$ 0.3	0.825	3.4 $\pm$ 0.3	0.870
$< 65$	34	2.4 $\pm$ 0.2		3.6 $\pm$ 0.3		3.6 $\pm$ 0.4	
TNM							
III + IV	29	3.6 $\pm$ 0.4	0.026	5.2 $\pm$ 0.5	0.085	4.2 $\pm$ 0.5	0.041
I + II	31	1.8 $\pm$ 0.2		3.4 $\pm$ 0.3		2.1 $\pm$ 0.2	
组织学分级							
G1	16	2.3 $\pm$ 0.4	0.778	4.7 $\pm$ 0.4	0.732	3.9 $\pm$ 0.4	0.894
G2	30	2.4 $\pm$ 0.3	0.645	4.2 $\pm$ 0.3	0.627	3.3 $\pm$ 0.3	0.771
G3	14	3.4 $\pm$ 0.4	0.530	3.6 $\pm$ 0.4	0.565	3.6 $\pm$ 0.3	0.832
远处转移							
M1	10	3.8 $\pm$ 0.4	0.418	5.5 $\pm$ 0.4	0.211	4.4 $\pm$ 0.4	0.162
M0	50	2.6 $\pm$ 0.3		3.3 $\pm$ 0.3		2.9 $\pm$ 0.2	
肿瘤大小							
$> 5$ cm	25	3.6 $\pm$ 0.4	0.638	5.4 $\pm$ 0.5	0.612	5.2 $\pm$ 0.4	0.324
$\leq 5$ cm	35	2.5 $\pm$ 0.2		4.0 $\pm$ 0.4		3.3 $\pm$ 0.3	
性别							
男性	32	3.0 $\pm$ 0.3	0.582	4.5 $\pm$ 0.4	0.776	3.8 $\pm$ 0.3	0.735
女性	28	2.2 $\pm$ 0.2		3.9 $\pm$ 0.3		3.2 $\pm$ 0.3	

<sup>1</sup> 平均倍数为肿瘤/正常的平均值.

情况呈线性相关( $r = 0.412$ ,  $P < 0.05$ ), 而p-STAT5与Cyclin D1在结直肠癌组织中表达情况无相关性( $r = 0.127$ ,  $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

JAKs/STATs信号转导通路与细胞的增殖、分化及凋亡关系密切, 该通路异常活化可导致细胞异常增殖和恶性转化. 目前, 在哺乳动物中发现STATs家族由7个成员组成: STAT1-STAT4, STAT5a, STAT5b及STAT6. STAT5最初被称为泌乳素诱导的乳腺因子(mammary gland factor, MGF), 在乳腺上皮细胞增殖与分化中起重要作用<sup>[5-6]</sup>. STAT5包括STAT5a与STAT5b两种异构体, 结构上具有95%的同源性. STAT5表达与活化不仅与乳腺癌发生、发展密切相关, 而且在髓样白血病、前列腺癌及头颈部鳞状细胞癌中均发现STAT5异常表达与活化<sup>[7-10]</sup>.

STAT5作为上游酪氨酸激酶通过调控靶基因而诱导某些关键产物的表达来影响肿瘤的发生, 重要的靶基因产物包括Cyclin D1与Caspase家族成员. Calo *et al*<sup>[11]</sup>发现, STAT5在卵巢癌细

胞系MDAH 2774与Caov-3中持续激活, 阻断STAT5活化可以抑制CyclinD1表达. 胱冬肽酶(Caspase)是一类天冬氨酸残基特异性的半胱氨酸蛋白酶, 在细胞凋亡过程中起关键作用. 他们对Bcl-2家族的蛋白质具有重要的酶解修饰作用, 目前已发现的属于这类蛋白酶家族的成员已有十余种, 包括Caspase1-10等, 而Caspase-3是此家族的重要成员<sup>[12-14]</sup>. Yamashita *et al*<sup>[15]</sup>应用STAT5显性负性异构体STAT5aDelta740转染乳腺癌细胞系T47D与MCF7, 发现STAT5aDelta740可以诱导Caspase-3阳性的T47D细胞发生凋亡, 而Caspase-3阴性的MCF7细胞未受影响. 我们通过检测结直肠癌组织中活化状态STAT5(p-STAT5)发现p-STAT5与分期晚(III+IV)相关( $P < 0.05$ ); Caspase-3与分期晚(III+IV)相关( $P < 0.05$ ), Pearson相关性分析显示p-STAT5与Caspase-3在结直肠癌组织中表达情况呈线性相关( $r = 0.482$ ,  $P < 0.05$ ). 本研究前期工作应用STAT5反义寡核苷酸(20  $\mu\text{mol/L}$ )转染结肠癌细胞HCT116后, 可以阻断其内源性STAT5信号转导通路, Caspase-3表达随STAT5活性受抑制而

下降, 凋亡细胞增加, 其可能机制是失活状态的STAT5不能与Caspase-3启动子结合, 从而抑制Caspase-3表达, 细胞出现凋亡<sup>[16-17]</sup>。

总之, STAT5信号转导通路在结肠癌细胞中的转录调控机制尚不清楚, STAT5的异常激活与结肠癌细胞凋亡关系还有待于进一步明确。实验动物模型及临床观察中发现肿瘤细胞耐受化疗与STAT5与Caspase成员异常增高有关, 阻断STAT5通路可诱导耐药肿瘤细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。深入研究STAT5信号转导通路作用机制有可能为治疗结肠癌提供新的理论和实验基础<sup>[20-21]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Barash I. Stat5 in the mammary gland: controlling normal development and cancer. *J Cell Physiol* 2006; 209: 305-313
- 2 Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2120-2124
- 3 马向涛, 余力伟, 王杉, 张辉, 杜如昱, 崔志荣. 环氧合酶-2抑制剂调控Stat5信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制. *中华医学杂志* 2005; 85: 2566-2569
- 4 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. STATs信号转导通路成员选择性活化与结直肠癌发生机制的研究. *北京医学* 2005; 27: 646-649
- 5 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- 6 Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8: 409-422
- 7 Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* 2004; 9: 717-728
- 8 Ni Z, Lou W, Lee SO, Dhir R, DeMiguel F, Grandis JR, Gao AC. Selective activation of members of the signal transducers and activators of transcription family in prostate carcinoma. *J Urol* 2002; 167: 1859-1862
- 9 Li H, Zhang Y, Glass A, Zellweger T, Gehan E, Bubendorf L, Gelmann EP, Nevalainen MT. Activation of signal transducer and activator of transcription-5 in prostate cancer predicts early recurrence. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5863-5868
- 10 Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 4442-4449
- 11 Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197: 157-168
- 12 Oliver L, Vallette FM. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 163-170
- 13 Broker LE, Krut FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3155-3162
- 14 Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 897-907
- 15 Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Fujii Y. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 1638-1652
- 16 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. Stat5反义寡核苷酸联合Jak激酶抑制剂AG490调控结肠癌细胞增殖与凋亡的分子机制. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 883-886
- 17 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. Stat5b信号通路调控bcl-2成员表达抑制结肠癌细胞凋亡的作用及其机制. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 1167-1169
- 18 Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 107-121
- 19 Scherr M, Chaturvedi A, Battmer K, Dallmann I, Schultheis B, Ganser A, Eder M. Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 2006; 107: 3279-3287
- 20 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. Stat5反义寡核苷酸联合5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1257-1261
- 21 Wittig I, Groner B. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 449-463

电编 张敏 编辑 张焕兰



# 血红素氧合酶-1在反流性食管炎患者食管黏膜中的表达

李军杰, 郑勇, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾

## ■背景资料

反流性食管炎是消化道常见的胃肠动力性疾病, 随着生活条件的提高及生活方式的改变, 我国反流性食管炎的发病率近年有增高的趋势, 临床表现为反酸、烧心、胸骨后疼痛、嗳气等, 因其反复发作, 严重影响患者的生活质量, 目前反流性食管炎确切的发病机制尚不明确, 研究表明胃肠激素及气体信号分子(如一氧化氮)在反流性食管炎的发病中起重要作用。

李军杰, 新疆石河子大学医学院第一附属医院老干1科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

郑勇, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵瑾, 新疆石河子大学医学院病理科 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

通讯作者: 郑勇, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科. ljj\_666222@126.com  
电话: 0993-2859284

收稿日期: 2007-01-30 接受日期: 2007-03-06

## Expression of inducible heme oxygenase-1 in the patient's mucous membrane of esophagus of reflux esophagitis

Jun-Jie Li, Yong Zheng, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen, Jin Zhao

Jun-Jie Li, the First Cadre Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong Zheng, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jin Zhao, Department of Pathology, Shihezi University Medical College, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Dr. Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ljj\_666222@126.com

Received: 2007-01-30 Accepted: 2007-03-06

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in human esophageal mucosa with reflux esophagitis (RE), and to find out the role of gas messenger molecule carbon monoxide (CO) in the pathogenesis of RE.

**METHODS:** The distributions of HO-1 protein in the esophageal tissues of 77 RE cases and 20 normal controls were detected by immunohistochemistry (SP method).

**RESULTS:** HO-1 was expressed mainly in the esophageal mucosal epithelium. The expression of HO-1 in RE patients was significantly higher

than that in the normal controls ( $0.2334 \pm 0.0511$  vs  $0.1776 \pm 0.0164$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Abnormal expression of HO-1 exists in RE, suggesting that CO may play an important role in the pathogenesis of gastrointestinal motility disorders such as RE.

**Key Words:** Reflux esophagitis; Heme oxygenase-1; Immunohistochemistry; Carbon monoxide

Li JJ, Zheng Y, Sun K, Chang XY, Chen WG, Zhao J. Expression of inducible heme oxygenase-1 in the patient's mucous membrane of esophagus of reflux esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1310-1313

## 摘要

**目的:** 检测血红素氧合酶-1(HO-1)在反流性食管炎(RE)患者食管黏膜中的表达, 以探讨气体信使分子一氧化碳(CO)在RE发病机制中的作用。

**方法:** 采用免疫组化SP法结合血红素氧合酶(HO-1)的免疫反应阳性产物的平均光密度图像分析法检测77例RE患者(分4级组)及20例对照组的食管黏膜HO-1蛋白的表达强度。

**结果:** HO-1主要在食管黏膜上皮细胞中表达, RE患者食管黏膜中表达明显强于对照组( $0.2334 \pm 0.0511$  vs  $0.1776 \pm 0.0164$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** HO-1在RE患者中的食管黏膜中的表达异常, 表明CO在胃肠动力性疾病如RE的发病机制中可能起重要作用。

**关键词:** 反流性食管炎; 血红素氧合酶-1; 免疫组织化学; 一氧化碳

李军杰, 郑勇, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾. 血红素氧合酶-1在反流性食管炎患者食管黏膜中的表达. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1310-1313

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1310.asp>

## 0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是指由于

胃与食管交界处抗反流屏障功能障碍而导致的胃或十二指肠内容物反流入食管,引起食管组织黏膜损害,是临床常见病,其发病机制尚未完全清楚。其中胃食管交界异常引发反流的机制中一过性食管下段括约肌松弛(TLESR)是反流性食管炎的最主要发病机制<sup>[1-6]</sup>,一些胃肠激素和气体信号分子对食管下括约肌运动有调节作用,一氧化碳(carbon monoxide, CO)作为一种新的胃肠道抑制性神经递质可介导平滑肌的松弛效应,我们试图通过对RE患者及对照组的食管黏膜活检标本的血红素氧合酶1(HO-1)表达的免疫组织化学研究,探讨CO在RE发病机制中的可能作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 (1)RE组实验对象来自2006-01/10就诊于石河子大学医学院一附院门诊和住院患者,所有研究对象均行胃镜检查后诊断为RE的患者共77例,其中男55例,女22例,年龄22-72(平均 $52.08 \pm 12.61$ )岁。RE的诊断按照洛杉矶分类标准(世界胃肠病大会,1994)共分4级,A级:黏膜破损局限于黏膜皱襞上,且长度 $<5$  mm; B级:黏膜破损局限于黏膜皱襞上,其中至少一个黏膜破损长度 $>5$  mm; C级:黏膜破损相互融合,但小于食管周径75%; D级:黏膜破损相互融合,至少侵犯食管周径75%以上,食管下端溃疡也列入D级。77例RE者中,A, B, C, D级分别为21, 25, 18和13例。将A和B级定为轻度RE, C级为中度, D级为重度RE。RE患者均有一种或以上不同程度的反流症状,如反酸、烧心、反食、胸骨后疼痛,部分患者还伴有腹胀、嗝气、吞咽困难等,既往有糖尿病、神经性病变、硬皮病、恶性肿瘤、上消化道手术史等病史者除外; (2)对照组标本20例取自正常志愿者,其中男13例,女7例,年龄23-66(平均 $47.75 \pm 12.79$ )岁。本组无临床上无反酸、烧心、反食、胸骨后疼痛等反流的症状与体征,无免疫疾病、感染病史,无近期服用药物史,内镜下无食管黏膜破损,食管黏膜病理检查证实,食管黏膜组织无器质性病变。以上5组受检者,均在电子胃镜(Olympus)直视下,于食管下括约肌处活检取黏膜,立即以40 g/L多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,3  $\mu$ m连续切片,进行免疫组织化学染色。正常对照组同部位取材,做相同处理。RE各组患者的年龄与对照组年龄比较无显著性差异,用LSD对各组年龄进行两两比较,结果均无统计学意义( $P>0.05$ )。用SPSS软件

对所有入选者的性别进行 $\chi^2$ 检验,检验结果表明, $\chi^2=1.391$ , $P=0.846$ ,可以认为入选的A, B, C, D及对照组在性别方面无统计学差异,所有实验数据无性别偏差; (3)实验试剂:羊抗人HO-1多克隆抗体IgG(Santa Cruz公司产品,福州迈新生物技术开发公司提供),二抗工作液(Santa Cruz公司产品,北京中杉金桥生物科技有限公司提供),DAB显色液(DAKO公司产品,福州迈新生物技术开发公司提供)。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 石蜡组织切片3  $\mu$ m厚,经脱蜡、脱二甲苯和水化后,30 mL/L  $H_2O_2$ 溶液孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶,置0.01 mol/L枸橼酸缓冲液中微波95 $^{\circ}$ C 15 min修复抗原,滴加封闭用正常兔血清工作液(A液)孵育10 min,滴加1:100稀释的一抗(羊抗人多克隆抗体HO-1),4 $^{\circ}$ C过夜;加生物素化兔抗山羊二抗工作液(B液)和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液(C液)各孵育15 min;滴加新鲜配制的DAB液显色,苏木精复染,然后脱水、透明、中性树脂封片,光镜下观察并摄片。上述抗体稀释和组织切片漂洗均用0.01 mol/L, pH7.4的磷酸盐缓冲溶液(TBS),同时用TBS代替一抗作阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学结果判断 光镜下观察,HO-1免疫阳性产物呈棕黄色颗粒为强阳性,黄色颗粒为阳性,浅黄色颗粒为弱阳性,与背景同色呈蓝紫色为阴性。同时用计算机图像分析技术半定量监测其蛋白表达的强弱。应用Image-Pro<sup>®</sup> Plus5.0彩色病理图文分析系统(美国Media Cybernetics公司)随机选取5个视野,测定食管黏膜HO-1免疫反应阳性产物平均光密度值。平均光密度越高说明表达越强,反映细胞内蛋白表达量越多。以平均光密度值来进行量化后的统计学分析。

**统计学处理** 所有参数均采用SPSS11.0统计软件分析处理,测量指标以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,确定方差齐性后,方差分析用于分析组间均数差别, $P<0.05$ 表示两组差别具有显著性意义。

## 2 结果

2.1 HO-1免疫组化染色结果 RE组HO-1蛋白主要在食管黏膜上皮细胞中表达,胞质呈黄色至棕黄颗粒。正常对照组,大多样本没有HO-1阳性细胞的表达,少数病例在食管黏膜上皮细胞中表达,胞质呈浅黄色(图1)。

## ■ 研发前沿

目前,反流性食管炎的发病机制中,食管动力、肥胖等与反流性食管炎的关系,血管紧张素II与食管的收缩运动,促肾上腺皮质激素释放因子受体在食管的分布等等均与反流性食管炎的发病有关。研究热点是食管下括约肌松弛尤其是一过性食管下括约肌松弛的发生机制,导致食管下括约肌松弛的离子通道的研究;一氧化氮、一氧化硫导致食管下括约肌松弛的神经肌肉传导通路及他们的相互关系等。

## ■ 创新盘点

目前,血红素氧合酶在食管黏膜中的分布及作用的研究较为少见,且大多在动物模型上,本文对血红素氧合酶-1在反流性食管炎患者及对照组食管黏膜上皮细胞中表达的差异进行了分析,探讨了气体信使分子如一氧化碳在反流性食管炎发病机制中的可能作用。

### ■应用要点

一过性食管下括约肌松弛是公认的反流性食管炎的最重要的发病机制, 本研究显示一些气体信使分子如一氧化碳可能在反流性食管炎发病机制中起重要作用, 通过对其进一步的深入研究将有助于阐明反流性食管炎的病理生理机制, 为反流性食管炎的诊疗提供新方案。

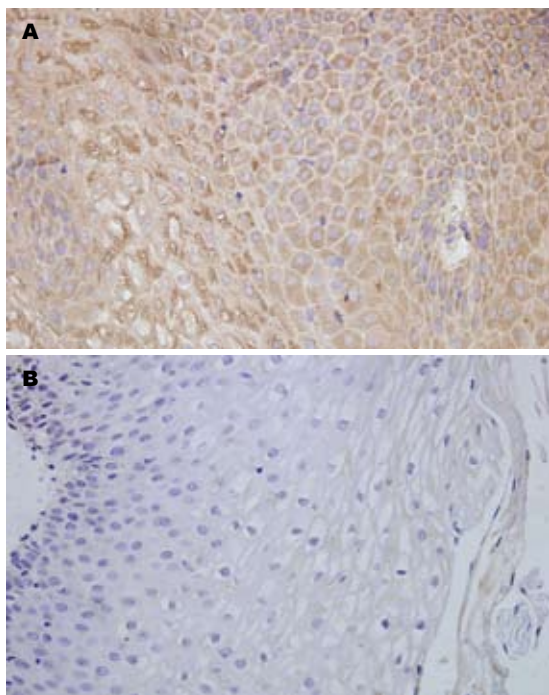


图1 HO-1免疫组化染色结果( $\times 400$ ). A: 反流性食管炎患者; B: 对照组。

**2.2 食管黏膜组织中HO-1的表达强度** HO-1平均光密度值: RE各组中A组与B组的平均光密度值比值无差异( $P = 0.867$ ), 但A, B组与对照组比值均有差异( $P < 0.01$ ), C, D及对照组和A, B组比值均有差异( $P < 0.01$ ), C, D组之间平均光密度值比值均有差异( $P < 0.01$ ), 随着RE炎症程度的加重, HO-1平均光密度值越高, 蛋白表达越高。我们还发现, 总RE组患者HO-1平均光密度值( $0.2334 \pm 0.0511$ )明显高于对照组( $0.1776 \pm 0.0164$ )( $P < 0.01$ , 表1)。

### 3 讨论

RE在西方国家是一种常见病和多发病, 约25%的成年人有烧心症状<sup>[7]</sup>。1999年潘国宗 *et al*<sup>[8]</sup>流行病学调查显示, 北京、上海的流行病学调查推测RE患病率为1.92%; 2005年李兆申 *et al*<sup>[9]</sup>对RE的调查显示, 1990-1999 RE占内镜检查总数的2.02%, 而2000-2004 RE的比率上升至5.11%。国内外学者对其日益关注, 研究不断深入, 但其确切的病因及发病机制仍不十分清楚。目前已公认一过性食管括约肌松弛(TLESR)是导致RE的最重要因素。已有研究显示, 食管下括约肌(LES)组织内的NO对维持其一定的张力起着重要作用。张力下降可导致TLESR频繁发生。

内源性一氧化碳(carbon monoxide, CO)和一氧化氮类似, 是近年研究证实的重要的生物

表1 RE各组与对照组平均光密度比较

分组	HO-1平均光密度值	P值
A级组	$0.2085 \pm 0.0307$	0.003
B级组	$0.2101 \pm 0.0320$	0.001
C级组	$0.2380 \pm 0.0322$	0.000
D级组	$0.3123 \pm 0.0500$	0.000
总RE组	$0.2334 \pm 0.0511$	0.000
对照组	$0.1776 \pm 0.0164$	—

调节物质, 具有传递细胞间信息、调节细胞功能的作用, 因而作为体内合成内源性CO的唯一酶系统——血红素加氧酶(hemeoxygenase, HO)也日益受到关注<sup>[10-16]</sup>。血红素加氧酶是内源性CO生成的限速酶, 目前已证实HO有3种同工酶: HO-1, HO-2, HO-3。HO-1为诱导型, 又被称为热休克蛋白(HSP32), 主要分布于单核-吞噬细胞系统及网状内皮细胞内, 参与血红素代谢, 在多种诱导因素(如应激或损伤等)下均可表达并产生CO。HO-2和HO-3为结构型, 在细胞处于生理状态即有表达。正常生理状态下除脾脏外, 健康胃肠道极少表达HO-1<sup>[15]</sup>, 当胃肠病变/损伤时, HO-1大量诱导产生, 有利于病变/损伤的修复。有研究发现, HO-1对动物结肠黏膜上皮细胞具有保护作用<sup>[17-18]</sup>, 然而, HO-1在人类食管组织中的分布和作用尚不清楚, 在RE患者食管组织中的表达还未见相关报道。HO-1具有抗炎症、抗凋亡、抗增生作用, 可在应激或损伤条件下诱导产生CO, CO是一种弥散的气体信使分子, 可以传递生理学信息, 在HO-1的保护作用中可能起重要作用<sup>[19]</sup>。新近研究发现, CO可以调节胃肠道平滑肌的电活动, 给予外源性的CO能刺激犬空肠环行平滑肌细胞内cGMP生成, 激活平滑肌细胞的K<sup>+</sup>通道, 增加整个细胞的外向电流, 引起膜电位超极化, 舒张平滑肌<sup>[20-21]</sup>。HO基因缺失可引起平滑肌持续痉挛, 外源性CO则能恢复平滑肌的正常反应。在本实验中我们发现, RE患者食管组织中HO-1分布异常, 较正常对照组阳性单位增高, 他的表达主要定位在食管黏膜上皮细胞, 这提示RE患者食管HO-1的分布和表达异常可能引起食管黏膜组织内、细胞内分布和量的改变, 影响食管黏膜的生理信息传递, 出现异常的平滑肌细胞膜电位, 引起食管平滑肌的收缩、舒张障碍。目前的研究表明, CO也是胃肠道的信使, 可通过可溶性鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷(sGC-cGMP)通过胞内肌浆网钙离子的释放,

使平滑肌细胞舒张, 肌肉松弛, 可以调节食管功能. 我们的研究显示, 随着食管炎症程度的加重, HO-1阳性细胞及其蛋白表达呈一致性增强, 从而发挥自身保护效应, 推测HO-1在食管损伤发生时作为一种代偿性机制具有一定保护作用. 我们应用免疫组织化学方法检测了HO-1在RE患者和正常食管组织中的表达, 结果显示, RE组HO-1的表达主要集中在食管黏膜上皮细胞, 正常对照组则少见HO-1的阳性细胞, 我们的研究结果表明, HO-1在RE食管组织的异常表达可能与食管下括约肌的功能失调有关, 他产生的CO可能与食管疾病的发生和进程有关.

总之, 本实验检测了HO-1在RE患者食管黏膜中的分布和表达, 他异常表达与食管的功能失调有关, 并初步探讨了CO在RE发病机制中的可能作用. 但限于取材条件, 无法进一步对人食管黏膜下层、肌层、浆膜层HO-1分布和表达作更深的研究. CO是消化道重要的信使分子, 在食管的调节中起着重要作用, 对RE的病理生理可能有重要影响. 但食管运动功能受许多因素调节如胃肠道的神经体液支配、胃肠肽类激素和气体信使分子(如一氧化氮)等的调节, 这些因素之间的相互调控也错综复杂, 仅从HO-1分布和表达变化来解释RE的发病机制很不全面, 有关HO-1与RE的生理及病理生理关系, CO在消化道疾病中所发挥的作用还有待于进一步深入研究, 这必将为RE的诊治和预防提供新思路、新方法.

#### 4 参考文献

- 1 Scheffer RC, Wassenaar EB, Herwaarden MA, Holloway RH, Samsom M, Smout AJ, Akkermans LM. Relationship between the mechanism of gastro-oesophageal reflux and oesophageal acid exposure in patients with reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 654-662
- 2 Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Verkleij CB, Lei A, Holman R, Lehmann A, Rydholm H. Reproducibility of meal-induced transient lower oesophageal sphincter relaxations in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 23-28
- 3 Piche T, Galmiche JP. Pharmacological targets in gastro-oesophageal reflux disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97: 333-341
- 4 Frisby CL, Mattsson JP, Jensen JM, Lehmann A, Dent J, Blackshaw LA. Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxation and gastroesophageal reflux by metabotropic glutamate receptor ligands. *Gastroenterology* 2005; 129: 995-1004
- 5 Boeckxstaens GE. The lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17 Suppl 1: 13-21
- 6 Zou D, Chen WH, Iwakiri K, Rigda R, Tippet M, Holloway RH. Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxations by electrical acupoint stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G197-201
- 7 Louis E, DeLooze D, Deprez P, Hiele M, Urbain D, Pelckmans P, Deviere J, Deltenre M. Heartburn in Belgium: prevalence, impact on daily life, and utilization of medical resources. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 279-284
- 8 潘国宗, 许国铭, 郭慧平, 柯美云, 韩少梅, 李兆申, 方秀才, 邹多武, 鲁素彩, 刘婧. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999; 19: 223-226
- 9 李兆申, 徐晓蓉, 许国铭, 邹多武, 孙振兴, 王雯, 叶萍, 陆建萍. 反流性食管炎的临床特征分析. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 315-318
- 10 王耀宏, 赵金垣. 血红素加氧酶的研究进展. *环境与职业医学* 2003; 20: 239-242
- 11 朱广博, 阚耀东. 血红素氧合酶-内源性一氧化碳系统研究进展. *现代检验医学杂志* 2004; 19: 62-64
- 12 姜柳琴, 林琳. 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1612-1616
- 13 王关嵩, 钱桂生. 血红素氧合酶的分布和作用研究进展. *中国老年学杂志* 2003; 23: 793-795
- 14 Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 411-449
- 15 Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325-336
- 16 Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 121-131
- 17 Murthy S, Flanagan A, Coppola D, Buelow R. RDP58, a locally active TNF inhibitor, is effective in the dextran sulphate mouse model of chronic colitis. *Inflamm Res* 2002; 51: 522-531
- 18 Berberat PO, A-Rahim YI, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC, Bach FH. Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 350-359
- 19 Fujii H, Takahashi T, Nakahira K, Uehara K, Shimizu H, Matsumi M, Morita K, Hirakawa M, Akagi R, Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 893-902
- 20 Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-358
- 21 Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1851-1855

#### ■名词解释

血红素氧合酶: 作为体内合成内源性CO的唯一酶系统-血红素加氧酶(hemeoxygenase, HO), 血红素氧合酶是内源性CO生成的限速酶, 目前已证实HO有3种同工酶: HO-1, HO-2, HO-3. HO-1为诱导型, 又被称为热休克蛋白(HSP32), 主要分布于单核-吞噬细胞系统及网状内皮细胞内, 参与血红素代谢, 在多种诱导因素(如应激或损伤等)下均可表达并产生CO; HO-2为非诱导型, 也称原生型HO, 是生理状态下HO的主要存在形式; HO-3也为非诱导型, 催化血红素的能力很低, 主要可能介导HO与血红素结合.

#### ■同行评价

本文研究了血红素氧合酶-1在反流性食管炎患者食管黏膜中的表达, 立意新颖, 方法可靠, 结果可信, 有一定意义.

电编 张敏 编辑 王晓瑜



# PTEN、P16表达与原发性胆囊癌病理生物学行为及预后的关系

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭仁宣, 郭克建

## ■背景资料

恶性肿瘤的发生、发展是一种复杂的多阶段过程, 与多个基因和多种分子水平变化密切相关。PTEN是一种新型抑癌基因, P16基因在人类许多原发肿瘤和细胞株发生缺失, 并导致肿瘤细胞无限制生长, 两者基因表达均与肿瘤的侵袭和转移有关。本文应用免疫组化方法检测了胆囊癌组织中PTEN和P16基因蛋白表达, 探讨其与胆囊癌预后关系, 为判断胆囊癌患者预后提供客观参考指标。

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭仁宣, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 许元鸿, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科, yuanhongxu@hotmail.com

收稿日期: 2007-02-12 接受日期: 2007-03-06

## Significance of PTEN and P16 protein expression in primary gallbladder carcinoma

Yuan-Hong Xu, Bing Ou-Yang, Guo-Zhi Yu, Ren-Xuan Guo, Ke-Jian Guo

Yuan-Hong Xu, Bing OU-Yang, Guo-Zhi Yu, Ren-Xuan Guo, Ke-Jian Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yuan-Hong Xu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yuanhongxu@hotmail.com

Received: 2007-02-12 Accepted: 2007-03-06

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of PTEN and P16 protein expression as well as their correlations with the pathobiological behaviors and prognosis of PGC.

**METHODS:** The protein expression of PTEN and P16 were observed in 56 cases of PGC and 26 cases of gallbladder benign lesions were observed by immunohistochemistry (CAS method).

**RESULTS:** The positive rates of PTEN and P16 expression in PGC were 46.4% and 42.9%, respectively, significantly lower than those in gallbladder benign lesions (92.3%, 76.9%;  $P < 0.05$ ). PTEN and P16 expression were associated with the invasion, metastasis and prognosis ( $P < 0.05$ ), but not with the histological types and grades. There existed positive correlation between PTEN and P16 expression in PGC ( $r = 0.8746$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Down-regulated PTEN and P16 expression are involved in the occurrence and development of PGC, which may be useful in evaluating the pathobiological characteristics

and prognosis of PGC.

**Key Words:** Gallbladder neoplasm; PTEN protein; P16 protein; Immunohistochemistry

Xu YH, Ou-Yang B, Yu GZ, Guo RX, Guo KJ. Significance of PTEN and P16 protein expression in primary gallbladder carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1314-1317

## 摘要

**目的:** 探讨PTEN、P16在原发性胆囊癌中的表达与其病理生物学行为和预后的关系。

**方法:** 采用免疫组化CSA法对56例胆囊癌进行PTEN和P16蛋白的定位观察。

**结果:** PTEN、P16在原发性胆囊癌中阳性表达率为46.4%, 42.9%, 显著低于胆囊良性病变(92.3%, 76.9%;  $P < 0.05$ )。PTEN、P16表达与胆囊癌的组织类型、病理学分级无相关( $P > 0.05$ ), 与胆囊癌的浸润、转移和预后明显相关( $P < 0.05$ ), PTEN和P16基因蛋白表达存在着明显的正相关( $r = 0.8746$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** PTEN和P16基因蛋白低表达可能是胆囊癌发生、发展中的分子事件, PTEN、P16表达可作为评估胆囊癌病理生物学行为及预后的参考指标。

**关键词:** 胆囊肿瘤; PTEN蛋白; P16蛋白; 免疫组织化学

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭仁宣, 郭克建. PTEN、P16表达与原发性胆囊癌病理生物学行为及预后的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1314-1317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1314.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤的发生、发展是一种复杂的多阶段过程, 与多个基因和多种分子水平变化密切相关。PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome10)是一种新型抑癌基因, P16基因



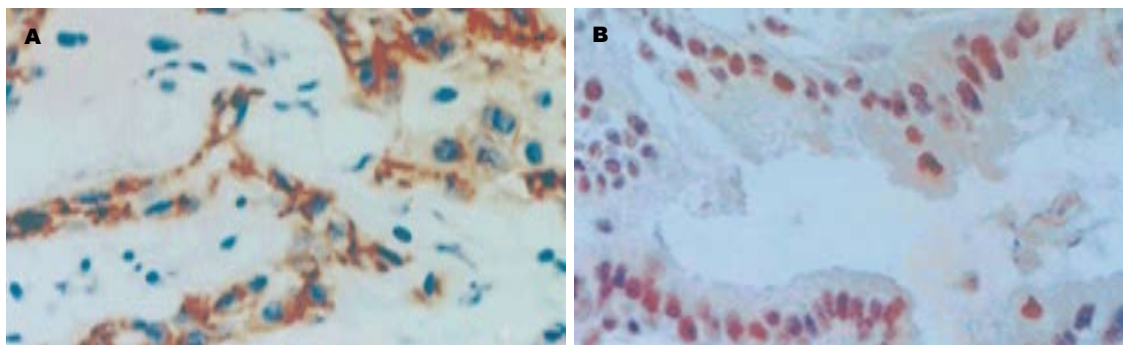


图 1 PTEN, P16在原发性胆囊癌中的阳性表达(SP×200). A: PTEN; B: P16.

在人类许多原发肿瘤和细胞株发生缺失, 并导致肿瘤细胞无限制生长, 两者基因表达均与肿瘤的侵袭和转移有关<sup>[1-3]</sup>. 我们应用免疫组织化学方法检测了胆囊癌组织中PTEN和P16基因蛋白表达, 探讨其与胆囊癌预后关系, 为判断胆囊癌患者预后提供客观参考指标.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国医科大学附属第一医院普通外科1996-2001手术根治切除56例原发性胆囊癌标本, 诊断明确, 随访完整. 男19例、女37例, 年龄(55.4±8.9)岁, 26例胆囊良性病变(22例胆囊腺瘤、4例胆囊腺肌症); 病理学分级为高、中、低分化(包括未分化癌). 浸润深度分为未浸润浆膜和浸润浆膜层. 淋巴结转移分为阴性、阳性两组. 标本经40 g/L福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片, 其中一片常规HE染色, 以复查病理诊断. 兔抗人PTEN多克隆抗体和小鼠抗人P16单克隆抗体、生物素化酪胺盐(BT)和催化信号放大系统(CSA)kit盒均购自丹麦Dako公司.

**1.2 方法** 采用CSA法 (1)石蜡切片脱蜡至水, PBS洗; (2)放30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理, 室温20 min, PBS洗3 min×3次; (3)分别滴加PTEN和P16一抗, 37℃温育1 h, PBS洗3 min×3次; (4)分别滴加生物素化抗鼠IgG(1:300) 37℃温育20 min, PBS洗3 min×3次; (5)第1次Streptavidin-HRP(1:500) 37℃温育20 min, PBS洗3 min×3次; (6)BT(0.007 mmol/L) 37℃温育12 min, PBS洗3 min×3次; (7)第2次Streptavidin-HRP(1:1000) 37℃温育20 min. PBS洗3 min×3次; (8)0.05DAB加30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色, 8-12 min; (9)流水洗, 苏木精衬染, 蓝化, 常规封片. 结果判定: 实验用已知PTEN和P16阳性大肠癌组织作为阳性对照, 用PBS代替一抗作为阴性对照. PTEN阳性物质位于细胞膜和细胞质, P16定位于细胞核. 随机选择10个高

表 1 PTEN, P16在胆囊良恶性病变中的表达

组织类型	n	PTEN		P16	
		+	阳性率(%)	+	阳性率(%)
原发性胆囊癌	56	26	46.4 <sup>a</sup>	24	42.9 <sup>a</sup>
胆囊良性病变	26	24	92.3	20	76.9

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 胆囊良性病变.

倍视野, 计数1000个肿瘤细胞, 计算阳性细胞百分率, PTEN、P16阳性细胞占肿瘤细胞≥25%为阳性, <25%为阴性, 双盲法.

**统计学处理**  $\chi^2$ 检验, 相关分析采用Spearman等级相关检验, 术后生存率分析采用Kaplan-Meier法计算生存率, 并用Gehan's Wilcoxon进行显著检验.

## 2 结果

**2.1 PTEN, P16在胆囊良、恶性病变中的表达** 免疫组织化学染色显示, PTEN阳性产物表达于细胞膜和细胞质、P16阳性产物表达于细胞核, 为棕黄色或棕褐色颗粒(图1). PTEN、P16在原发性胆囊癌中表达阳性率为46.3%和42.9%. 呈异质性, 显著低于胆囊良性病变(*P*<0.05, 表1).

**2.2 PTEN, P16与原发性胆囊癌病理生物学行为及预后的关系** PTEN和P16蛋白表达阳性率与胆囊癌的组织类型、分化程度无相关性(*P*>0.05); 与浸润深度、淋巴结转移和预后有显著相关性(*P*<0.05, 表2-3).

**2.3 在原发性胆囊癌中PTEN、P16表达间的相关性** 采用Spearman等级相关分析发现, PTEN与P16表达之间正相关(*r* = 0.8746, *P*<0.05).

## 3 讨论

PTEN是一种具有磷酸酯酶活性的肿瘤抑制基因, 由于其对磷酸化的丝/苏氨酸和酪氨酸残基

### ■ 研发前沿

目前PTEN、P16作为抑癌基因, 在肿瘤发生、发展的过程中其相互作用的机制, 尚不清楚, 是该领域的研究热点.

## ■创新盘点

本研究通过免疫组化的方法,探讨PTEN和p16在原发性胆囊癌中的表达,来探讨二者在原发性胆囊癌的发生、转移、浸润和预后中的作用及相互关系。

表 2 PTEN和P16表达与原发性胆囊癌病理生物学行为的关系

分组	n	PTEN			P16		
		-	+	阳性率	-	+	阳性率
组织类型							
管状腺癌	21	11	10	47.6%	12	9	42.9%
乳头状腺癌	18	10	8	44.4%	11	7	38.9%
黏液腺癌	10	5	5	50.0%	5	5	50.0%
未分化癌	7	4	3	42.9%	4	3	42.9%
分化程度							
高分化	27	14	13	48.1%	14	13	48.1%
中分化	19	10	9	47.4%	13	6	31.6%
低分化	10	6	4	40.0%	5	5	50.0%
浸润深度							
未浸润浆膜	26	6	20	76.9% <sup>a</sup>	7	19	73.1% <sup>a</sup>
浸润浆膜	30	24	6	20.0%	25	5	16.7%
淋巴结转移							
阴性	18	5	13	72.2% <sup>c</sup>	4	14	77.8%
阳性	38	25	13	34.2%	28	10	26.3%

<sup>a</sup>P<0.05 vs 浸润浆膜组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 阳性组。

具有去磷酸化作用而对细胞增殖起负调节效应,其失活或突变与肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[1]</sup>。另外,体外基因转染实验显示,PTEN可选择性的使局部黏附激酶(FAK)去磷酸化,抑制磷酸化的FAK对细胞迁移的促进作用,从而对肿瘤细胞的转移潜能有阻抑作用<sup>[4]</sup>。P16基因是1994年分离鉴定出的一种新型抑癌基因,因其对多种肿瘤有抑制作用而被命名为多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor 1, MTS1)。P16基因定位于人染色体9p21区域,全长8.5 kb,由2个内含子及3个外显子构成,分子量为15.85 kDa,编码表达一个148个氨基酸残基的蛋白质(P16INK4)。研究发现,P16基因及其产物在人类许多原发肿瘤和细胞株发生缺失,并导致肿瘤细胞无限制生长<sup>[5]</sup>。我们的免疫组化染色结果显示,胆囊良性病变组织PTEN、P16蛋白呈高表达,原发性胆囊癌组织的PTEN、P16蛋白表达率显著低于胆囊良性病变组织。表明PTEN、P16蛋白低表达是原发性胆囊癌常见的分子事件,可能与原发性胆囊癌的发生、发展有关。与临床病理资料相关性分析发现,PTEN、P16蛋白表达水平与胆囊癌的组织类型和分化程度没有相关性,但与浸润深度、淋巴结转移和预后呈明显的负相关,说明PTEN蛋白低表达病例肿瘤恶性程度较高,易出现浸润和转移,且预后较差。表明PTEN和P16的表达在胆囊癌的转移过

表 3 PTEN和P16表达与胆囊癌患者术后生存期的关系

类型	n	生存率%(n)		
		1 a	3 a	5 a
PTEN +	26	96.2(25) <sup>a</sup>	73.1(19) <sup>a</sup>	30.8(8) <sup>a</sup>
-	30	73.3(22)	30.0(10)	6.7(2)
P16 +	24	100(24) <sup>c</sup>	83.3(20) <sup>c</sup>	33.3(8) <sup>c</sup>
-	32	71.9(23)	28.1(9)	6.3(2)

<sup>a</sup>P<0.05 vs PTEN-组; <sup>c</sup>P<0.05 vs P16-组。

程中起着重要的抑制作用,在临床病理活检中,检测其基因蛋白表达可作为预测肿瘤转移潜能和预后的参考指标。

有关PTEN和P16在胆囊癌中的表达相关性研究,文献中报道甚少。我们研究发现,在胆囊癌中PTEN表达与P16表达呈正相关,表明两种基因在胆囊腺癌的发生和转移的过程中可能具有协同作用,其作用机制有待进一步探讨。

## 4 参考文献

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SJ, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Iltmann 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
- 孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜. 大肠组织中PTEN表达在大肠癌诊断与预后中的临床意义. *世界华人消化*

- 杂志 2004; 12: 243-244
- 3 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
  - 4 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614-1617
  - 5 Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M, Hannon GJ, Shiseki M, Zariwala M. Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1448-1451

■同行评价  
文章研究了PTEN, P16基因蛋白表达与原发性胆囊癌病理生物学行为及预后的关系, 设计合理, 有一定的临床意义。

电编 褚其林 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 2007 年国际会议

Meeting Gastrointestinal Endoscopy Best Practices:  
Today and Tomorrow, ASGE Annual Postgraduate  
Course at DDW  
23-24 May 2007  
Washington - DC  
tkoral@asge.org

Meeting ESGAR 2007 18<sup>th</sup> Annual Meeting and  
Postgraduate Course  
12-15 June 2007  
Lisbon  
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and  
Clinical Practice in Gastroenterology  
15-16 June 2007  
Portoroz  
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13<sup>th</sup> Annual International Congress  
20-23 June 2007

Rio De Janeiro  
www.ilts.org

Meeting 9<sup>th</sup> World Congress on Gastrointestinal  
Cancer  
27-30 June 2007  
Barcelona  
meetings@imedex.com

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal In-  
flammation  
10 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in  
Gastroenterology  
11-12 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

## 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!

陈国凤 主任医师  
中国人民解放军第302医院感染七科

陈建杰 主任医师  
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

陈凇 教授  
中国人民解放军总医院普通外科

陈亚军 主任医师  
首都医科大学附属北京儿童医院外科

程树群 教授  
上海东方肝胆外科医院综合治疗三科

程英升 副教授  
上海交通大学附属第六人民医院放射科

迟宝荣 教授  
吉林大学第一医院消化内科

范建高 主任医师  
上海市第一人民医院消化科

范学工 教授  
中南大学湘雅医院感染病科

关晓辉 主任医师  
吉林北华大学附属医院消化内科

管冬元 副教授  
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

李靖 副主任医师  
第三军医大学新桥医院肝胆外科

李涛 主治医师  
北京大学人民医院肝胆外科

梁力建 教授  
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘彬彬 副研究员  
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

刘海林 主任医师  
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘绍能 主任医师  
中国中医科学院广安门医院消化科

刘铁夫 教授  
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

吕志武 教授  
哈尔滨医科大学附属第二医学院消化科

宁琴 教授  
华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科

邱双健 副教授  
复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

沈薇 教授  
重庆医科大学附属第二医院消化内科

汪思应 教授  
安徽医科大学病理生理教研室

王鲁 副教授  
复旦大学附属中山医院肝外科、复旦大学肝癌研究所

王晓艳 副教授  
中南大学湘雅三医院消化内科

闻勤生 教授  
第四军医大学唐都医院消化科

吴君 主任医师  
贵阳医学院附属医院感染科

夏建川 研究员  
中山大学肿瘤防治中心生物治疗研究室

宣世英 主任医师  
青岛市市立医院肝病科

杨林 副研究员  
中山大学附属第三医院感染病科

张小晋 主任医师  
北京积水潭医院消化内科

朱春兰 主任医师  
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科