

肿瘤热疗的细胞分子作用机制及应用进展

彭远飞, 郑民华

彭远飞, 郑民华, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科、上海市微创外科临床医学中心 上海市 200025
郑民华, 现任上海交通大学医学院瑞金临床医学院副院长, 瑞金医院副院长, 外科副主任, 主任医师, 上海市微创外科临床医学中心主任, 并兼任世界内镜外科联盟理事, 亚洲内镜与腹腔镜外科医师学会(ELSA)常务理事, 亚太疝学会创始委员, 中华医学会腹腔镜与内镜外科科学组主任委员, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会常委, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会腹腔镜外科科学组组长, 上海医学会循证医学学会委员, 上海市内镜手术质控中心专家组成员。共发表论文100余篇, 5篇被SCI收录, 出版专著3本, 参编8本。

通讯作者: 郑民华, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科、上海市微创外科临床医学中心。
zmhtiger@yeah.net

电话: 021-64370045-664553

收稿日期: 2007-03-08 接受日期: 2007-03-31

Cellular and molecular mechanism and application of hyperthermia for tumor therapy

Yuan-Fei Peng, Min-Hua Zheng

Yuan-Fei Peng, Min-Hua Zheng, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Min-Hua Zheng, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, 197 Ruijin Second Road, Shanghai 200025, China. zmhtiger@yeah.net

Received: 2007-03-08 Accepted: 2007-03-31

Abstract

Hyperthermia is effective in the treatment of neoplasm, but its mechanism remains unclear for a long time. In recent years, great advances were achieved on its mechanism. *In vitro* and *in vivo* studies show that heat-induced apoptosis plays a dominant role in mild and moderate hyperthermia while necrosis in serious one. Heat induces apoptosis through mitochondria or/and death receptor pathways, and oxidative stress, intracellular Ca^{2+} increase and some molecules such as p53 and Bax play important roles in this process. Based on this mechanism, new therapies have been investigated and developed, including hyperthermia combined with gene therapy, calcium- and oxidative stress-targeted therapy, or decreasing extracellular pH value, which may

remarkably enhance the effect of hyperthermia.

Key Words: Neoplasm; Hyperthermia; Mechanism; Application

Peng YF, Zheng MH. Cellular and molecular mechanism and application of hyperthermia for tumor therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1319-1323

摘要

热疗是肿瘤治疗的有效手段之一,但是其作用机制长期不甚明了。近年来,随着热疗重新成为研究的热点之一,热疗的作用机制研究取得了很大进展。研究表明,亚高温热疗杀伤细胞以诱导细胞凋亡为主,而高温热疗则直接导致细胞坏死。热诱导凋亡通过线粒体或(和)死亡受体途径实现,氧化应激、胞内 Ca^{2+} 增高等诱导凋亡过程中起重要作用。基于热诱导细胞凋亡机制的一些联合治疗方法,如热疗联合基因治疗、氧化应激、 Ca^{2+} 靶向治疗以及降低细胞外pH值等可显著增强热疗作用。

关键词: 肿瘤; 热疗; 机制; 应用

彭远飞, 郑民华. 肿瘤热疗的细胞分子作用机制及应用进展. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1319-1323

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1319.asp>

0 引言

肿瘤热疗是肿瘤治疗的重要手段之一。近年来,随着热疗设备的不断革新和技术的不断进步,热疗重新成为研究的热点。于此同时,伴随着细胞分子生物学的飞速发展及其在热疗领域的渗透应用,热疗的细胞分子作用机制也已经有了很大进展,现就肿瘤热疗作用的细胞分子作用机制作一综述。

1 热疗对细胞的杀伤作用

热疗对于细胞的杀伤作用呈剂量依赖性,随热负荷的增加而增加。体外研究表明热疗的细胞杀伤作用通常分两个阶段,生存曲线呈肩峰状,在一定的临界温度以下,呈线性杀伤或生长抑

■背景资料

热疗是肿瘤治疗的有效手段之一,但是其作用机制长期不甚明了。本文全面综述了肿瘤热疗的细胞分子机制的进展,并阐述了以机制研究进展为基础的相关应用,包括基因治疗等。

■同行评价

本文综述了近年来肿瘤热疗的分子生物学研究进展,文献引述全面,表述准确,观点客观,对于肿瘤热疗的作用机制及应用研究有一定的参考价值。

制,温度超过临界温度后呈指数性细胞杀伤^[1]。临界温度随细胞的种类以及基因特征的不同而有一定的差异。大多数细胞的临界温度通常为42.5-43℃^[1],少数细胞可高达44℃^[2]。热负荷决定于温度时间两个因素,通常可用如下公式比较计算^[1,3]: $D = tR^{T-43}$, D为热疗作用剂量, t为作用时间, T为作用温度, R为常数, $T \geq 43^\circ\text{C}$ 时, $R = 2$; $T < 43^\circ\text{C}$ 时, $R = 4$ 。意为温度高于43℃时,温度每升高1℃,要达到同样杀伤效应的加热时间只需原来的1/2;而低于43℃时,每升高1℃,要获得同样的杀伤效应,加热时间只需要原来的1/4。

2 热疗杀伤作用的细胞机制

热作用既可以诱发细胞凋亡,又可以对细胞产生直接致死效应。体外研究表明热疗通常存在一个临界温度,在临界温度以下热诱导细胞凋亡为热作用的主要机制,而临界温度以上则主要引起细胞坏死^[4]。不同种类细胞株的临界温度不一,差异很大。有些细胞株在较低的治疗温度即可诱导凋亡,而有的细胞则需较高温度。Votrotonkonva *et al*^[5]报道大肠癌细胞暴露于40℃ 45 min后100%细胞凋亡,温度提高至42℃后,细胞坏死增加,凋亡的比例下降。而Tang *et al*^[6]研究表明43℃热作用对于大多数胃癌细胞株仅仅有暂时的细胞增殖抑制作用而无热诱导细胞凋亡作用。不仅仅是不同种类的细胞间的热敏感性有很大差异,同种不同遗传特性的细胞对热的敏感性也有很大的差异,如携带不同类型的p53的同种细胞对热的敏感性有很大差异^[4,7]。

热作用除有效杀伤体外癌细胞外,还能诱导细胞周期阻滞,使受热作用后仍存活的细胞群发生细胞周期时相同步化,细胞周期阻滞与热诱导细胞凋亡和细胞增殖抑制密切相关,并对临床制定热联合化疗的具体方案具有重要意义。对于多数细胞,热疗通常诱导G1期细胞周期阻滞^[8], G2/M期细胞周期阻滞报道较少^[9]。

3 热疗杀伤作用的分子机制

3.1 热诱导细胞凋亡 热诱导细胞凋亡是亚高温热疗的主要机制,明确其具体机制对于实施进一步的应用治疗有重要意义。目前的研究表明,热疗既可通过线粒体(内源性)途径也可通过死亡受体(外源性)途径诱导细胞凋亡,氧化应激等一些因素也在热诱导细胞凋亡中起重要作用。不同细胞之间热诱导凋亡的机制差异很大。

3.1.1 线粒体途径的激活 热疗可激活线粒体,通

过释放细胞色素C引发caspase依赖性凋亡和(或)释放AIF, Smac/Diablo等物质引发非caspase依赖性凋亡。Ren *et al*^[10]报道42-44℃ 10-60 min热作用于舌鳞癌细胞Tca8113后,线粒体释放细胞色素C,诱发线粒体-caspase依赖性细胞凋亡。Fukami *et al*^[11]使用4株携带不同类型p53的胶质瘤细胞,43-47℃ 1 h热作用后线粒体呈温度依赖性释放细胞色素C和AIF,细胞凋亡,同时发现该作用与p53状态无关。Frank *et al*^[12]报道人类成纤维细胞热作用后线粒体释放细胞色素C和Smac/Diablo(但是无AIF释放), Smac/Diablo与XIAP等结合,阻断其对caspase的抑制作用,促进凋亡。

热作用如何激活线粒体尚不明,已知可能与Bax/Bcl-2途径有关:热作用后Bax表达水平增高^[13],但是不增加Bcl-2表达,使Bax/Bcl-2比例增高,作用于线粒体膜通透性转运孔(MMP),导致线粒体激活释放细胞色素C等物质。Bax表达增加并不依赖p53,但是野生型p53可明显增高Bax表达增高。应用遗传解剖学技术对HCT-116细胞以及66例患者的直肠癌肿瘤标本的研究^[14]表明热作用后Bax表达显著增加,且与p53无显著相关。Bax缺失但p53及其下游物质不缺失的同源性HCT116突变细胞对热作用耐受。

3.1.2 死亡受体途径 热疗可以通过细胞受体途径诱导凋亡,已知的可能机制有:(1)热诱导细胞膜死亡受体的相应配体表达并通过自分泌和旁分泌诱导细胞凋亡:Vertrees *et al*^[15]研究表明,肺癌细胞BZR-T33在43℃ 3 h热作用后TRAIL, TNF- α , FAS-L基因表达显著增加, TRAIL和FAS-L水平显著增高,并通过激活细胞膜的TNF家族死亡受体途径诱导BZR-T33细胞凋亡。Tang *et al*^[6]研究也证实,热疗可以提高胃癌细胞AGS表面Fas的表达;(2)热疗增强Fas-L, TRAIL和TNF- α 的下游以及caspase上游的作用,从而通过增加细胞对死亡受体的敏感性诱导细胞凋亡:Klostergaard *et al*^[16]研究表明TNF耐受的MCF-7细胞株在热作用后可以克服TNF耐受,诱导TNF介导的细胞凋亡。热作用后, TNF耐受的细胞株热敏感性增加了100倍,而TNF不耐受的细胞株热敏感性仅仅增加了10倍。热增强作用与持续激活TNF对应的上游caspase有关。Hermisson *et al*^[17]的研究报道:热疗并不改变Fas在细胞表面的表达,但是增加恶性胶质瘤细胞对FasL和TRAIL诱导凋亡的敏感性。

3.1.3 氧化应激 氧化应激在热疗诱导凋亡中凋亡起辅助作用。细胞膜由脂质双分子层组成,热

可以诱导活性氧族(ROS)产生^[18], ROS作用于细胞膜导致膜脂质过氧化损伤, 同时还可引起线粒体膜电位变化, 从而在凋亡中起重要作用^[19-20]. 应用抗氧化剂可以防止脂质过氧化, 在一定程度上抑制凋亡. Cui *et al*^[21]研究了抗氧化剂对人类淋巴瘤U937细胞44℃ 30 min热处理的凋亡的抑制作用, 结果表明抗氧化剂可以显著抑制热诱导凋亡^[22]. 而与之相反, 使用ROS发生剂则可显著增强热诱导凋亡作用. 温度依赖性自由基引发剂AAPH^[20]和AMVN^[19]单独应用时对细胞无细胞毒性, 与热疗联合运用时则显著增强细胞凋亡.

3.1.4 胞内Ca²⁺增高 热诱导凋亡与热作用后胞内Ca²⁺增高密切相关. 热处理可以引起细胞膜损伤, 胞外Ca²⁺入内, 导致胞内Ca²⁺升高, Ca²⁺增高可激活核酸内切酶、蛋白酶、蛋白激酶C等激活凋亡通路诱发凋亡. Hashimoto *et al*^[23]报道44℃ 1 h热作用增加人肺癌细胞系LK-2胞内Ca²⁺水平, Ca²⁺升高激活凋亡通路诱导凋亡发生. 若在加热前给予LK-2细胞胞内钙离子螯合剂BAPTA, 则细胞凋亡数目明显减少.

3.1.5 其他 (1)p53: p53与热诱导凋亡密切相关, 主要表现在: 含野生型p53细胞的热敏感性显著高于突变型p53细胞^[7]; 恢复p53正常功能后细胞对热敏感性增加^[24-25]; 敲除p53或转染突变型p53后热敏感性降低或丧失^[26]. 但是, 必须指出的是, 热诱导凋亡并非p53依赖性, 大多数的癌细胞p53为突变型, 但是仍然可以发生热诱导凋亡; (2)Bcl-2家族: Bax/Bcl-2比例影响线粒体膜通透性及细胞色素C的释放. 通常热可以诱导Bax表达, 抑制Bcl-2增加线粒体通透性, 导致线粒体途径的激活(如上述); (3)热休克蛋白(HSP): HSP在热作用后增高, 可提高细胞对热的耐受性, 保护细胞免受热损伤. 应用siRNA^[27]及显性负性突变体(mHSF1)^[28]技术抑制HSP表达可以显著增加热和热化疗的敏感性. 此外, 使用HSP抑制剂或基因治疗手段抑制HSP表达, 可以提高热敏感性, 都充分表明HSP对热作用的耐受保护作用; (4)基因芯片与热疗机制探讨及应用: 使用基因芯片可以快速全面筛选热疗相关的基因, 并进一步通过RT-PCR, Western blot, siRNA等验证分析, 确定相关靶基因, 从而明确作用机制, 制定相应的诊断、分选、治疗策略. Narita *et al*^[29]通过基因芯片分析人头颈部癌细胞、咽癌细胞以及舌癌细胞在44℃ 30 min热作用前后的基因表达变化. 结果表明不同的细胞在热作用后基因

的表达有很大差异, 热诱导上调的基因包括凋亡相关基因, 肿瘤侵袭相关, 细胞周期检查点控制基因, 信号传导以及热休克相关基因. Harima *et al*^[30]对19例宫颈癌患者的病灶穿刺活检组织进行热作用, 以基因芯片检测基因表达改变, 研究热作用相关基因与热敏感性的关系. 结果筛选出35个基因并发展出一套预测评分体系, 可以清楚地将热放疗敏感组与耐受组区分开, 通过基因表达特征可以预测晚期宫颈癌热放疗的结果, 为个性化治疗提供了可能.

3.2 细胞坏死机制 45℃以上的高温热疗通常直接导致细胞死亡. 细胞坏死与热对细胞膜, 细胞骨架等的损伤有关^[1]. 45℃高温热疗杀伤肿瘤细胞的同时对于正常组织也有损伤作用, 因而实际的应用价值不大, 研究较少.

4 热疗细胞分子机制的应用

4.1 热疗联合基因治疗 (1)HSP靶向性: HSP与自杀基因: 利用热作用诱导HSP高表达的特点, 将自杀基因如单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tK)与HSP启动子合并, 构建相应腺病毒, 导入细胞, 细胞内在热作用后高表达自杀基因, 然后予以甘昔洛韦联合热作用, 杀伤细胞, 体外研究显示有显著杀伤作用^[31], 体内研究亦显示对肿瘤有显著的抑制作用^[32]; HSP抑制: 抑制HSP蛋白功能或抑制HSP的表达从而抑制细胞耐热性, 提高热敏感性. HSP抑制剂包括KNK437, 槲皮素(quer-
cetin), Vit-K1/2等, 体外及体内研究表明HSP抑制剂可显著增加热诱导凋亡^[33-35]; (2)p53靶向性: 大多数肿瘤细胞的p53发生突变, 通过恢复细胞p53的正常功能可增强热作用: 导入野生型p53: 通常使用腺病毒导入野生型p53^[24-25]; 化学物质恢复突变型p53的功能: 使用甘油等可恢复突变型p53的癌细胞的功能, 增加p53依赖性热诱导细胞凋亡^[36].

4.2 降低pH值增加热疗敏感性 降低pH可以增加热敏感性, 且该作用与p53, Bcl-2及Bax等状态无关^[37]. 可以使用单独应用时对细胞无毒性的药物或其他化学物质降低细胞外环境的pH, 以增强热作用. 如白桦脂酸(betulinic acid)可降低细胞外环境pH至6.7, 对照正常pH7.3环境培养, 显著增加耐酸人类黑素瘤细胞对热的敏感性^[38].

4.3 Ca²⁺靶向治疗 增加胞内Ca²⁺水平可增强热作用, 可以通过药物增加胞膜对Ca²⁺的通透性以及胞内Ca²⁺储存部位释放Ca²⁺实现. 局麻药: 酰胺类局部麻醉剂如利多卡因增强热诱导凋亡, 呈

剂量依赖性^[39]。维拉帕米: 使用维拉帕米可增加细胞内Ca²⁺浓度, 显著增加热作用后细胞凋亡。Shchepotin *et al*^[40]报道腹腔维拉帕米热灌注显著抑制人类结肠癌细胞HT-29种植, 细胞凋亡率增加至50%。

4.4 氧化应激途径靶向性 通过增强氧化应激可以增加热作用, 可以显著增加细胞死亡。主要途径有: 抑制抗氧化成分: 使用胞内抗氧化成分的抑制剂, 如二乙基二硫代氨基甲酸酯(DDC)^[41], 热疗联合DDC可显著增加细胞杀伤作用; 增加ROS发生: ROS发生剂包括过氧化物发生剂如H₂O₂发生剂(6-FP)^[42], 温度依赖性自由基引发剂AAPH^[20]、AMVN^[43]等, 他们与热疗联合应用时可以显著增强热作用。

总之, 热疗是恶性肿瘤治疗的重要方法之一, 近年来, 伴随着分子生物学等的进步和交叉渗透, 热疗的细胞分子机制得以相当程度的明确, 基于细胞分子作用机制的联合治疗显著增强了热疗的作用。展望未来, 伴随热疗分子机制的进一步阐明和应用, 热疗将进一步发挥其作用, 更好地服务于肿瘤的治疗。

5 参考文献

- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 43: 33-56
- Lim CU, Zhang Y, Fox MH. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells. *Int J Hyperthermia* 2006; 22: 77-91
- 张安平, 刘宝华, 张连阳. 温热治疗肿瘤的基础研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1726-1730
- O'Neill KL, Fairbairn DW, Smith MJ, Poe BS. Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines. *Apoptosis* 1998; 3: 369-375
- Vorotnikova E, Ivkov R, Foreman A, Tries M, Braunhut SJ. The magnitude and time-dependence of the apoptotic response of normal and malignant cells subjected to ionizing radiation versus hyperthermia. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 549-559
- Tang R, Zhu ZG, Qu Y, Li JF, Ji YB, Cai Q, Liu BY, Yan M, Yin HR, Lin YZ. The impact of hyperthermic chemotherapy on human gastric cancer cell lines: preliminary results. *Oncol Rep* 2006; 16: 631-641
- Yasumoto J, Kirita T, Takahashi A, Ohnishi K, Imai Y, Yuki K, Ohnishi T. Apoptosis-related gene expression after hyperthermia in human tongue squamous cell carcinoma cells harboring wild-type or mutated-type p53. *Cancer Lett* 2004; 204: 41-51
- Zolzer F, Streffer C. Quiescence in S-phase and G1 arrest induced by irradiation and/or hyperthermia in six human tumour cell lines of different p53 status. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 717-725
- Zolzer F, Streffer C. G2-phase delays after irradiation and/or heat treatment as assessed by two-parameter flow cytometry. *Radiat Res* 2001; 155: 50-56
- Ren GX, Guo W, Ye DX, Shen GF, Bai JF, Li SJ, Chen YZ. A study on the mechanism of inducing apoptosis of Tca8113 cells by means of ultrasound hyperthermia. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2006; 15: 507-511
- Fukami T, Nakasu S, Baba K, Nakajima M, Matsuda M. Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and apoptosis in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 2004; 70: 319-331
- Frank S, Oliver L, Lebreton-De Coster C, Moreau C, Lecabellec MT, Michel L, Vallette FM, Dubertret L, Coulomb B. Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 823-831
- He Y, Mao Z, Bian L, Liang X, Gao Z, Zuo H, Cao X. Relationship between the expression of Bax and apoptosis induced by hyperthermia in BcaCD885 cells. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001; 19: 14-16
- Sturm I, Rau B, Schlag PM, Wust P, Hildebrandt B, Riess H, Hauptmann S, Dorken B, Daniel PT. Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *BMC Cancer* 2006; 6: 124
- Vertrees RA, Das GC, Coscio AM, Xie J, Zwischenberger JB, Boor PJ. A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells. *Mol Carcinog* 2005; 44: 111-121
- Klostergaard J, Leroux ME, Auzenne E, Khodadadian M, Spohn W, Wu JY, Donato NJ. Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* 2006; 98: 356-369
- Hermisson M, Wagenknecht B, Wolburg H, Glaser T, Dichgans J, Weller M. Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 2000; 19: 2338-2345
- Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T. Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1131-1143
- Li FJ, Kondo T, Zhao QL, Hayashi Y, Ogawa R, Cui ZG, Feril LB Jr. A lipophilic free radical initiator, 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) enhances caspase-dependent apoptosis induced by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 165-177
- Yuki H, Kondo T, Zhao QL, Fujiwara Y, Tanabe K, Ogawa R, Nakashima A, Fushiki H, Fujimura M, Saito S. A free radical initiator, 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride enhances hyperthermia-induced apoptosis in human uterine cervical cancer cell lines. *Free Radic Res* 2003; 37: 631-643
- Cui ZG, Kondo T, Feril Jr LB, Waki K, Inanami O, Kuwabara M. Effects of antioxidants on X-ray- or hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 2004; 9: 757-763
- Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. Possible protective effects of alpha-tocopherol on enhanced induction of reactive oxygen species by 2-methoxyestradiol in tumors. *Adv Exp Med Biol* 2005; 566: 349-355
- Hashimoto T, Shibata MA, Ito Y, Nakao KI, Sasaki S,

- Otsuki Y. Elevated levels of intracellular Ca^{2+} and apoptosis in human lung cancer cells given heat-shock. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 178-192
- 24 Nashimoto T, Komata T, Kanzawa T, Aoki H, Endo S, Kon T, Uzuka T, Takahashi H, Kondo S, Tanaka R. Mild hyperthermia plus adenoviral p53 over-expression additively inhibits the viability of human malignant glioma cells. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 615-629
- 25 Zhang S, Xu G, Liu C, Xiao S, Sun Y, Su X, Cai Y, Li D, Xu B. Clinical study of recombinant adenovirus-p53 (Adp53) combined with hyperthermia in advanced cancer (a report of 15 cases). *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 631-636
- 26 Tamamoto T, Yoshimura H, Takahashi A, Asakawa I, Ota I, Nakagawa H, Ohnishi K, Ohishi H, Ohnishi T. Heat-induced growth inhibition and apoptosis in transplanted human head and neck squamous cell carcinomas with different status of p53. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 590-597
- 27 Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santoro MG. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7678-7685
- 28 Wang JH, Yao MZ, Zhang ZL, Zhang YH, Wang YG, Liu XY. HSF1 blockade-induced tumor thermotolerance abolishment is mediated by JNK-dependent caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 736-745
- 29 Narita N, Noda I, Ohtsubo T, Fujieda S, Tokuriki M, Saito T, Saito H. Analysis of heat-shock related gene expression in head-and-neck cancer using cDNA arrays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 190-196
- 30 Harima Y, Togashi A, Horikoshi K, Imamura M, Sougawa M, Sawada S, Tsunoda T, Nakamura Y, Katagiri T. Prediction of outcome of advanced cervical cancer to thermoradiotherapy according to expression profiles of 35 genes selected by cDNA microarray analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60: 237-248
- 31 Isomoto H, Ohtsuru A, Braiden V, Iwamatsu M, Miki F, Kawashita Y, Mizuta Y, Kaneda Y, Kohno S, Yamashita S. Heat-directed suicide gene therapy mediated by heat shock protein promoter for gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 629-635
- 32 Braiden V, Ohtsuru A, Kawashita Y, Miki F, Sawada T, Ito M, Cao Y, Kaneda Y, Koji T, Yamashita S. Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 2453-2463
- 33 Ohnishi K, Takahashi A, Yokota S, Ohnishi T. Effects of a heat shock protein inhibitor KNK437 on heat sensitivity and heat tolerance in human squamous cell carcinoma cell lines differing in p53 status. *Int J Radiat Biol* 2004; 80: 607-614
- 34 Shimohara S, Murakami T, Morikawa M, Matsuo J, Nagayama S, Shuto T, Suico MA, Okiyoneda T, Yamatsu I, Mizushima T, Shimasaki T, Kai H. Vitamins K1 and K2 potentiate hyperthermia by down-regulating Hsp72 expression *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* 2005; 27: 1527-1533
- 35 Asea A, Ara G, Teicher BA, Stevenson MA, Calderwood SK. Effects of the flavonoid drug quercetin on the response of human prostate tumours to hyperthermia *in vitro* and *in vivo*. *Int J Hyperthermia* 2001; 17: 347-356
- 36 Ohnishi T, Ohnishi K, Takahashi A. Glycerol restores heat-induced p53-dependent apoptosis of human glioblastoma cells bearing mutant p53. *BMC Biotechnol* 2002; 2: 6
- 37 Narita N, Fujieda S, Tokuriki M, Takahashi N, Tsuzuki H, Ohtsubo T, Matsumoto H. Inhibition of histone deacetylase 3 stimulates apoptosis induced by heat shock under acidic conditions in human maxillary cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7346-7354
- 38 Wachsberger PR, Burd R, Wahl ML, Leeper DB. Betulinic acid sensitization of low pH adapted human melanoma cells to hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 153-164
- 39 Arai Y, Kondo T, Tanabe K, Zhao QL, Li FJ, Ogawa R, Li M, Kasuya M. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 18986-18993
- 40 Shchepotin IB, McRae DA, Shabahang M, Buras RR, Evans SR. Hyperthermia and verapamil inhibit the growth of human colon cancer xenografts *in vivo* through apoptosis. *Anticancer Res* 1997; 17: 2213-2216
- 41 Moriyama-Gonda N, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Shigeno K, Terashima M. Modulation of heat-induced cell death in PC-3 prostate cancer cells by the antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate. *BJU Int* 2002; 90: 317-325
- 42 Wada S, Cui ZG, Kondo T, Zhao QL, Ogawa R, Shoji M, Arai T, Makino K, Furuta I. A hydrogen peroxide-generating agent, 6-formylpterin, enhances heat-induced apoptosis. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 231-246
- 43 Li FJ, Kondo T, Zhao QL, Hayashi Y, Ogawa R, Cui ZG, Feril LB Jr. A lipophilic free radical initiator, 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) enhances caspase-dependent apoptosis induced by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 165-177

电编 张敏 编辑 张焕兰

β -榄香烯对实验性肝纤维化大鼠TGF- β_1 、 α -SMA、Col- I 表达的影响

胡胜军, 杨玲, 朱清静, 彭汉光

■背景资料

肝纤维化是多种原因引起的慢性肝损伤的共同病理改变, 以细胞外基质(ECM)在肝脏内沉积为特征, 肝星状细胞(HSC)活化和转型在肝纤维化中发挥关键作用。因此, 抑制HSC激活以及ECM的沉积与否则是一个非常重要的靶点。中药莪术具有活血化瘀、消散软坚作用, 体外可抑制成纤维细胞生长和促进ECM的降解, β -榄香烯是从中药莪术中提取的一种倍半萜衍生物, 具有非细胞毒性抗肿瘤、抗氧化、调节免疫、抗血栓和扩血管等作用。前期体外实验发现其能呈剂量和时间依赖性抑制肝星状细胞增殖和诱导凋亡。为此, 本文从体内模型探讨 β -榄香烯是否具有抗肝纤维化作用。

胡胜军, 杨玲, 彭汉光, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

朱清静, 武汉市传染病医院 湖北省武汉市 430022

胡胜军, 华中科技大学同济医学院04级硕士研究生, 主要从事中西医结合肝脏疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30500658

通讯作者: 杨玲, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科。

yang_lng@yahoo.com.cn

电话: 027-85726381

收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2007-01-20

Effect of β -elemene on the expression of transforming growth factor- β_1 , α -smooth muscle actin and collagen- I in rats with hepatic fibrosis

Sheng-Jun Hu, Ling Yang, Qing-Jing Zhu, Han-Guang Peng

Sheng-Jun Hu, Ling Yang, Han-Guang Peng, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Qing-Jing Zhu, Wuhan Hospital of Infectious Diseases, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30500658

Correspondence to: Ling Yang, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yang_lng@yahoo.com.cn

Received: 2006-11-30 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To study the effect of zedoary rhizome extract (β -elemene) on the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen- I (Col- I) in rats with hepatic fibrosis.

METHODS: The experimental model of hepatic fibrosis was induced by hypodermic injection of carbon tetrachloride (CCl_4) in Wistar male rats. β -elemene was intraperitoneally administered into the rats for 8 weeks (0.1 mL/100 g body weight per day). The samples were stained with hematoxylin and eosin for histopathologi-

cal examination. Masson staining was used to observe the liver fibrosis of rats. Liver functions were measured by enzymatic kinetic analysis. The levels of α -SMA, TGF- β_1 and Col- I expression in liver tissues were measured by SP immunohistochemistry method. The content of hydroxyproline in liver tissues was tested by specimen alkaline hydrolysis.

RESULTS: After eight weeks of treatment, the area percentages of collagen fiber in normal, model, control and treatment groups were $1.22\% \pm 0.24\%$, $7.47\% \pm 0.81\%$, $5.57\% \pm 0.78\%$ and $4.33\% \pm 0.48\%$, respectively. The percentage was significantly lower in treatment group than that in model and control group (both $P < 0.01$), and the histological remission and collagen fiber diminishment were also better in treatment group. The expression of Col- I in normal, model, control and treatment groups were $3.022\% \pm 0.553\%$, $9.998\% \pm 1.431\%$, $7.554\% \pm 0.914\%$ and $4.587\% \pm 1.008\%$, respectively, and it was also significantly lower in treatment group than that in model and control group ($P < 0.01$). The levels of α -SMA and TGF- β_1 expression were significantly different between treatment group and model group ($3.172\% \pm 0.542\%$ vs $5.605\% \pm 1.315\%$, $P < 0.01$; $2.868\% \pm 0.554\%$ vs $5.653\% \pm 0.9\%$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: β -elemene can reverse the pathologic progression of CCl_4 induced liver fibrosis by inhibiting the activation of hepatic stellate cells, down-regulating the expression of α -SMA, TGF- β_1 and decreasing the sediment of extracellular matrix in the liver tissues.

Key Words: Liver fibrosis; β -elemene; Transforming growth factor- β_1 ; α -smooth muscle actin; Collagen- I; Immunohistochemistry

Hu SJ, Yang L, Zhu QJ, Peng HG. Effect of β -elemene on the expression of transforming growth factor- β_1 , α -smooth muscle actin and collagen- I in rats with hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1324-1330

摘要

目的: 观察 β -榄香烯对四氯化碳肝纤维化大鼠

TGF- β_1 、 α -SMA、Col-I表达的影响.

方法: 采用CCl₄皮下注射诱导Wistar δ 大鼠肝纤维化模型, 用 β -榄香烯0.1 mL/100 g剂量每天腹腔注射8 wk后, 用苏木精-伊红染色(HE)和胶原纤维(Masson)染色观察大鼠肝脏病理变化, 酶动力法检测肝功能, SP免疫组化法检测肝组织中 α -肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、I型胶原(Col-I)表达的变化, 样本碱水解法检测肝组织中羟脯氨酸(HYP)的含量.

结果: 8 wk后, 正常组、模型组、对照组及治疗组肝组织胶原纤维面积百分比分别为1.22% \pm 0.24%, 7.47% \pm 0.81%, 5.57% \pm 0.78%, 4.33% \pm 0.48%, 治疗组与模型组、对照组相比均有显著差异($P<0.01$), 并且治疗组肝组织纤维化程度分级较模型组逐渐好转, 胶原纤维所占面积显著缩小; 在肝组织中测得的Col-I阳性面积比分别为3.022% \pm 0.553%, 9.998% \pm 1.431%, 7.554% \pm 0.914%, 4.587% \pm 1.008%, 治疗组与模型组、对照组相比均有显著差异($P<0.01$). α -SMA和TGF- β_1 在治疗组和模型组肝组织中的表达也有显著差异(3.172% \pm 0.542% vs 5.605% \pm 1.315%, $P<0.01$; 2.868% \pm 0.554% vs 5.653% \pm 0.9%, $P<0.01$).

结论: β -榄香烯对四氯化碳肝纤维化大鼠具有拮抗作用, 主要是通过抑制肝星状细胞激活, 降低TGF- β_1 、 α -SMA在肝组织中的表达, 减少细胞外基质在肝脏中的沉积, 从而延缓肝纤维化的进程.

关键词: 肝纤维化; β -榄香烯; 转化生长因子 β_1 ; α 平滑肌肌动蛋白; I型胶原; 免疫组化

胡胜军, 杨玲, 朱清静, 彭汉光. β -榄香烯对实验性肝纤维化大鼠TGF- β_1 、 α -SMA、Col-I表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1324-1330
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1324.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是多种原因引起的慢性肝损伤的共同病理改变, 其特征是纤维增生和降解不平衡, 纤维组织在肝脏过度沉积的结果^[1]. 研究证实, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化和转型在肝纤维化中发挥关键作用, HSC的激活在HF发生、发展中处于中心地位^[2-3]. 静息状态的HSC激活为肌成纤维细胞并产生大量的细胞外基质(ECM), 而ECM合

成、沉积增多, 降解相对减少甚至抑制, 其结果是肝细胞功能进一步受损、肝脏结构破坏而最终导致肝硬化. 因此, 抑制HSC激活以及ECM的沉积与否则是一个非常重要的靶点, 是促进肝纤维化逆转的重要因素^[4].

中药莪术具有活血化瘀、消积软坚作用, 体外可抑制成纤维细胞生长^[5], 对单侧输尿管梗阻诱发的肾硬化大鼠, 可通过多个环节促进细胞外基质(ECM)的降解^[6]; 并具有抗大鼠免疫性和化学性肝纤维化作用^[7-8], 临床广泛应用于肝纤维化的治疗. 但其抗纤维化的有效成分尚不明确. β -榄香烯是从中药莪术中提取的一种倍半萜衍生物, 为非细胞毒性的抗癌药物, 除对多种肿瘤细胞具有抑制作用外, 尚有抗氧化、调节免疫、抗血栓和扩血管等作用^[9-14]. 那么 β -榄香烯是否为莪术抗肝纤维化的有效成分呢? 我们前期在体外实验中发现该提取物能呈剂量依赖性和时间依赖性抑制肝星状细胞增殖和诱导凋亡^[15]. 本文在此基础上进一步从体内模型探讨 β -榄香烯是否具有抗肝纤维化作用, 并报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 δ 健康6周龄Wistar大鼠40只, 体质量200-220 g, 购于华中科技大学同济医学院实验动物中心. 随机分为4组: 空白对照组(N)10只, 模型组(M)10只, 溶酶对照组(C)10只, β -榄香烯治疗组(T)10只. 四氯化碳, 市售食用色拉油, β -榄香烯单体95%纯度(体积分数)购于温州市工业科学研究所生物工程研究所, 99%(体积分数)1-甲基-2-吡咯烷酮(1-Methyl-2-pyrrolidinone)购于AIDRICH公司, 40 g/L中性福尔马林缓冲液, 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); I型胶原、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)多克隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及兔抗鼠SP试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司). RNA提取试剂盒为美国罗氏公司产品, RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶及聚合酶链反应(PCR)扩增试剂均购自美国Promega公司.

1.2 方法 将四氯化碳溶于食用色拉油中, 配成40%浓度(体积分数)以备用. 95% β -榄香烯单体溶解于等体积的99% 1-甲基-2-吡咯烷酮(1-methyl-2-pyrrolidinone)配成50 g/L溶液备用.

1.2.1 动物模型制备及给药方法 所有组动物饲养1 wk后, 除正常组以外的大鼠轮替背部皮下及四肢内侧注射40% CCl₄植物油混悬液3 mL/kg体

■ 研发前沿

进展性肝纤维化是可逆转的, 药物通过抑制HSC激活、诱导其凋亡及防止ECM沉积的干预性治疗在实验性肝纤维化方面已取的疗效. β -榄香烯作为抗肝纤维化常用药物莪术的主要有效成分, 是否具有抗肝纤维化作用? 本文通过其干预实验性肝纤维化大鼠的体内研究, 探讨其作用机制.

■创新盘点

本实验通过提取莪术提取物 β -榄香烯单体干预肝纤维化大鼠模型,检测肝星状细胞活化增殖的标志 α -SMA及致肝纤维化细胞因子TGF- β_1 ,分析了中药莪术主要成分抗纤维化的作用靶点。

表 1 β -榄香烯对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响(mean \pm SD)

分组	n	纤维化程度(S)期					胶原纤维面积(%)
		0期	1期	2期	3期	4期	
正常组	10	10	0	0	0	0	1.22 \pm 0.24 ^b
模型组	8	0	0	1	2	5	7.47 \pm 0.81
对照组	7	0	0	3	2	1	5.57 \pm 0.78 ^a
治疗组	6	0	2	3	1	0	4.33 \pm 0.48 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

质量,每周两次;正常组大鼠单纯采用同体积的植物油注射。在造模的同时,治疗组和对照组2 wk后分别加用 β -榄香烯溶酶混合溶液1 mL/kg体质量和等体积溶酶腹腔注射。4 wk后取模型组大鼠肝脏做HE染色切片,动态观测肝脏病理过程。治疗给药8 wk后,全部动物麻醉解剖,下腔静脉取血,备用生化指标测定,后取大鼠肝脏,剪成小块,用Tris-HCL缓冲液洗涤6次,用吸水纸吸干肝组织表面水份后备用,用于HYP的测定,再取右叶中间的部分以40 g/L中性甲醛固定,用于免疫组化切片,余下肝脏于液氮中速冻、-80℃冰箱内保存,备用肝组织匀浆测组织生化、抽提组织总RNA用于RT-PCR指标的测定等。

1.2.2 检测指标和方法 大鼠血清丙氨酸基转移酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清蛋白(ALb)测定生化全自动分析仪测定。 α -肌动蛋白(α -SMA)、TGF- β_1 、I型胶原的检测,采用免疫组织化学法按说明书操作。镜下观察组织切片,每张切片选取四周及中央区域,于200倍光镜下测阳性着色面积百分比 = 阳性着色面积/肝组织面积 $\times 100\%$,取平均值。大鼠肝脏HYP的测定采用羟脯氨酸测试盒,精确称取肝组织湿质量30-100 mg放入试管中,准确加水解液1 mL,加盖后沸水浴水解20 min,冷却后加指示剂并加入调pH液,直至pH值在6.0-6.8左右,然后加入蒸馏水至10 mL,取3-4 mL稀释的水解液加适量活性炭混匀离心后取上清1 mL作比色。羟脯氨酸含量(mg/g湿质量) = (测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度) \times 标准管含量(5 mg/L) \times 水解液总体积(10 mL)/组织湿质量(mg)。石蜡切片常规HE染色后,按文献方法采用肝纤维化病理学分期^[16]。肝组织胶原纤维染色(Masson)法,结果经图像分析仪分析。每张切片选取四周和中央区域,取胶原纤维最多的视野,每个视野包括汇管区,200倍镜下测定胶原纤维面积百分比 = 胶原纤维面积/肝组织面积 \times

100%,取平均值。

统计学处理 计量资料以(mean \pm SD)表示,纤维化程度以等级资料表示。计量资料采用SPSS13.0软件进行单因素方差分析,计数资料采用SPSS13.0软件进行非参数分析,以 $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理学变化 正常组HE染色显示肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列,结构完整,无变性、坏死及炎性细胞浸润。模型组HE染色显示肝索排列紊乱,肝细胞呈弥漫性脂肪变性、空泡形成,门管区及肝小叶内可见明显的灶性淋巴细胞浸润,纤维组织增生明显,部分区域形成纤维间隔,形成假小叶。Masson染色可见胶原纤维增生明显。治疗组汇管区见肝小叶结构部分恢复,炎性细胞浸润少,纤维细小,假小叶部分模糊,细胞水肿及变性坏死情况明显改善,胶原纤维沉积均明显减少。而对照组镜下仍见有较多的胶原纤维沉积,肝细胞变性炎性细胞浸润也较明显。汇管区及中央静脉周围胶原纤维组织增生较模型组明显减少,呈局限性,假小叶部分消失。模型组与治疗组、对照组之间肝纤维化分级有明显差异,胶原纤维面积比比较也有显著意义(总体 $F = 159.94$,方差齐性, $P < 0.01$,表1,图1)。

2.2 各组大鼠肝功能和Hyp的变化(表2) 本次实验测得的大鼠肝功能ALT, AST, ALB总体 F 值分别为14.585, 10.249, 19.128, P 值均 < 0.01 ,方差齐性。两两比较分析,正常组大鼠肝功能ALT, AST, ALB与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$),但模型组与治疗组比较(P 值分别为0.195, 0.530, 0.019),除了ALB外均无显著性差异,分析肝功能的变化可能除了与肝脏本身的炎症程度有关,可能还与本身健康状况有关;HYP是胶原蛋白所特有的氨基酸,测定HYP含量可明确胶原总

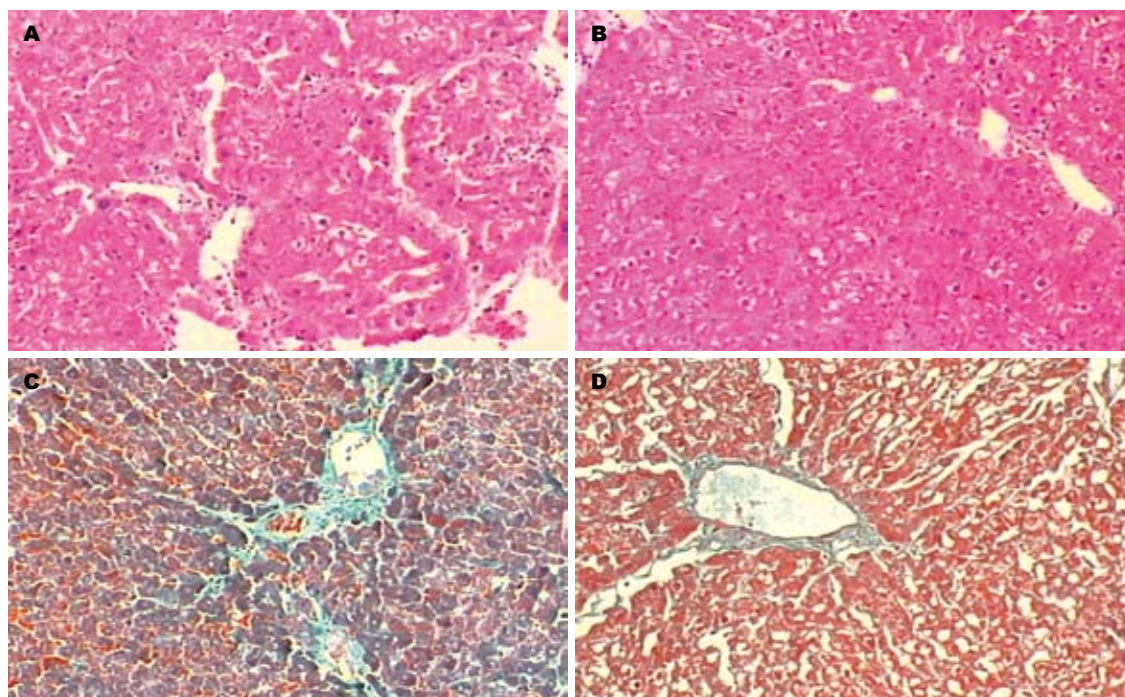


图1 β -榄香烯对CCl₄大鼠肝纤维化模型肝组织形态学的影响($\times 200$). A: 模型组大鼠HE染色; B: 治疗组大鼠HE染色; C: 模型组大鼠masson染色; D: 治疗组大鼠masson染色.

■应用要点

本研究证实了 β -榄香烯可抑制肝纤维化组织中肝星状细胞活化的标记 α -SMA的表达和降低TGF- β_1 的表达,表明 β -榄香烯可通过抑制HSC活化增殖、诱导凋亡,抑制TGF- β_1 的合成,从而减少ECM的来源,使肝脏中ECM的沉积降低,发挥抗肝纤维化的作用,进一步为临床应用 β -榄香烯制剂治疗肝纤维化提供了理论依据.

表2 大鼠肝功能和HYP的变化(mean \pm SD)

分组	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (G/L)	HYP (mg/g)
正常组	10	76.50 \pm 17.78 ^b	164.61 \pm 60.82 ^b	31.29 \pm 1.63 ^b	0.162 \pm 0.048 ^b
模型组	8	254.88 \pm 70.18	414.42 \pm 138.11	26.54 \pm 1.59	0.410 \pm 0.145
对照组	7	242.00 \pm 80.46	367.22 \pm 99.92	27.24 \pm 1.77 ^a	0.273 \pm 0.088 ^a
治疗组	6	208.47 \pm 85.70	330.92 \pm 107.40	28.47 \pm 1.11	0.186 \pm 0.120 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

体水平, 评定纤维化病变程度. 本次实验测得的HYP总体 F 值为9.786, $P < 0.01$. 模型组大鼠肝组织HYP的含量与正常组和治疗组比较均有显著性差异($P < 0.01$), 与对照组比较也有显著性差异($P = 0.015$).

2.3 各组大鼠 α -SMA, TGF- β_1 , I型胶原免疫组化结果(表3) 本次实验测得的大鼠 α -SMA, TGF- β_1 , I型胶原免疫组化结果分析, 总体 F 值分别为46.97, 88.48, 76.45, P 值均 < 0.01 , 方差齐性.

2.3.1 肝组织中I型胶原的表达 正常组大鼠中I型胶原主要分布于汇管区的结缔组织、血管壁及胆管壁, 在肝实质内沿肝窦壁形成的丝状着色. 模型组中, I型胶原主要分布于中央静脉周围及纤维组织增生的汇管区, 形成宽而粗大的纤维条索, 免疫组化染色呈强阳性. 对照组I型胶原的分布部位与M组基本一致, 表达相对减

少. 治疗组I型胶原仅见于中央静脉周围及汇管区, 着色减少且浅, 呈细丝状(图2). 统计分析, 总体方差齐性 $F = 76.45$, $P < 0.01$; 两两比较分析: 模型组与正常组、对照组、治疗组比较均有显著性差异($P < 0.01$), 对照组与治疗组比较也有显著性差异($P = 0.002$).

2.3.2 肝组织中TGF- β_1 的表达 正常组TGF- β_1 未见明显表达; 模型组TGF- β_1 在汇管区和纤维隔中染色明显加深, 主要见于Kupffer细胞、肝星状细胞和炎性细胞质中, 呈染色较深的棕黄色; 治疗组在纤维隔内间质细胞和炎性细胞质阳性染色程度减轻, 阳性细胞数目减少, 与模型组比较 $P < 0.01$; 对照组与模型组相比, TGF- β_1 表达的显色指数无显著性差异(图3). 统计分析, 总体方差齐性 $F = 88.48$, $P < 0.01$; 两两比较分析: 模型组与正常组、对照组、治疗组比较均有显著性差

■名词解释

榄香烯:是由碳、氢两种元素组成的倍半萜烯类化合物,主要成分为 β -榄香烯,其化学名为1-甲基-1-乙炔基-2,4-二异丙基环己烷,分子式为 $C_{15}H_{24}$,相对分子量为204,另外还含有少量的 δ -榄香烯及 γ -榄香烯。

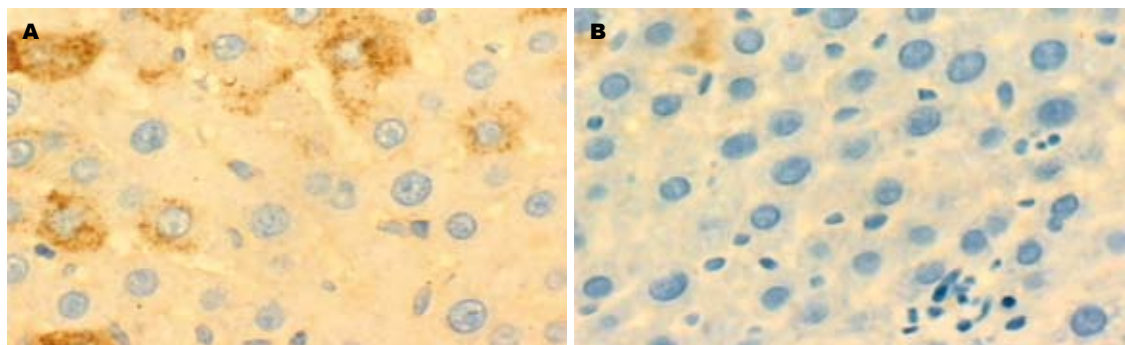


图2 β -榄香烯对 CCl_4 大鼠肝纤维化模型肝组织COL-1表达的影响($\times 200$). A: 模型组; B: 治疗组.

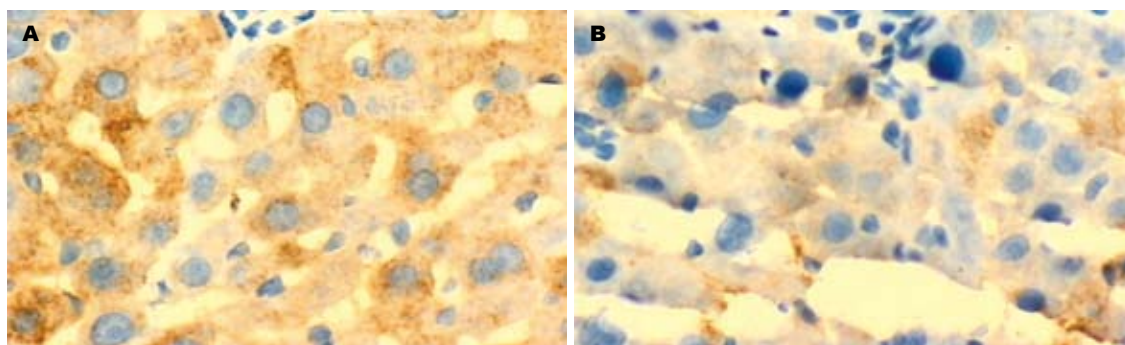


图3 β -榄香烯对 CCl_4 大鼠肝纤维化模型肝组织TGF- β_1 表达的影响($\times 200$). A: 模型组; B: 治疗组.

表3 各组大鼠肝组织 α -SMA, I型胶原和TGF- β_1 表达的变化(mean \pm SD, %)

分组	<i>n</i>	α -SMA/阳性面积比	TGF- β_1 /阳性面积比	I型胶原/阳性面积比
正常组	10	0.968 \pm 0.281 ^b	1.026 \pm 0.208 ^b	3.022 \pm 0.553 ^b
模型组	8	5.605 \pm 1.315	5.653 \pm 0.9	9.998 \pm 1.431
对照组	7	4.914 \pm 0.893	4.702 \pm 0.627	7.554 \pm 0.914 ^b
治疗组	6	3.172 \pm 0.542 ^b	2.868 \pm 0.554 ^{bc}	4.587 \pm 1.008 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组.

异($P < 0.01$), 对照组与治疗组比较也有显著性差异($P = 0.02$).

2.3.3 肝组织中 α -SMA的表达 正常组可见血管壁少量 α -SMA阳性表达; 模型组 α -SMA阳性表达细胞数明显增多, 胞质呈棕黄色, 有的细胞有2-3个较长突起, 主要分布于门静脉、汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦, 在炎性细胞浸润区的表达也明显增加, 并且在靠近纤维间隔的肝血窦表现为带有长突起的索形细胞(HSC)也为阳性; 治疗组汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦阳性细胞数目显著减少, 胞质阳性染色显著减轻, 与模型组比较差异显著($P < 0.01$); 对照组与模型组相比, α -SMA表达的显色指数无显著性差异(图4). 统计分析, 总体方差齐性 $F = 46.97$,

$P < 0.01$; 两两比较分析: 模型组与正常组、对照组、治疗组比较均有显著性差异($P < 0.01$), 对照组与治疗组比较无显著性差异($P = 0.124$).

3 讨论

榄香烯是由碳、氢两种元素组成的倍半萜烯类化合物, 主要成分为 β -榄香烯, 其化学名为1-甲基-1-乙炔基-2,4-二异丙基环己烷, 分子式为 $C_{15}H_{24}$, 相对分子量为204, 另外还含有少量的 δ -榄香烯及 γ -榄香烯^[17]. 药理学及临床研究证明, 榄香烯是一种疗效确切的非细胞毒性抗肿瘤药物, 其抗癌谱广泛, 无骨髓抑制作用, 无明显的肝、肾毒性. 对多种肿瘤细胞具有抑制作用^[18]. 研究显示 β -榄香烯呈浓度和时间依赖性抑制人

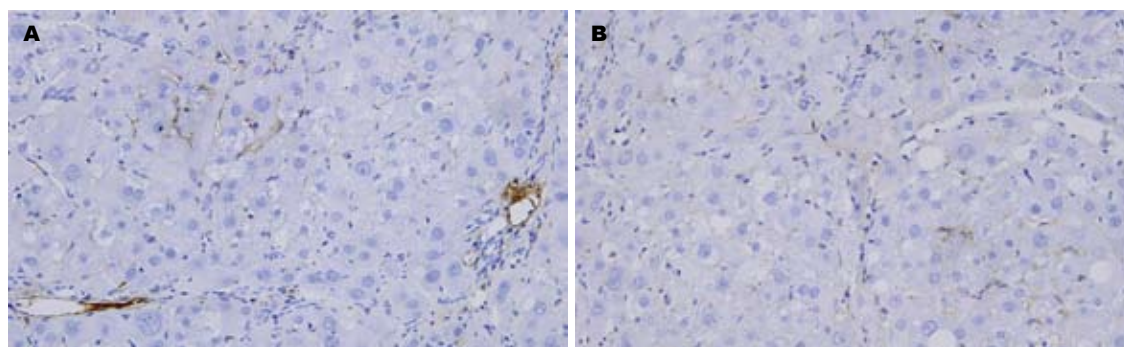


图 4 β -榄香烯对CCl₄大鼠肝纤维化模型肝组织 α -SMA表达的影响($\times 400$). A: 模型组; B: 治疗组.

■同行评价

本文研究了 β -榄香烯对实验性肝纤维化大鼠TGF- β_1 、 α -SMA、Col-I 表达的影响, 实验设计合理, 结果可信, 有一定实际应用价值.

白血病细胞株K562细胞的生长和凋亡^[12], 并下调癌基因Bcl-2的表达^[9]; 对脑胶质瘤细胞、肝癌细胞、膀胱癌细胞均有显著抑制作用^[9-11,18]. β -榄香烯除具有抗肿瘤作用外, 尚有抗氧化、调节免疫、抗血栓、降低血浆蛋白原浓度、降低全血黏度, 改善血流变学特性和扩血管等作用, 成为目前研究的热点^[13-14]. β -榄香烯作为抗肝纤维化常用药物莪术的主要有效成分, 是否能抗肝纤维化一直备受关注. 本实验结果显示经腹腔注射 β -榄香烯的大鼠, 由CCl₄诱导的肝纤维化进程受到显著抑制, 镜下可见纤维间隔和假小叶结构部分消失, 纤维化程度分级好转, 胶原纤维面积显著缩小, 进展为肝纤维化4期的大鼠数量显著低于模型对照组, 提示 β -榄香烯在体内具有抗肝纤维化作用.

肝纤维化是一种可逆性的以细胞外基质沉积为特征的损伤修复反应^[1-2]. 在急性肝损伤的修复过程中, 实质细胞再生并取代坏死或凋亡的细胞, 这一过程表现为炎症反应和局部的细胞外基质沉积. 如果肝损伤持续存在, 则肝细胞再生功能丧失, 被大量的ECM取代, 并诱导胶原纤维生成. ECM的过度沉积, 进一步可导致肝内血流阻力的增加及假小叶的形成, 进而发展为门脉高压、肝硬化, 并可能发展成肝癌, 因此抑制ECM的过度沉积是抗肝纤维化的重要途径^[3-4]. ECM主要由胶原蛋白构成, 肝脏胶原蛋白有I, III, IV, V, VI型, I, III型胶原占肝内胶原含量的80%左右, 主要分布在汇管区^[19-21]. 肝纤维化时, I, III型胶原增多, 尤以I型胶原增多为主, 占肝硬化组织中增加的总胶原含量的70%-80%, 是肝纤维化晚期及肝硬化的重要标志^[21]. HYP是胶原中的特征性氨基酸, 是评估胶原蛋白含量和肝纤维化程度的指标, 测定肝组织中HYP含量能客观反应肝纤维化程度^[22]. 本实验发现 β -榄香烯能显著抑制I型胶原在肝脏的

沉积, 降低肝组织中HYP的含量, 提示 β -榄香烯具有减少ECM在肝脏沉积的作用. 但究竟是通过抑制胶原的合成还是促进胶原的降解达到上述作用的尚有待进一步研究.

研究表明肝星状细胞是ECM的主要来源^[1-3]. 肝脏损伤后, HSC则激活成为肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cell)-活化型^[2]. 此时HSC大量增生、胞体增生、Vit A脂滴消失、胶原纤维等细胞外基质分泌增多、表达具有收缩功能的 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA), 其中 α -SMA的表达为HSC激活的标志^[1-4]. TGF- β_1 是目前已知的最强的致肝纤维化细胞因子之一^[2], 具有启动和调控肝脏ECM代谢的重要作用, 研究表明TGF- β_1 主要通过自分泌机制调节ECM的沉积, 在肝脏其靶细胞主要为肝星状细胞, HSC本身可自分泌TGF- β_1 . 肝纤维化时, TGF- β_1 一方面促进ECM合成, 抑制ECM降解; 另一方面激活HSC转化为肌成纤维细胞(MFB), MFB再通过旁分泌和自分泌作用促进大量以胶原为主的ECM合成^[3]. 因此抑制ECM过度沉积的关键是抑制HSC的活化增殖. 前期体外实验结果显示随 β -榄香烯作用剂量的增加和作用时间的延长, 肝星状细胞增殖能力显著下降, 而凋亡率明显上升^[15]; 本实验进一步显示 β -榄香烯可抑制肝纤维化组织中肝星状细胞活化的标记 α -SMA的表达和降低TGF- β_1 的表达, 表明 β -榄香烯可通过抑制HSC活化增殖、诱导凋亡, 抑制TGF- β_1 的分泌合成, 从而减少ECM的来源, 使肝脏中ECM的沉积降低, 发挥抗肝纤维化的作用.

本实验结果尚发现 β -榄香烯在改善肝脏酶学方面与模型及对照组比较并没有显著意义, 这可能与腹腔给药途径或大鼠的生活状况有关, 是否也提示 β -榄香烯抗肝纤维化的作用与降酶作用无相关性? 尚有待我们进一步研究.

4 参考文献

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-53
- 2 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-826
- 3 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 4 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 5 张金凤, 王强, 赵永德, 孙凤梅, 孙丰润. 莪术体外抑制成纤维细胞生长的初步研究. *滨州医学院学报* 1997; 20: 113-114
- 6 刘迟, 郭刚, 胡仲仪. 莪术对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响. *上海中医药杂志* 2006; 40: 71-73
- 7 袁柱婷, 单长民, 姜学连, 栾希英, 李珂珂. 三棱、莪术抗大鼠免疫性肝纤维化研究. *中国中药杂志* 2002; 27: 929-932
- 8 杨玲, 钱伟, 侯晓华, 徐可树, 汪建平. 莪术提取物对肝纤维化大鼠血管紧张素 II 及其 I 型受体的影响. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 303-305
- 9 徐英辉, 董斌, 罗其中, 周洪语, 贾宜昌, 杨友峰, 王以政. 榄香烯对大鼠胶质瘤C6细胞Bcl-2家族基因及蛋白表达的影响. *中华医学杂志* 2005; 85: 1700-1703
- 10 李传刚, 李墨林, 舒晓宏, 刘用楫, 杨春明. β -榄香烯对人膀胱癌BIU-87细胞磷脂代谢转换率及细胞脂膜流动性的影响. *中华医学杂志* 2004; 84: 416-417
- 11 周洪语, 路丽明, 王勇, 江基尧, 罗其中. 榄香烯抑制脑胶质瘤细胞增殖的比较研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 1241-1243
- 12 袁静, 顾振纶, 周文轩, 郭次仪. 榄香烯诱导人白血病K562细胞凋亡. *中国药理学通报* 1998; 14: 410-412
- 13 陆群, 朱路佳, 谢梅林, 顾振纶. β -榄香烯抑制大鼠血栓形成及其机理研究. *中国现代应用药学杂志* 1999; 16: 13-16
- 14 肖东, 朱路佳, 陈星织, 董宁征, 顾振纶. β -榄香烯对大鼠血液流变学的影响. *苏州医学院学报* 1997; 17: 833-835
- 15 杨玲, 钱伟, 侯晓华. β -榄香烯对肝星状细胞周期及凋亡的影响. *中华消化杂志* 2006; 28: 555-556
- 16 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 327-328
- 17 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2000: 230
- 18 姚淑娟, 刘伯阳, 钟照华. 榄香烯抗肝癌作用的实验研究. *齐齐哈尔医学院学报* 2006; 27: 257-258
- 19 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-249
- 20 Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-77
- 21 刘学松, 李定国, 陆汉明. 肝细胞的胶原合成与肝纤维化. *中华消化杂志* 1994; 14: 53-54
- 22 李文才, 张锦生, 李华, 张秀荣, 张月娥. 肝组织羟脯氨酸含量测定方法的优化. *上海医科大学学报* 2000; 27: 295-297

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 2007-04-28)

趋化性细胞因子受体CXCR4基因沉默对大肠癌细胞体外侵袭及增殖能力的影响

张孟贤, 韩娜, 冷彦

张孟贤, 韩娜, 冷彦, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科 湖北省武汉市 430030

张孟贤, 2001年华中科技大学同济医学院硕士研究生毕业, 2005年获博士学位, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的侵袭和转移研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570961

通讯作者: 冷彦, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科. yan_leng@126.com
电话: 027-83663360

收稿日期: 2007-01-28 接受日期: 2007-02-09

Effect of specific suppression of chemokine receptor CXCR4 by short interference RNA on the invasion capability and proliferation of colorectal cancer cells

Meng-Xian Zhang, Na Han, Yan Leng

Meng-Xian Zhang, Na Han, Yan Leng, Department of Oncology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30570961

Correspondence to: Yan Leng, Department of Oncology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yan_leng@126.com
Received: 2007-01-28 Accepted: 2007-02-09

Abstract

AIM: To study the inhibitory effect of chemokine receptor CXCR4 short interference RNA (siRNA) on the invasion capability and proliferation of colorectal cancer cell line SW480.

METHODS: SiRNA specifically targeting CXCR4 chemokine receptor CXCR4 was designed *in vitro* using T7 RNA polymerase. Colorectal cancer SW480 cells were cultured under standard condition and the siRNA was transfected into SW480 cells with Lipofectamine 2000. Negative control and mock control were used at the same time. The levels of CXCR4 mRNA and protein were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western

blotting 48 h after transfection respectively. The changes of invasion capability and MT1-MMP protein in SW480 cells were evaluated using Boyden Chamber invasion assay and Western blotting respectively. The cell cycle distribution and proliferation status were detected by flow cytometry and MTT assay respectively.

RESULTS: Forty-eight hours after transfection with CXCR4 siRNA, in comparison with those in negative and mock control group, the levels of CXCR4 mRNA ($51.53\% \pm 6.1\%$ vs $78.4\% \pm 3.3\%$, $P < 0.01$; $51.53\% \pm 6.1\%$ vs $87.4\% \pm 5.3\%$, $P < 0.01$) and protein ($47.3\% \pm 3.7\%$ vs $107.2\% \pm 3.6\%$, $P < 0.01$; $47.3\% \pm 3.7\%$ vs $114.7\% \pm 4.8\%$, $P < 0.01$) decreased significantly ($47.3\% \pm 3.7\%$ vs $107.2\% \pm 3.6\%$, $P < 0.01$; $47.3\% \pm 3.7\%$ vs $114.7\% \pm 4.8\%$, $P < 0.01$); the invasion capability ($26.5\% \pm 6.1\%$ vs $73.7\% \pm 3.4\%$, $P < 0.01$; $26.5\% \pm 6.1\%$ vs $64.5\% \pm 5.7\%$, $P < 0.01$) and the MT1-MMP protein expression ($43.8\% \pm 2.5\%$ vs $64.4\% \pm 4.4\%$, $P < 0.01$; $43.8\% \pm 2.5\%$ vs $67.0\% \pm 2.9\%$, $P < 0.01$) in SW480 cells decreased significantly, but the cell cycle distribution didn't change remarkably. At the absence of SDF-1, cell proliferation status was similar to that in control and mock control group. After stimulation by SDF-1, the proliferation of SW480 cells increased in all the groups, but it was much less active in the CXCR4 siRNA group than in the other two control groups.

CONCLUSION: CXCR4 siRNA can inhibit the expression of CXCR4 and decrease the invasion capability and proliferation of SW480 cells.

Key Words: Chemokine receptor CXCR4; Short interference RNA; Colorectal cancer; Invasion; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blotting; Boyden Chamber invasion assay; Flow cytometry; MTT assay

Zhang MX, Han N, Leng Y. Effect of specific suppression of chemokine receptor CXCR4 by short interference RNA on the invasion capability and proliferation of colorectal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1331-1337

■背景资料

恶性肿瘤侵袭和转移是一个多阶段多步骤的复杂过程,是恶性肿瘤的本质表型,也是当前研究的热点,但其具体机制尚不清楚。最新研究表明,趋化性细胞因子及其受体的相互作用可能在癌症的侵袭和转移过程中起着关键作用,其中最令人瞩目的是趋化性细胞因子受体CXCR4与其配体CXCL12的相互作用与多种癌症侵袭和转移密切相关。

■研发前沿

在前期的研究工作中,本课题组也发现CXCR4在大肠癌和肺癌组织中选择性高表达,并且与淋巴结受累、复发转移、生存时间密切相关,提示如果采取分子干预手段阻断SDF-1/CXCR4生物轴功能,可能抑制肿瘤细胞的侵袭和转移潜能,为控制和预防恶性肿瘤的侵袭和转移提供靶点。

摘要

目的: 研究趋化性细胞因子受体CXCR4短干扰RNA (siRNA)对大肠癌细胞系体外侵袭及增殖能力的影响。

方法: 利用T7 RNA聚合酶体外合成以CXCR4为靶基因的siRNA,用脂质体转染大肠癌SW480细胞,同时设立空白对照组和无关对照组。于转染后48 h采用RT-PCR方法检测CXCR4 mRNA水平,免疫印迹方法检测CXCR4和MT1-MMP的蛋白质水平,Boyden小室模型检测体外侵袭能力的变化,流式细胞术检测细胞周期的分布情况,MTT法测定细胞增殖状况。

结果: SW480细胞转染CXCR4 siRNA 48 h后,与空白对照和无关对照相比, CXCR4 mRNA水平明显下调($51.53\% \pm 6.1\%$ vs $78.4\% \pm 3.3\%$, $P < 0.01$; $51.53\% \pm 6.1\%$ vs $87.4\% \pm 5.3\%$, $P < 0.01$), CXCR4的蛋白质水平明显降低($47.3\% \pm 3.7\%$ vs $107.2\% \pm 3.6\%$, $P < 0.01$; $47.3\% \pm 3.7\%$ vs $114.7\% \pm 4.8\%$, $P < 0.01$), MT1-MMP蛋白表达水平也明显下降($43.8\% \pm 2.5\%$ vs $64.4\% \pm 4.4\%$, $P < 0.01$; $43.8\% \pm 2.5\%$ vs $67.0\% \pm 2.9\%$, $P < 0.01$), 细胞的体外侵袭能力减弱($26.5\% \pm 6.1\%$ vs $73.7\% \pm 3.4\%$, $P < 0.01$; $26.5\% \pm 6.1\%$ vs $64.5\% \pm 5.7\%$, $P < 0.01$), 细胞周期的分布无明显差异。在无SDF-1存在的情况下,各组细胞的增殖无明显改变;经SDF-1刺激后,各组细胞增殖增加,但CXCR4 siRNA转染组细胞的增殖显著低于空白对照组和无关对照组(24 h: 0.55 ± 0.03 vs 0.68 ± 0.06 , 0.71 ± 0.04 , $P < 0.05$; 48 h: 0.67 ± 0.04 vs 0.89 ± 0.03 , 0.94 ± 0.07 , $P < 0.05$; 72 h: 0.72 ± 0.06 vs 1.36 ± 0.08 , 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$)。以上各指标在空白对照和无关对照之间无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 以CXCR4为靶向的siRNA能够有效下调CXCR4基因,降低SDF-1诱导的大肠癌细胞系体外侵袭能力及增殖活性。

关键词: CXCR4基因; 短干扰RNA; 结直肠癌; 侵袭; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹技术; Boyden小室模型; 流式细胞术; MTT法

张孟贤, 韩娜, 冷彦. 趋化性细胞因子受体CXCR4基因沉默对大肠癌细胞体外侵袭及增殖能力的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1331-1337

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1331.asp>

0 引言

侵袭和转移是恶性肿瘤的本质特征,也是导致治疗失败的主要原因,现代分子生物学研究揭示,恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多阶段、多步骤的复杂过程,受许多基因的共同调控,导致其表达产物的改变,由此影响肿瘤细胞的生物学行为。其中,趋化性细胞因子及其受体参与癌症侵袭和转移的多个关键环节。在纷繁复杂的趋化性细胞因子网络系统中, CXCL12/CXCR4作为少数之一具有点对点精确传导生物信息的生物轴系统,很快引起了一些学者的重视。近年来不少研究指出, CXCL12/CXCR4生物轴在多种肿瘤的侵袭和转移中发挥着重要作用。为研究CXCR4对大肠细胞侵袭力及增殖的影响,本实验通过设计合成以CXCR4为靶点的siRNA,利用脂质体转染人大肠癌SW480细胞系,特异性抑制CXCR4基因表达,检测转染siRNA细胞体外侵袭及增殖能力的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌细胞系SW480购自中国典型培养物保藏中心。RPMI1640培养基(Gibco/BRL公司),小牛血清(Hyclone), RNAi试剂 Silencer siRNA construction KIT(Ambion公司), Lipofectamine™ 2000脂质体(Invitrogen公司), MMLV逆转录酶(Promega公司), 兔抗人CXCR4 mAb(R&D), HRP标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz), ECL(Enhanced Chemical luminescence)显色试剂盒(晶美生物), BCA蛋白测定试剂盒(Pierce公司), MTT, 碘化吡啶PI(Sigma公司)。

大肠癌细胞系SW480细胞用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液,在37℃, 50 mL/L CO₂孵育箱中培养。每3天更换培养液,按1:3传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.2 方法

1.2.1 CXCR4 siRNA的制备 根据Elbashir *et al* siRNA的设计原则设计针对CXCR4 cDNA (accession no.NM_003467)符合特征的靶序列。同时设计无关对照序列(GC含量与靶序列相同)。靶序列: 5'-AAGGAACCCTGTTTCCGTGAA-3', 无关序列: 5'-AACCGGATGTCGAGAACTTCA-3'。根据靶序列设计靶序列siRNA模板DNA, 反义链为靶序列, 正义链为靶序列的互补序列, 3'端加T7启动子的引物序列CCTGTCTC。正义链(S1): 5'-AATTCACGGAAACAGGGTTCCCTT

GTCTC-3'; 反义链(A1): 5'-AAGGAACCCTGTT TCCGTGAACCTGTCTC-3'. 同样方法设计无关序列siRNA模板DNA. 正义链(S2): 5'-AATGAA GTTCTCGACATCCGGCCTGTCTC-3'; 反义链(A2): 5'-AACCGGATGTGCGAGAACTTCACCTG TCTC-3'. 按试剂盒操作说明取等摩尔浓度的A1和S1(或A2和S2)和T7启动子混合(70℃加热混合物5 min, 室温下放置5 min), T7启动子和DNA引导序列退火结合, 然后用DNA聚合酶Klenow大片段补齐成为可用于转录的双链DNA模板, 分别用T7 RNA聚合酶进行体外转录, 再将产物混合37℃水浴箱持续孵育过夜, 形成双链RNA. 以DNA酶降解模板同时用单链专一的核糖核酸酶(RNase)消化5'的引导序列, 由于RNase不能切开U碱基也不能降解双链RNA, 所以得到的产物就是所需的21 bp的双链siRNA有19对碱基互补, 3'端各有2个U突出. 按试剂盒操作说明进行纯化, 得到的siRNA用去核酸酶的水溶解, 紫外分光光度计定量, -20℃保存备用.

1.2.2 细胞分组和转染 取对数生长期SW480细胞接种于6孔板(5×10^5 /孔), 培养细胞至密度为50%. 转染siRNA的浓度为80 nmol/L. 实验分为3组: A组: 只加脂质体(空白对照组, control); B组: 转染无关siRNA(无关对照组, mock control); C组: CXCR4 siRNA干预组. 利用Lipofectamine2000将siRNA转染SW480细胞的实验方法参考说明书进行, 简要步骤如下: 转染前24 h将6孔板每孔加入无抗生素的DMEM培养基2 mL. 往每孔中加入siRNA-Lipofectamine2000混合液500 μ L, 轻轻混匀. 在37℃, 50 mL/L CO₂孵育箱中培养48 h.

1.2.3 RT-PCR 细胞转染48 h后收集细胞, 按TRIzol说明书操作提取细胞总RNA, 用于扩增人CXCR4 cDNA. PCR引物(上海博亚公司合成)序列如下: CXCR4上游序列: 5'-CGGAATTCAGCAGGTAGCAAAGTGACG-3', 下游序列: 5'-GACGCCAACATAGACCACCT-3'. 同时以人GAPDH为内参照, 引物的上游序列: 5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3', 下游序列: 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'. PCR扩增条件如下: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 35个循环; 72℃延伸10 min. CXCR4和GAPDH的PCR片段大小为561 bp和250 bp. PCR产物采用图像扫描仪拍照并进行条带灰度分析, 以CXCR4/GAPDH的比值代表其相对含量.

1.2.4 Western blotting分析 CXCR4蛋白检测: 细

胞转染48 h后收集细胞, 加入细胞裂解液, 提取细胞总蛋白, 用BCA试剂盒检测蛋白质浓度, 灌制100 g/L SDS-PAGE凝胶, 每孔上样50 μ g, 经电泳, 转膜, 封闭, 依次与CXCR4抗体(1:200)及辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500)反应1 h, 化学发光法(ECL)曝光显影, 冲洗胶片, 用密度扫描仪测定条带的光密度值(A值), β -actin为内参. MT1-MMP蛋白检测: 以上各组细胞分别与含和不含SDF-1(100 μ g/L)的培养液孵育2 h后, 洗涤细胞, 加入细胞裂解液, 提取细胞总蛋白, 同上述方法检测MT1-MMP蛋白水平, 一抗为兔抗人MT1-MMP单抗(1:100).

1.2.5 体外趋化侵袭实验 用24孔Boyden趋化小室(8 μ m; Becton Dickinson), 按照说明书方法进行. 简要步骤如下: 收获转染48 h后的各实验组细胞, 用无血清培养基悬浮, 将0.2 mL细胞悬液(1×10^4)加入上室内, 将含诱引剂SDF-1的趋化上清(RPMI1640+5 g/L BSA+100 μ g/L SDF-1)加入下室, 每组设3个复孔. 在37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养24 h. 取出膜, 用棉拭子去除上室底部基质胶并移除未侵袭细胞, 甲醇固定, HE染色, 光学显微镜下观察迁移至膜上的细胞, 每孔计数5个高倍视野($\times 100$)的细胞数.

1.2.6 流式细胞检测 细胞转染48 h后回收各实验组细胞, 胰酶消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^8 /L, PBS充分洗涤, 800 mL/L冰乙醇固定, 加入终浓度为100 mg/L的Rnase A 10 μ L, 37℃水浴30 min后移入冰浴中停止酶反应, 再加入终浓度为5 mg/L的PI染色剂10 μ L, 4℃避光保存, 孵育过夜, 美国Becton-Dicknson公司的FACSsort型流式细胞仪检测和细胞周期的分布. 数据获取用CELLQuest软件, 分析细胞周期用ModFit2.0.

1.2.7 MTT分析 收获转染48 h后的各实验组细胞, 按 10^4 /孔分别接种于96孔培养板, 每组细胞分别加入含诱引剂SDF-1的趋化上清(RPMI1640+5 g/L BSA+100 μ g/L SDF-1)和空白对照液(RPMI1640+5 g/L BSA). 分别于24, 48和72 h, 各孔加入MTT溶液(5 g/L) 20 μ L, 孵育4 h, 吸弃孔内培养液, 加入DMSO 150 μ L, 充分溶解结晶物, 读取各孔光吸收值(490 nm波长). 每组设3个平行样本, 取各组值的均数表示细胞的增殖情况.

统计学处理 采用Windows SPSS10.0软件进行t检验, 数据以均数 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义.

■创新盘点

实验通过体外合成以CXCR4为靶基因的SiRNA, 用脂质体转染大肠癌SW480细胞, 不仅检测癌细胞体外侵袭力的改变, 也检测了对细胞周期和增殖活性的影响, 同时也初步探讨了MT-MMP1在SDF-1/CXCR4生物轴介导的大肠癌侵袭和转移中的可能作用.

■应用要点

研究表明, SDF-1/CXCR4生物轴参与大肠癌的侵袭和转移, 具有体外促增殖作用. 抑制大肠癌细胞CXCR4基因的表达, 能够显著降低大肠癌细胞体外侵袭能力及增殖活性. SDF-1/CXCR4生物轴有望成为预防和治疗大肠癌侵袭和转移的重要靶点之一.

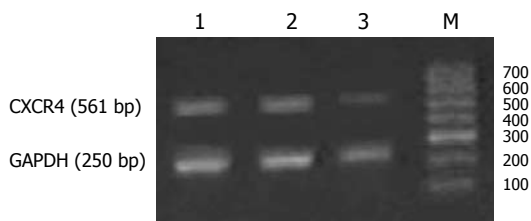


图1 RT-PCR检测癌细胞CXCR4 mRNA表达. 1: control; 2: mock control; 3: CXCR4 siRNA; 4: PCR Marker.

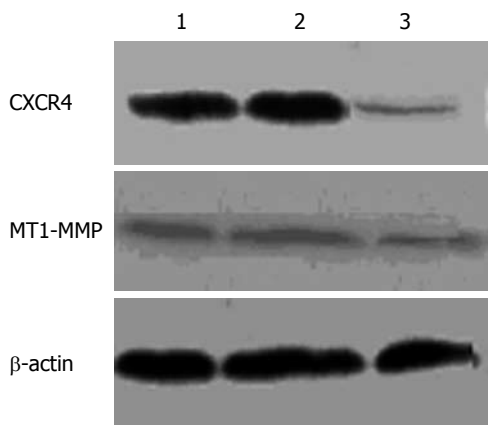


图2 Western blotting检测癌细胞CXCR4和MT1-MMP蛋白表达. 1: control; 2: mock control; 3: CXCR4 siRNA.

2 结果

2.1 siRNA对SW480细胞CXCR4基因mRNA及蛋白质的影响 为明确siRNA转染对靶基因CXCR4的影响, 我们进行RT-PCR和Western blot检测. RT-PCR结果表明: CXCR4 siRNA转染SW480细胞48 h后, CXCR4基因mRNA水平明显下调, 与空白对照组(control)和无关对照组(mock control)比较差异有显著性意义($51.53\% \pm 6.1\%$ vs $78.4\% \pm 3.3\%$, $P < 0.01$; $51.53\% \pm 6.1\%$ vs $87.4\% \pm 5.3\%$, $P < 0.01$), 而mock siRNA不引起靶基因mRNA水平的明显变化($87.4\% \pm 5.3\%$ vs $78.4\% \pm 3.3\%$, $P > 0.05$)(图1). Western blotting检测也得出类似结果: CXCR4 siRNA转染SW480细胞48 h后, CXCR4蛋白表达水平较空白对照组和无关对照组明显下降($47.3\% \pm 3.7\%$ vs $107.2\% \pm 3.6\%$, $P < 0.01$; $47.3\% \pm 3.7\%$ vs $114.7\% \pm 4.8\%$, $P < 0.01$), 空白对照组和无关对照组间无明显差异($P > 0.05$)(图2).

2.2 siRNA对SW480细胞体外侵袭能力的影响 为了解CXCR4基因表达下调对大肠癌细胞体外侵袭能力的影响, 我们采用体外趋化侵袭实验. 结果发现转染CXCR4 siRNA 48 h后, SW480大肠癌细胞的穿膜细胞数较空白对照组和无

表1 转染48 h后3组细胞的细胞周期分布(mean \pm SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
control	62.73 \pm 2.19	19.23 \pm 2.53	18.04 \pm 1.97
mock control	54.32 \pm 4.07	22.05 \pm 3.26	13.63 \pm 1.63
CXCR4 siRNA	60.82 \pm 5.01	17.71 \pm 1.27	21.47 \pm 2.34

关对照组明显减少($26.5\% \pm 6.1\%$ vs $73.7\% \pm 3.4\%$, $P < 0.01$; $26.5\% \pm 6.1\%$ vs $64.5\% \pm 5.7\%$, $P < 0.01$), 空白对照组和无关对照组间无明显差异($P > 0.05$).

2.3 siRNA对SW480细胞MT1-MMP表达的影响 为初步探讨CXCR4调控大肠癌细胞体外侵袭力的可能机制, 采用Western blotting方法检测siRNA转染对MT1-MMP表达水平的影响. 结果发现转染CXCR4 siRNA 48 h后, MT1-MMP蛋白表达较空白对照组和无关对照组明显降低($43.8\% \pm 2.5\%$ vs $64.4\% \pm 4.4\%$, $P < 0.01$; $43.8\% \pm 2.5\%$ vs $67.0\% \pm 2.9\%$, $P < 0.01$), 空白对照组和无关对照组间无明显差异($P > 0.05$)(图2).

2.4 siRNA对SW480细胞周期的影响 转染CXCR4 siRNA 48 h后, SW480大肠癌细胞各时相的细胞比例与空白对照组和无关对照组无明显差异. 经 t 检验, P 值均 > 0.05 , 差异无显著性意义(表1).

2.5 siRNA对SDF-1诱导细胞增殖的影响 经MMT方法检测, 结果发现, 转染CXCR4 siRNA后, 未经SDF-1刺激的SW480细胞的增殖状况与空白对照和无关对照无明显差别; 经SDF-1刺激后24-72 h后, 各组细胞的增殖都有所增加, 但CXCR4 siRNA转染组的增殖明显低于空白对照组和无关对照组(24 h: 0.55 ± 0.03 vs 0.68 ± 0.06 , $P < 0.05$; 0.55 ± 0.03 vs 0.71 ± 0.04 , $P < 0.05$; 48 h: 0.67 ± 0.04 vs 0.89 ± 0.03 , $P < 0.05$; 0.67 ± 0.04 vs 0.94 ± 0.07 , $P < 0.05$; 72 h: 0.72 ± 0.06 vs 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$; 0.72 ± 0.06 vs 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$). 空白对照组和无关对照组间无明显差异($P > 0.05$)(图3).

3 讨论

恶性肿瘤的侵袭转移是多环节、多步骤且连续的复杂生物学过程, 涉及到细胞迁移的信号通路的调节失常, 肿瘤细胞与宿主细胞间相互作用等^[1-2]. 近年研究显示, 趋化性细胞因子和受体网络可能参与了肿瘤的侵袭和转移的多个关键环节^[3-4].

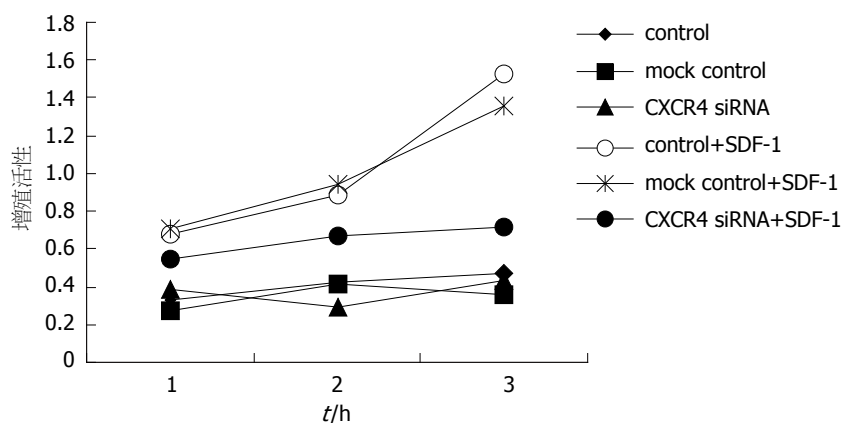


图 3 在有和无SDF-1刺激下各组细胞的增殖活性. 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h.

■名词解释

1 趋化性细胞因子: 趋化性细胞因子是不同类型细胞分泌的低分子量(8-10 kDa)的细胞因子, 他们对各种白细胞亚类, 如中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞具有趋化和预激活作用。

2 趋化性细胞因子受体: 是一类表达于不同类型细胞上的含有7个跨膜区的G蛋白偶联受体。趋化性细胞因子通过作用于趋化性细胞因子受体参与多种生理和病理过程, 如细胞的生长、发育、分化、凋亡等, 通过趋化吸引白细胞及调节其效应功能等参与免疫应答过程。

趋化性细胞因子受体CXCR4是趋化性细胞因子基质衍生因子SDF-1的专属受体。对于SDF-1/CXCR4信号系统的研究主要集中在免疫系统, 研究表明他在造血干细胞归巢、淋巴细胞迁移和HIV感染等方面发挥着重要作用^[5-6]。而近年研究发现, SDF-1/CXCR4轴在肿瘤细胞迁移、侵袭和转移过程中有着重要的作用^[7-10]。2001年Muller *et al*^[11]首先报道CXCR4在人类乳腺癌中高表达, 而CXCR4的特异性配体CXCL12(SDF-1)在乳腺癌容易发生转移的器官中高表达。如果用抗体体内中和CXCR4, 可以导致乳腺癌器官特异性转移潜能的明显下降。目前有越来越多的研究表明在人类多种肿瘤中存在CXCR4的选择性高表达, 包括卵巢癌^[12]、肺癌^[13]、黑色素瘤^[14]、食道癌^[15]等也存在着CXCR4的选择性表达。在前期的研究工作中, 我们也发现CXCR4在大肠癌和肺癌组织中选择性高表达, 并且与淋巴结受累、复发转移、生存时间密切相关^[16-17]。为进一步研究SDF-1/CXCR4生物轴是否介导大肠癌的侵袭和转移, 我们设计合成针对CXCR4的siRNA, 特异性下调大肠癌细胞CXCR4基因表达, 研究大肠癌细胞体外侵袭的改变及可能机制。

短干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)介导的RNA干扰(RNA interfering, RNAi), 为哺乳动物基因功能的研究提供了强大的工具^[18]。由于RNAi的关键效应分子就是siRNA, 因此要产生有效的RNAi效应关键是靶向基因如何设计及制备siRNA。本实验中, 我们根据Elbashir原则^[19], 设计针对CXCR4 cDNA(GenBank accession no.NM_003467)符合特征的靶序列。首先在GenBank中获取CXCR4 cDNA的全长序列, 然后利用Ambion公司提供的siRNA Target Finder在线工具搜索符合要求的靶序列, 同时设

计无关对照序列。

我们将体外转录合成的CXCR4 siRNA转染大肠癌SW480细胞后48 h, 采用RT-PCR和Western blotting方法分析靶基因CXCR4 mRNA及蛋白质水平的变化。结果表明CXCR4 siRNA能够有效降低CXCR4基因的表达。为了研究CXCR4 siRNA转染对大肠癌细胞体外侵袭力的影响, 我们采用Boyden小室体外侵袭实验。实验结果发现转染CXCR4 siRNA 48 h后, SW480细胞的穿膜细胞数较空白对照组和无关对照组明显减少。提示CXCR4 siRNA下调CXCR4基因的表达可以降低SW480细胞的体外侵袭力。这与Liang *et al*^[20]报道研究结果一致, 他们通过siRNA技术下调CXCR4的表达实现抑制乳腺癌细胞体外侵袭力的目的。

癌细胞发生侵袭时需要降解细胞外基质与基底膜, 此过程与MMPs作用密切相关^[21-23]。为探讨MMPs是否参与大肠癌细胞的体外侵袭过程, 我们用Western blotting方法检测了CXCR4 siRNA转染对MT1-MMP表达水平的影响。发现CXCR4 siRNA转染可以显著下调SW480细胞MT1-MMP的表达, 提示SDF-1/CXCR4生物轴可能通过MT1-MMP来调控大肠癌细胞的体外侵袭过程。MT1-MMP是细胞外基质蛋白降解机制的重要组成部分^[24], 也是MMP-2前体的激活剂, MT1-MMP表达于肺癌、乳腺癌和黑色素瘤等多种实体瘤中, 且其表达常常与肿瘤的侵袭相关^[25-28]。

SDF-1/CXCR4生物轴不仅参与调控肿瘤细胞的侵袭和转移, 可能还与肿瘤细胞的增殖密切相关^[29-30]。为进一步了解CXCR4的表达对大肠癌细胞增殖状况的影响, 我们对各组细胞进行流式细胞术及MTT检测。实验结果提示在没有配体SDF-1作用的情况下, CXCR4表达下调对SW480细胞的增殖状况无明显影响, 各时

同行评价

本文研究了趋化性细胞因子受体 CXCR4 基因沉默对大肠癌细胞体外侵袭及增殖能力的影响,反映了学科领域的前沿问题,科学性较强,有较高的学术价值。

相的细胞比例与空白对照组和无关对照组无明显差异。但经 SDF-1 作用后,转染 CXCR4 siRNA 的 SW480 细胞增殖活性明显下降,提示 SDF-1/CXCR4 生物轴在大肠癌细胞的增殖过程中可能也起着重要的作用。

总之,本实验通过合成针对 CXCR4 的 siRNA,有效抑制大肠癌细胞 CXCR4 基因的表达,显著降低大肠癌细胞体外侵袭能力及增殖活性。SDF-1/CXCR4 生物轴有望成为预防和治疗大肠癌侵袭和转移的重要靶点之一。

参考文献

- Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127: 679-695
- Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441: 444-450
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545
- Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2104-2119
- Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Kine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 455-461
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833
- Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 84-89
- Harvey JR, Mellor P, Eldaly H, Lennard TW, Kirby JA, Ali S. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1562-1570
- Zhang L, Yeger H, Das B, Irwin MS, Baruchel S. Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. *Neoplasia* 2007; 9: 36-46
- Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, Konig J, Rau B, Schilling M. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6627-6633
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56
- Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 226-233
- Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8273-8280
- Scala S, Giuliano P, Ascierto PA, Ierano C, Franco R, Napolitano M, Ottaiano A, Lombardi ML, Luongo M, Simeone E, Castiglia D, Mauro F, De Michele I, Calemme R, Botti G, Caraco C, Nicoletti G, Satriano RA, Castello G. Human melanoma metastases express functional CXCR4. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2427-2433
- Koishi K, Yoshikawa R, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T, Kojima S, Yanagi H, Yamamura T, Fujiwara Y. Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7585-7590
- 张孟贤, Kashif Iqbal, 于世英. 趋化性细胞因子受体 CXCR4 在大肠癌的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 772-776
- 张孟贤, 于世英, 夏曙. 趋化性细胞因子受体 CXCR4 与肺癌侵袭和转移的关系. *华中科技大学学报(医学版)* 2006; 35: 801-803
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 110-119
- 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
- Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 967-971
- Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 35-43
- Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34
- Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 119-135
- Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 624-632
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6322-6327
- Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96: 212-217
- Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003; 194: 1-11
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167: 769-781

- 29 Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5930-5938
- 30 Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 273-276

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 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

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

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

幽门螺杆菌BALB/c小鼠适应性菌株的驯化及模型建立

郭刚, 刘开云, 解庆华, 张卫军, 邹全明

■背景资料

幽门螺杆菌作为一种新发现的病原菌, 其致病性尚未完全阐明, 建立一个实用而稳定的动物感染模型将有助于对其开展深入研究。前期研究者在蒙古沙鼠模型中取得了较大突破, 但对于在免疫学研究中更有价值的小鼠模型因受到菌株的限制, 还不能有效推广, 需要进一步探索完善该模型。

■研发前沿

由于抗生素治疗幽门螺杆菌感染尚存在较多问题, 针对该菌的疫苗研究愈来愈受到关注, 而稳定的小鼠感染模型是一个技术瓶颈, 除了采用特定的BALB/c小鼠适应菌株SS1, 更多研究者通过筛选临床菌株和体内传代对幽门螺杆菌进行适应性驯化, 从而建立稳定的BALB/c小鼠模型。

郭刚, 刘开云, 解庆华, 张卫军, 邹全明, 第三军医大学临床微生物学及免疫学教研室 重庆市 400038
郭刚, 副教授, 博士, 主要从事病原细菌诊断方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30400019
通讯作者: 邹全明, 400038, 重庆市, 第三军医大学临床微生物及免疫学教研室. guog@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-68752315 传真: 023-68752315
收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-02-13

Establishment of a BALB/c mouse model infected steadily with *H pylori* through serial passages *in vivo*

Gang Guo, Kai-Yun Liu, Qing-Hua Xie, Wei-Jun Zhang, Quan-Ming Zou

Gang Guo, Kai-Yun Liu, Qing-Hua Xie, Wei-Jun Zhang, Quan-Ming Zou, Department of Clinical Microbiology and Immunology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30400019
Correspondence to: Dr. Quan-Ming Zou, Department of Clinical Microbiology and Immunology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. guog@mail.tmmu.com.cn
Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To increase the colonization ability of *H pylori* and establish a BALB/c mouse model infected steadily with *H pylori*.

METHODS: Mongolian gerbils-adaptive strain GS₁₀ of *H pylori* were inoculated into BALB/c mice and acclimated through serial passages *in vivo* for procuring an adaptive colonization of *H pylori* strain. After being infected for 4 weeks, all the animals were treated for microbiological examination, including culturing, smearing, urease test and polymerase chain reaction (PCR). The infectious rate of each group was calculated till the rate rose to 80%. Then, the gastric mucosal tissues were collected from the infected mice for quantitative analysis of *H pylori* and histological examination.

RESULTS: The proportion of BALB/c mice infected by *H pylori* increased gradually from

about 11.1% at the first infection to 80% after 6 passages *in vivo*. At the 4th week after BALB/c mice were infected with the adaptive strain BS₈ (strains after 8 passages), the colonization density in the gastric antrum, body and fundus of the infected mice, expressed by the common logarithm of colony forming unit per gram of tissue, was 5.03 ± 1.16 , 4.27 ± 0.93 and 0.72 ± 2.57 , respectively, which were similar to the colonization density (5.32 ± 0.88 , 4.14 ± 1.05 and 1.05 ± 2.25) in the mice infected with *H pylori* strain SS1 ($P > 0.05$). Infiltrations of polymorphonuclear leucocytes and mononuclear cells were observed in the lamina propria and submucosa of the stomach from the *H pylori*-infected mice. A great number of *H pylori* were also observed in the gastric mucus through microscopy.

CONCLUSION: *H pylori* with high colonization ability and infection rates are obtained, and a BALB/c mouse model infected steadily with *H pylori* is established successfully.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Animal model; Infection; BALB/c mouse; Adaptive strain

Guo G, Liu KY, Xie QH, Zhang WJ, Zou QM. Establishment of a BALB/c mouse model infected steadily with *H pylori* through serial passages *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1338-1341

摘要

目的: 通过体内连续传代获得幽门螺杆菌(*H pylori*)的BALB/c小鼠适应性定植菌株并建立稳定的感染模型。

方法: 以*H pylori*蒙古沙鼠适应株GS₁₀连续传代感染BALB/c小鼠, 每次感染20只, 感染后4 wk进行微生物学检查(分离培养、直接涂片染色镜检、快速尿素酶试验、PCR鉴定), 观察*H pylori*的定植情况, 计算每批动物的感染率, 直至感染率稳定在80%以上, 然后对已稳定感染的小鼠胃黏膜组织进行*H pylori*定量培养及病理学检查。

结果: 随着*H pylori*菌株GS₁₀在BALB/c小鼠内

的连续传代, 感染率逐渐升高. GS₁₀株初次感染率仅为11.1%, 传代至第6代(BS₆株)以后, 感染率稳定在80%以上; BALB/c小鼠适应株BS₈感染小鼠后4 wk在胃窦、胃体和胃底的定植密度(CFU/g组织)的常数对数均值分别为 5.32 ± 0.88 , 4.14 ± 1.05 和 1.05 ± 2.25 , 与SS1的定植密度相比, 相差不显著($P > 0.05$). 感染鼠病理学检查在胃窦黏膜上皮细胞间及固有层中发现大量炎症细胞浸润; 在胃窦及幽门部上皮细胞表层黏液、胃腺窝中见到大量*H pylori*存在.

结论: 经过连续传代感染, 驯化出一株高定植力和感染率的*H pylori* BALB/c小鼠适应株, 并成功建立稳定的*H pylori*小鼠感染模型.

关键词: 幽门螺杆菌; 动物模型; BALB/c小鼠; 感染; 适应性菌株

郭刚, 刘开云, 解庆华, 张卫军, 邹全明. 幽门螺杆菌BALB/c小鼠适应性菌株的驯化及模型建立. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1338-1341
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1338.asp>

0 引言

自1982年Marshall和Warren^[1]首次发现幽门螺杆菌(*H pylori*)以来, 建立稳定而实用的动物模型一直是*H pylori*研究者的目标. *H pylori*沙鼠模型由于其可产生与人相似的病理变化, 在*H pylori*致病机制和疫苗研究方面现示出极大的应用价值^[2-5]. 然而, 由于缺少针对沙鼠的免疫检测试剂, 该沙鼠模型在*H pylori*感染及免疫应答机制研究方面的应用受到了极大的限制. 国内外虽有报道建立了小鼠感染模型^[6-9], 但必须采用特定的*H pylori*菌株, 如Sydney Strain1(SS1). 我们在已建立的沙鼠模型基础上^[10-11], 将*H pylori*沙鼠适应株通过小鼠体内的连续传代, 驯育BALB/c小鼠的*H pylori*适应性定植菌株并建立稳定的BALB/c小鼠模型, 为进一步研究*H pylori*感染与免疫应答机制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ BALB/c小鼠180只, 体质量22-25 g, 由第三军医大学试验动物中心提供. *H pylori*沙鼠适应性菌株GS₁₀由本室驯化所得, 该菌株对沙鼠的感染率>90%. *H pylori* BALB/c小鼠适应株SS1由澳大利亚University of New South Wales的Lee A教授惠赠, 本室保存.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*的培养和灌喂 *H pylori*菌株GS₁₀采

用本室改良的液体培养方法^[12]培养, 调整菌液浓度约为 10^{12} CFU/L, 用 ϕ 0.9 mm \times L 70 mm可曲导管灌喂断食水24 h的BALB/c小鼠, 0.5 mL菌液/只, 上、下午各1次, 末次后2 h供水.

1.2.2 *H pylori*小鼠体内的传代 用GS₁₀株感染20只BALB/c小鼠, 4 wk后处死, 采集胃黏膜组织, 一半胃黏膜组织涂布脑心浸液血琼脂平板, 微需氧培养3-5 d, 观察有无*H pylori*生长; 一半胃黏膜作直接涂片镜检、PCR鉴定和快速尿素酶试验. 其中分离培养阳性或后三项中任两项阳性判断为感染成功. 计算感染率(感染鼠数量/存活鼠数量). 选择平板上*H pylori*菌落数最多的分离菌株作为第一代适应株BS₁; 采用相同方法用BS₁再去感染下一批20只BALB/c小鼠, 获得第二代适应株BS₂; 如此重复进行, 直至*H pylori*在小鼠体内感染率稳定在80%以上.

1.2.3 定量培养及病理学检查 SS1感染及BS株感染稳定后各取10只感染小鼠处死, 取一半胃组织, 在胃窦、胃体和胃底部各剪取3块黏膜组织, 约50 mg/块, 称量后, 匀浆, 然后取匀浆液作10倍系列稀释, 每个稀释度取50 μ L均匀涂布于*H pylori*平板培养, 计算每克胃组织中的活菌数(CFU), 定植密度以lg CFU/g组织表示; 另一半黏膜组织经福尔马林常规固定, 石蜡包埋, 连续垂直切片, 作HE染色镜检.

2 结果

2.1 *H pylori*菌株在小鼠体内的传代定植结果 *H pylori*沙鼠适应性菌株GS₁₀初次感染BALB/c小鼠20只, 最终检测的18只小鼠中只有2只成功定植, 从2只感染BALB/c小鼠胃内分离培养出*H pylori*菌, 我们将其中克隆数较多的一株确定为适应株1, 命名为BS₁, 随着BS₁在沙鼠体内的连续传代, 感染率逐渐升高, 传代至第6代(BS₆)以后, 感染率稳定在80%以上, 与标准菌株SS1感染率接近(表1).

2.2 *H pylori*在感染小鼠胃内的分布和定植密度 *H pylori* BALB/c小鼠适应株BS₈感染小鼠后4 wk在胃窦、胃体和胃底的定植密度对数均值分别为 5.03 ± 1.16 , 4.27 ± 0.93 和 0.72 ± 2.57 , 与SS1的定植密度相比, 相差不显著($P > 0.05$, 图1). 结果表明, 此*H pylori*菌株在胃内定植稳定, 且主要定植于胃窦和胃体部, 胃底部定植较少.

2.3 病理组织学检查结果 病理学检查在胃窦黏膜上皮细胞间及固有层中发现大量炎症细胞浸润, 黏膜下层血管扩张、充血, 与感染沙鼠后不

■ 相关报道

国内外建立比较稳定的*H pylori*感染模型均是通过长期体内驯化适应菌株来完成, 如Lee建立BALB/c小鼠模型, 通过传代获得SS1适应株; Akopyants在悉生乳猪体内连续感染12代, 获得了100%的感染率; Bleich通过连续感染使原本较低感染力的*H pylori*菌株定植力提高.

■ 创新盘点

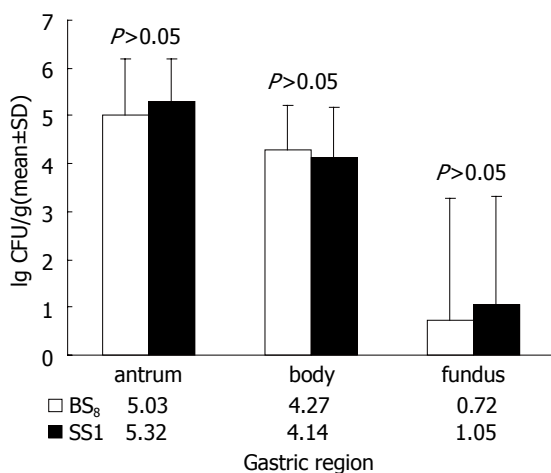
本研究首次采用一株幽门螺杆菌的蒙古沙鼠适应性菌株在BALB/c小鼠体内进行连续传代感染, 使其适应性定植于BALB/c小鼠. 不仅具有稳定的感染率, 而且与SS1株相比, 在小鼠胃内的定植力也无差异.

■应用要点

此模型的成功建立,对于研究幽门螺杆菌疫苗以及黏膜免疫应答机制将提供较好的技术支持,对于研究该菌的适应性变异也具有一定的理论价值。

表 1 *H pylori*沙鼠适应性菌株GS₁₀感染BALB/c小鼠连续传代定植结果

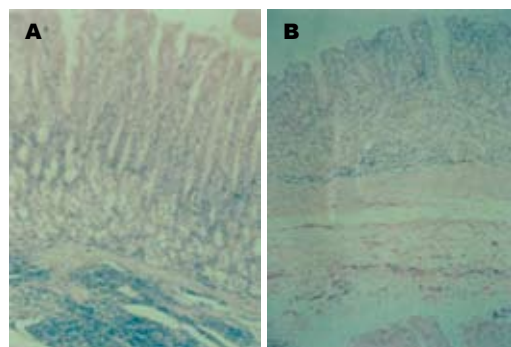
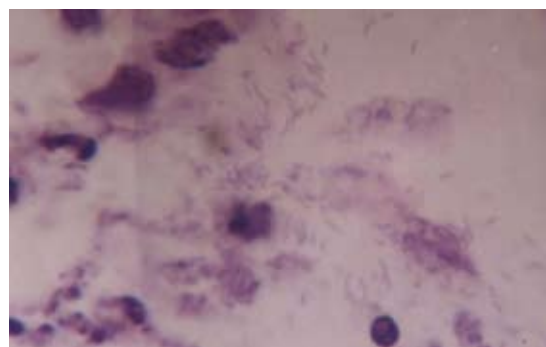
菌株	试验小鼠(n)	培养阳性(n)	镜检阳性(n)	脲酶阳性(n)	PCR阳性(n)	感染率(%) (感染数/存活数)
BS ₁	18	2	1	2	1	11.1 (2/18)
BS ₂	19	7	6	9	5	42.1 (8/19)
BS ₃	19	7	4	9	6	36.8 (7/19)
BS ₄	20	10	6	11	9	55.0 (11/20)
BS ₅	20	14	10	15	13	70.0 (14/20)
BS ₆	20	15	12	14	16	80.0 (16/20)
BS ₇	18	14	13	15	13	88.9 (16/18)
BS ₈	19	14	14	19	15	84.2 (16/19)
SS1	19	15	12	16	17	89.5 (17/19)

图 1 *H pylori* BALB/c小鼠适应株BS₈及标准株SS1定植小鼠后在胃内的分布和密度。

同,在小鼠中未见淋巴滤泡(图2);病理切片用油镜观察,在胃窦及幽门部上皮细胞表层黏液、胃腺窝中见到大量*H pylori*存在(图3)。

3 讨论

对于感染性疾病来说,建立一个相适应的动物模型是研究该疾病病原致病力、发病机制和研究开发抗菌药物与疫苗的重要手段。自1996年Hirayama *et al*^[13]报道了*H pylori*感染沙鼠致胃炎、胃溃疡的动物实验以来,人们发现采用人源性*H pylori*分离株感染沙鼠较感染其他动物更易成功,是目前研究*H pylori*致病因子与致病机制最佳的动物模型^[14-16]。我室在前期经过摸索已成功建立起该感染模型。然而,由于缺少针对该动物的检测试剂,蒙古沙鼠模型在研究*H pylori*免疫应答机制方面受到较大限制。作为较通用的一种实验动物,BALB/c小鼠一直是*H pylori*研究者希望攻克的感染模型^[17-19]。考虑到国内外建立比较稳定的*H pylori*感染模型均

图 2 BALB/c小鼠感染*H pylori*后胃黏膜的炎症反应(HE × 100)。A: 黏膜固有层出现大量炎症细胞浸润; B: 正常胃黏膜组织。图 3 BALB/c小鼠感染*H pylori*后胃黏膜表面见大量*H pylori*细菌(HE × 1000)。

是通过长期体内驯化适应菌株来完成,如Lee建立BALB/c小鼠模型,通过传代获得SS1适应株^[6],Akopyants *et al*^[20]在悉生乳猪体内连续感染12代,才获得100%的感染率和>10⁷ CFU/g组织的定植力,Bleich *et al*^[21]通过连续感染蒙古沙鼠使*H pylori*定植力提高,因此,本课题也对*H pylori*沙鼠适应株进行了BALB/c小鼠体内的连续传代感染,以获得稳定的沙鼠模型和高感染力的适应性菌株。从试验结果看,我们经过6代的连续

■名词解释

适应性菌株:即为通过理化或生物学诱导方式使细菌为适应生存环境而发生某种基因组或蛋白质层面的适应性改变。本文中即指通过体内传代,逐渐适应性定植于小鼠胃内的幽门螺杆菌菌株。

感染后, 感染率可稳定在80%以上, 虽然引起的病理学改变不及感染沙鼠的病理学变化, 但仍然可见到明显的炎症细胞浸润及血管扩张、充血等病理改变, 说明采用驯化的*H pylori*适应菌株可建立起稳定的BALB/c小鼠感染模型。

随着弱定植力菌株在BALB/c小鼠体内传代的进行, 感染力呈稳步上升, 那么*H pylori*菌株在从不适应到逐渐产生适应性这一过程中是否发生了某种变化? 是基因还是蛋白水平的变化? 对这些变化的研究也许会有助于阐明*H pylori*的生理适应性机制及定植机制。

4 参考文献

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- 迟晶, 傅宝玉, 宋敏, 展广智, 吴利波, 服部隆则. 砂土鼠胃黏膜幽门螺杆菌长期感染的病理改变. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 415-417
- Kodama M, Murakami K, Sato R, Okimoto T, Nishizono A, Fujioka T. Helicobacter pylori-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7063-7071
- Sun YQ, Petersson F, Monstein HJ, Soderholm JD, Rehfeld JF, Borch K. Long-term morpho-functional development of Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1157-1167
- Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 51-65
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997; 112: 1386-1397
- 田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕. C₅₇BL/6小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1313-1316
- Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, Mitchell H, Lee A. Chronic Helicobacter pylori infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun* 2004; 72: 4668-4679
- Pantheil K, Faller G, Haas R. Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with Helicobacter pylori: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infect Immun* 2003; 71: 794-800
- 郭刚, 王毅超, 刘开云, 解庆华, 张卫军, 邹全明. 蒙古沙鼠感染幽门螺杆菌后的胃部病理学变化研究. *中国人兽共患病杂志* 2002; 18: 25-26, 47
- 郭刚, 王毅超, 邹全明, 刘开云, 解庆华, 张卫军. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙鼠模型的建立. *中华微生物学和免疫学杂志* 2001; 21: 683-684
- 郭刚, 邹全明, 张卫军, 解庆华. 一种改良幽门螺杆菌液体培养方法. *第三军医大学学报* 1999; 21: 124-126
- Hirayama F, Takagi S, Kusuhabara H, Iwao E, Yokoyama Y, Ikeda Y. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *J Gastroenterol* 1996; 31: 755-757
- Tatematsu M, Tsukamoto T, Toyoda T. Effects of eradication of Helicobacter pylori on gastric carcinogenesis in experimental models. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 7-9
- Otaka M, Konishi N, Odashima M, Jin M, Wada I, Matsushashi T, Horikawa Y, Ohba R, Watanabe S. Is Mongolian gerbil really adequate host animal for study of Helicobacter pylori infection-induced gastritis and cancer? *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 297-300
- Elfvin A, Bolin I, Von Bothmer C, Stolte M, Watanabe H, Fandriks L, Vieth M. Helicobacter pylori induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1313-1320
- Zavala-Spinetti L, Breslin MB, Correa H, Begue RE. Development and evaluation of a DNA vaccine based on Helicobacter pylori urease B: failure to prevent experimental infection in the mouse model. *Helicobacter* 2006; 11: 517-522
- Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of Helicobacter pylori infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003; 111: 514-522
- Rabelo-Goncalves EM, Nishimura NF, Zeitune JM. Development of a BALB/c mouse model of Helicobacter pylori infection with fresh and frozen bacteria. *Biol Res* 2005; 38: 101-109
- Akopyants NS, Eaton KA, Berg DE. Adaptive mutation and cocolonization during Helicobacter pylori infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1995; 63: 116-121
- Bleich A, Kohn I, Glage S, Beil W, Wagner S, Mahler M. Multiple in vivo passages enhance the ability of a clinical Helicobacter pylori isolate to colonize the stomach of Mongolian gerbils and to induce gastritis. *Lab Anim* 2005; 39: 221-229

■同行评价

本文研究了幽门螺杆菌BALB/c小鼠适应性菌株的驯化及模型建立, 选题明确, 设计合理, 数据准确, 对研究幽门螺杆菌的动物模型的建立有一定的理论意义。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

视黄酸诱导蛋白16蛋白质结构功能分析

王 阁, 邓 婧, 杨 进, 郑继军, 王红中, 胡 庆, 张志敏, 陈 川, 王 东, 李增鹏

■背景资料

Tec是国内外研究较活跃的一个非受体型蛋白酪氨酸激酶, 他主要介导细胞信号传导。近几年的研究发现Tec与肝细胞分化有关, 在肝细胞中具有高表达和特异性, 是肝干细胞和肝细胞增值、分化、凋亡信号转导路径中关键的蛋白激酶连接分子。鉴于RAI16最初作为Tec相互作用蛋白被筛选克隆得到, 提示Tec和RAI16蛋白之间存在相互作用, 因此推测RAI16蛋白与细胞分化有关, 很可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中发挥重要作用。探索RAI16蛋白的结构功能为进一步研究他们之间的相互作用关系提供了更广阔的空间。

王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 张志敏, 陈川, 王东, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 重庆市 400042
李增鹏, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042
王阁, 第三军医大学博士研究生, 副教授, 主要从事肝细胞肝癌的分子机制研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30570410, No. 30370341
全国优秀博士专项基金资助项目, No. 200261
通讯作者: 王阁, 400042, 重庆市, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心. wangge70@hotmail.com
电话: 023-68757756
收稿日期: 2007-02-05 接受日期: 2007-02-13

Analysis on the protein structure and function of retinoic acid induced 16

Ge Wang, Jing Deng, Jin Yang, Ji-Jun Zheng, Hong-Zhong Wang, Qing Hu, Zhi-Min Zhang, Chuan Chen, Dong Wang, Zeng-Peng Li

Ge Wang, Jing Deng, Jin Yang, Ji-Jun Zheng, Hong-Zhong Wang, Qing Hu, Zhi-Min Zhang, Chuan Chen, Dong Wang, Cancer Center, Daping Hospital and Institute of Surgery Research, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Zeng-Peng Li, Department of Pathology, Daping Hospital and Institute of Surgery Research, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Supported by National Natural Science Foundation of China No. 30570410, No 30370341 and the Academic Foundation for National Excellent Doctoral Dissertation of China, No. 200261

Correspondence to: Ge Wang, Cancer Center, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. wangge70@hotmail.com

Received: 2007-02-05 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To analyze the protein structure and function of Homo sapiens retinoic acid induced 16 (RAI16) cDNA nucleotides sequence.

METHODS: Using some related computer software and database, RAI16 cDNA sequence and the deduced amino acid (AA) sequence were analyzed and compared with those of other species, and the secondary structure and hydrophobicity of the protein were determined and predicted.

RESULTS: RAI16 cDNA sequence consisted of

2863 nucleotides encoding a 759-AA protein. RAI16 protein included a 31-AA signal peptide. The protein had no transmembrane domain, and its subcellular localization was in endoplasmic reticulum. The secondary structure contained several kinds of conformations. RAI16 protein appeared as a compact and globular domain, and was a secretory and hydrophilicity protein (grand average of hydropathicity: -0.136). The protein was also unstable (the unstable coefficient: 53.11), with many phosphorylation and proteinase sites.

CONCLUSION: As a new signal protein, RAI16 may be involved in the signal transduction and transcription of hepatoma cell differentiation by interacting with Tec protein.

Key Words: Tec protein; Homo sapiens retinoic acid induced 16; Nucleotides; Protein Structure

Wang G, Deng J, Yang J, Zheng JJ, Wang HZ, Hu Q, Zhang ZM, Chen C, Wang D, Li ZP. Analysis on the protein structure and function of retinoic acid induced 16. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1342-1346

摘要

目的: 分析Tec激酶区作用蛋白视黄酸诱导蛋白16 (RAI16)的蛋白质结构和功能信息。

方法: 利用相应的计算机软件及数据库, 对RAI16 cDNA序列进行分析和比较, 并对编码的蛋白质氨基酸序列及其二级结构进行分析和预测。

结果: RAI16 cDNA序列由2863个核苷酸组成, 编码759氨基酸蛋白质, RAI16蛋白包括一段由31个氨基酸组成的信号肽, 没有跨膜区, 亚细胞定位于内质网上, 有多种二级结构形式, 为一紧密包裹的球状蛋白质, 是一种分泌蛋白, 有多个磷酸化和蛋白酶切位点。RAI16蛋白为不稳定蛋白, 不稳定系数为53.11, 疏水性GRAVY (grand average of hydropathicity)值为-0.136。

结论: RAI16蛋白作为一种新的胞内信号蛋

白, 很可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中与Tec协同发挥重要作用。

关键词: Tec蛋白; 视黄酸诱导蛋白16; 核苷酸; 蛋白质结构

王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 张志敏, 陈川, 王东, 李增鹏. 视黄酸诱导蛋白16蛋白质结构功能分析. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1342-1346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1342.asp>

0 引言

Tec(tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma)是一种存在于胞质内的非受体型蛋白酪氨酸激酶, 最初于肝癌组织中筛选得到, 他参与多种细胞因子的信号传递过程, 是多种细胞因子、辅助分子及受体型PTK信号转导过程中一个重要的靶分子。我们进一步证实Tec参与肝再生、肝干细胞和肝癌细胞分化的信号转导过程^[1-3]。本课题组前期工作通过酵母双杂交技术在胎肝cDNA文库中筛选得到一种Tec相互作用蛋白, 即视黄酸诱导蛋白16(RAI16)。关于RAI16文献报告很少, 功能研究报告更是空白, 从其命名知晓, 为一种RA诱导蛋白。本研究主要利用相应的计算机软件及一些有关的生物信息学站点, 对RAI16 cDNA序列进行分析和比较, 并对其编码的蛋白质氨基酸序列及其二级结构、功能域等进行分析和预测, 从中获得RAI16蛋白质结构方面的重要信息, 从而根据结构预测其未知新功能。

1 材料和方法

1.1 材料 以NCBI上公布的RAI16做为研究对象。NCBI上蛋白质序列数据库及核酸序列数据库。

1.2 方法

1.2.1 RAI16 cDNA的克隆及测序 以Tec激酶结构域(KD)作为“钓饵”蛋白, 在酵母双杂交系统中筛选构建于转录激活结构域(AD)载体的人胎肝文库, 经营养缺陷选择、诱导筛选及初步鉴定, 筛库所得基因插段约2000 bp左右的文库质粒为一真阳性克隆, 随之亚克隆, 将其连接重组于pMD18-T质粒, 转化DH5 α 大肠杆菌, 提取重组质粒DNA, 由上海博亚生物技术公司完成测序。

1.2.2 cDNA核酸序列的比较和分析 对已测出全长的cDNA阳性克隆序列, 通过生物信息学网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 在GenBank

数据库中查询比较所测序列的同源性, 初步确认cDNA序列的性质及其相关信息。

1.2.3 蛋白质序列的同源性分析及比较 分析RAI16蛋白质的开放阅读框架(ORF)并推译其cDNA编码的氨基酸序列。通过BLAST方式, 查询比较RAI16蛋白质序列的同源性。

1.2.4 蛋白质二级结构及功能的初步预测 基因的功能主要是通过其所翻译的蛋白质来体现, 在进化过程中, 蛋白质的顺序和结构在种间和种内的变化比相应核酸的变化要小。因此通过分析蛋白质的功能基序、亚细胞定位、信号肽及其二级结构可以初步预测相应功能。所用生物信息学网站有: 蛋白质功能基序分析: <http://au.expasy.org/prosite/>; 蛋白质二级结构预测: <http://www.emblheidelberg.de/predictprotein/>; 蛋白质信号肽及酶切位点预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; 蛋白质跨膜区预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; 蛋白质亚细胞定位分析: <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html/>; 蛋白质组成及疏水性分析: <http://cn.expasy.org/tools/protparam.html/>; 蛋白质亚细胞定位预测: <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html/>; 蛋白质各组成及疏水性分析: <http://cn.expasy.org/tools/protparam.html/>; 蛋白酶切位点预测: <http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>。

2 结果

2.1 RAI16 cDNA序列及其分析 测序发现插入片段全长2863个碱基对(base pair, bp), 他含有48 bp的5'端非翻译区、2232 bp组成的开放阅读框架及583 bp组成的3'非翻译区。序列比对发现, 插入基因片段与人视黄酸诱导蛋白16(RAI16) cDNA的同源性最高, 为99%, 从而证实克隆的这一基因为RAI16(GenBank收录号为BC052237)。

2.2 RAI16蛋白质序列的同源性分析及比较 利用<http://www.expasy.ch/>网站, 把RAI16开放读码框(ORF)中的DNA顺序翻译成相应的氨基酸顺序, 再利用<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>的蛋白质数据库进行比较, 结果未见有意义的同源蛋白。

2.3 蛋白质功能基序分析(图1) 生物信息学分析提示^[4], RAI16蛋白含6个蛋白质激酶C(PKC)磷酸化位点(164-166: TEK、271-273: SKK、336-338: SWR、435-437: TDR、468-470: TLR、590-592: SSR), 9个酪蛋白激酶 II (CK2)磷酸化位点(56-59: STDE、162-165: SVTE、164-167:

■ 研发前沿

近几年在对RA作用研究中发现RAI系列基因, 但尚无具体完整的结构和功能研究的相关报道, 只是推测RAI系列蛋白可能是一种“新型”的胞内参与信号转导转录调控的蛋白质家族。RAI16蛋白作为家族成员之一, 了解其结构功能, 对认识整个家族特征具有重要的意义。

■创新盘点

RAI16文献报告很少,功能研究报告更是空白。本研究利用相应的计算机软件及数据库,对RAI16 cDNA序列进行分析和比较,并对编码的蛋白质氨基酸序列及其二级结构进行了分析和预测,从而获得RAI16的蛋白质结构信息,为进一步探索RAI16的功能提供了理论依据。

TEKE、214-217: SHGD、507-510: SYED、523-526: SFLD、541-544: TSVD、573-576: TGYD、603-606: TPLD), 3个酪氨酸激酶(Tyr)磷酸化位点(73-81: KQMLDILVY、490-497: RNLEGRPY、629-635: RILDQPY), 6个N-豆蔻酰化位点(156-161: GGTASG、157-162: GTASGS、255-260: GTTESN、267-272: GLCQSK、482-487: GIIHSL、708-713: GQAPGE), 2个酰胺化位点(191-194: EGKK、196-199: VGRK), 3个酪氨酸硫酸化位点(501-515: GSPEPEYEDTL-DLE、512-526: LDLEEDPYFTDSFLD、568-582: AFLEETGYDTYVHDA)以及1个ATP-GTP结合位点(540-547: ATSYDGKT)。

2.4 蛋白质二级结构预测 成熟的RAI16蛋白可以形成 α -螺旋、 β -折叠及环状结构(LOOP)等多种二级结构形式,其中,以形成 α -螺旋的区间居多。通过生物信息学网站(<http://www.emblheidelberg.de/predictprotein>)得知: RAI16为一紧密包裹的球状蛋白质^[5]。

2.5 蛋白质信号肽及酶切位点预测 采用基于神经网络(NN, 图2A)的算法和隐藏的马尔可夫模型(HMM, 图2B)预测RAI16蛋白质的信号肽及其切割位点^[6-7], 结果表明, RAI16蛋白具有一段由31 AA组成的信号肽, 且其切割位点位于30-31 AA之间。推测为一种分泌蛋白。

2.6 蛋白质跨膜区预测 为了更直观的显示RAI16是否具有跨膜区, 借助expasy(<http://cn.expasy.org/>)中的TMHMM工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[7], 预测结果如图3)。

2.7 蛋白质亚细胞定位预测 通过工具PSORT(<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>)进行预测^[8-10], 结果如下: 44.4%: endoplasmic reticulum(内质网); 22.2%: cytoplasmic(胞质); 11.1%: mitochondrial(线粒体); 11.1%: Golgi(高尔基体); 11.1%: nuclear(细胞核)。

2.8 蛋白质各组成及疏水性分析 为了更加全面地统计各参数, 用expasy中的工具ProtParam (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>)^[11-12], 结果如下: 氨基酸数目: 759, 分子量: 83834.8, 等电点: 5.31; 负电荷残基总数(Asp+Glu): 93; 正电荷残基总数(Arg+Lys): 62; 分子式: C3769H5901N999O1114S25; 原子总数: 11808; 半衰期: 5.5 h; 不稳定系数: 53.11, 该蛋白分类为不稳定蛋白; 脂肪系数: 94.23; Grand average of hydropathicity (GRAVY)亲水性评估: -0.136。

2.9 蛋白酶切位点预测 通过工具PeptideCut-

GI-30411035-G- (759 aa)

图1 RAI16蛋白质各功能基序分布。

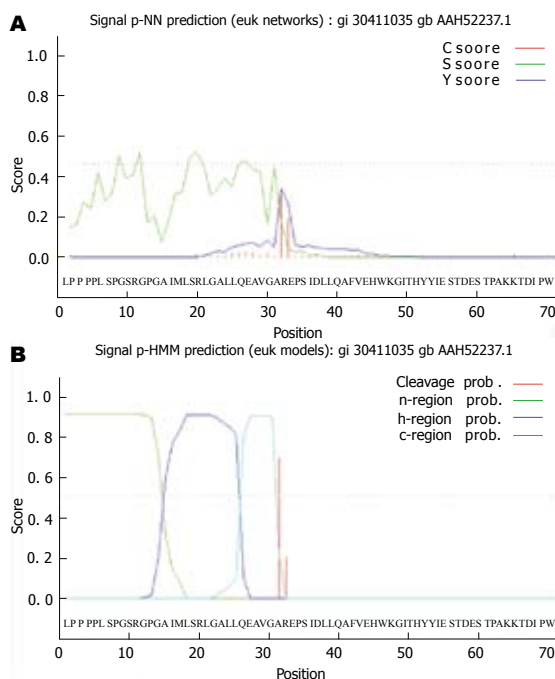


图2 RAI16蛋白质信号肽预测。A: NN算法; B: HMM算法。

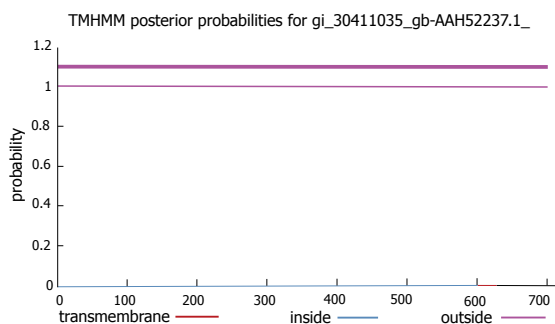


图3 RAI16蛋白质跨膜区预测。

ter (<http://www.expasy.org/tools/peptidecut-ter>)进行预测, 结果发现共有如下这些蛋白酶对RAI16有酶切作用: 精氨酸-C蛋白水解酶(Arg-C proteinase)、Asp-N内切酶(Asp-N endopeptidase)、Asp-N内切酶+N端亮氨酸(Asp-N endopeptidase+N-terminal Glu)、BNPS-Skatole、细胞凋亡蛋白酶1(caspase1)、高特异性糜蛋白酶(chymotrypsin-high specificity)、低特异性糜蛋白酶(chymotrypsin-low specificity)、梭菌蛋白酶(clostripain)、CNBr、凝血因子Xa (factor Xa)、甲酸(formic acid)、谷氨酰基肽链内切酶(glutamyl endopeptidase)、氧化苯甲酸(iodosobenzoic acid)、LysC、LysN、NTCB(2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)、胃蛋白

■应用要点

对RAI16蛋白的功能预测提示RAI16可能是Tec激酶的底物分子, 他参与了细胞分化过程, 很可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中发挥重要作用。对RAI16蛋白功能的更深入研究将为研究肿瘤细胞诱导分化信号转导分子机制提供新的思路 and 理论依据。

酶(pH1.3)(pepsin)、胃蛋白酶(pH>2)(pepsin)、脯氨酸肽链内切酶(proline-endopeptidase)、蛋白酶K (proteinase K)、葡萄球菌肽酶I (staphylococcal peptidase I)、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、胰蛋白酶(trypsin)。

3 讨论

1995年本课题组前期工作通过酵母双杂交技术在胎肝cDNA文库中筛选Tec相互作用蛋白, 得到一阳性克隆, 测序并经BLAST比对后, 确定为人源性RAI16基因, 已被GenBank收录, 编号为BC052237, 组织来源为脑IV型胶质细胞瘤。

RAI16 cDNA全长2863 bp, 含有48 bp的5'端非翻译区、2232 bp组成的开放阅读框架及583 bp组成的3'非翻译区, 在3'非编码区含有一个腺苷酸化位点(AATAAA)和长度为18个腺苷酸的poly(A)。编码框全长759 AA, 编码蛋白质分子量为83.8 kDa。PSORT结果提示, 该蛋白有很长的酪氨酸尾部, 并有一段9 AA长的过氧化物酶前导信号2(SK12) (KLLLVKQL at 698)。蛋白质同源性分析未见有意义的同源蛋白。

RAI16蛋白含有6个可能的PKC磷酸化位点, 9个可能的CK2位点, 3个Tyr磷酸化位点, 5个N-豆蔻酰化位点, 2个酰胺化位点, 3个酪氨酸硫酸化位点以及1个ATP-GTP结合位点。这些磷酸化位点主要功能是参与和调节蛋白质的代谢、翻译后的修饰和加工, RAI16蛋白中这些磷酸化位点的存在提示RAI16的生物学活性有可能在细胞信号传导通路中接受多种信号的调控。其中, 他具有多达18个不同蛋白激酶的磷酸化位点, 蛋白质的磷酸化和去磷酸化参与多种细胞功能的调节, 因此其失调可能与肝细胞的异常分化密切相关。

利用expasy中的工具ProtParam分析得到, RAI16蛋白等电点为5.31, 体外半衰期为5.5 h, 氨基酸组成成分中, 亮氨酸含量最高, N端序列考虑为亮氨酸。蛋白不稳定性系数为53.11(II级), 该蛋白分类为不稳定性蛋白。蛋白脂系数为94.23。蛋白质疏水性的预测在蛋白质组学研究中是必不可少的, 通常根据蛋白质的GRAVY 值来预测。GRAVY值的范围在2与-2之间, 正值表明此蛋白为疏水蛋白, 负值表明为亲水蛋白。从通过protparam工具统计的结果中可知, Grand average of hydropathicity(GRAVY)为-0.136, 这说明人源的RAI16为亲水蛋白。分析RAI16蛋白二级结构发现, 成熟的RAI16蛋白可以形成 α -

螺旋、 β -折叠及环状结构(LOOP)等多种二级结构形式, 其中大多为 α -螺旋。生物信息学网站PredictProtein提示该蛋白质为一包裹紧密的球状蛋白。此外, 该蛋白无跨膜区, 具有一段由31个氨基酸组成的信号肽, 且其切割位点位于30-31 AA之间, 推测为一种分泌蛋白。其亚细胞定位位于内质网上。因此, 我们可以推测RAI16蛋白是一种定位于胞质内内质网上的分泌型的球形信号蛋白, RAI16蛋白很可能在肝干细胞和肝癌诱导分化过程中, 作为RA诱导蛋白被信号蛋白分子募集至胞质内, 通过磷酸化、去磷酸化、豆蔻酰化、酰胺化等修饰, 通过不同的活化形式和剪切方式以及胞质与胞核间的移位, 完成其在信号转导中的重要角色。

总之, 我们首次成功地克隆出视黄酸诱导蛋白16的cDNA序列, 由此推译出他的蛋白质一级结构, 并对其功能区、信号肽、亚细胞定位、二级结构及亲疏水性等进行了分析。上述结果为深入研究RAI16的分子结构及其下一步的功能预测奠定了基础, 对其结构和功能的深入研究, 将有助于阐明RAI16在肝癌细胞诱导分化信号转导转录中的作用, 同时还将利于明确RAI16与Tec蛋白之间的相互作用机制, 从而进一步拓宽Tec的研究领域。

4 参考文献

- 1 Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene* 2000; 19: 5651-5661
- 2 Schmidt U, Boucheron N, Unger B, Ellmeier W. The role of Tec family kinases in myeloid cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 65-78
- 3 Miller AT, Berg LJ. New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 331-340
- 4 Mondal S, Jaishankar SP, Ramakumar S. Role of context in the relationship between form and function: structural plasticity of some PROSITE patterns. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 1078-1084
- 5 Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 318-325
- 6 Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 340: 783-795
- 7 Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 2004; 338: 1027-1036
- 8 Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 34-36
- 9 Peuvrel I, Peyret P, Metenier G, Vivares CP, Delbac

■名词解释

Tec: 最早是从肝癌组织中筛选出的一种重要的非受体型蛋白酪氨酸激酶, 他存在于胞质内, 主要在T细胞、B细胞、造血细胞及肝脏中表达。Tec是多种细胞因子、辅助分子及受体型蛋白酪氨酸激酶信号转导途径中的重要靶分子, 被上游分子激活后, 作用于下游底物使之磷酸化, 进行信号分子的逐级传递, 同时能够参与并调节多种生物学效应。

■同行评价

RAI16蛋白质作为一种新的包内信号蛋白,可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中与Tec协同发挥重要作用。本研究内容重要,提供了有意义的信息,文章科学性、创新性和可读性能较好的反映我国或国际肠胃病学临床和基础研究的先进水平。

- F. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 122: 69-80
- 10 Guo J, Jin G, Meng L, Ma H, Nie D, Wu J, Yuan L, Shou C. Subcellular localization of tumor-associated antigen 3H11Ag. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 922-930
- 11 Schneider M, Tognolli M, Bairoch A. The Swiss-Prot

protein knowledgebase and ExPASy: providing the plant community with high quality proteomic data and tools. *Plant Physiol Biochem* 2004; 42: 1013-1021

12 Gattiker A, Michoud K, Rivoire C, Auchincloss AH, Coudert E, Lima T, Kersey P, Pagni M, Sigrist CJ, Lachaize C, Veuthey AL, Gasteiger E, Bairoch A. Automated annotation of microbial proteomes in SWISS-PROT. *Comput Biol Chem* 2003; 27: 49-58

电编 郭海丽 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 •

第三届全军胃肠外科学学术会议暨 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。

白花蛇舌草总黄酮对肝癌的体内外抑制作用及对小鼠移植性肝癌H22细胞增殖周期、凋亡、免疫环境的影响

张 硕, 宋衍芹, 周 三, 杨志宏, 刘占涛, 倪同尚, 岳 旺

张硕, 周三, 杨志宏, 刘占涛, 岳旺, 青岛大学医学院药理学系
山东省青岛市 266021
宋衍芹, 青岛市市立医院口腔科 山东省青岛市 266071
倪同尚, 青岛大学医学院解剖教研室 山东省青岛市 266021
张硕, 2005年成都中医药大学中药学博士, 主要从事天然药物
药理研究和毒理评价。
通讯作者: 岳旺, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学
医学院药理学系, dr_zhangshuo@sina.com
电话: 0532-82991888
收稿日期: 2007-01-30 接受日期: 2007-02-13

Inhibitory effect of flavonoids from *Hedyotis diffusa* willd. on hepatoma cells *in vitro* & *vivo* and its influence on transplanted H22 tumor cells' proliferation cycle, apoptosis and immune circumstances in mice

Shuo Zhang, Yan-Qin Song, San Zhou, Zhi-Hong Yang, Zhan-Tao Liu, Tong-Shang Ni, Wang Yue

Shuo Zhang, San Zhou, Zhi-Hong Yang, Zhan-Tao Liu, Wang Yue, Department of Pharmacy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Yan-Qin Song, Department of Stomatology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Tong-Shang Ni, Department of Anatomy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Correspondence to: Wang Yue, Department of Pharmacy, Medical College of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. dr_zhangshuo@sina.com

Received: 2007-01-30 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of flavonoids from *Hedyotis diffusa* willd. (FHD) on human hepatoma cell line SMMC-7721 and BEL-7402 *in vitro*, the antitumor effect on transplanted H22 tumor cells *in vivo* and its influence on the proliferation cycle, apoptosis of tumor cells and immune circumstances.

METHODS: MTT assay was used to measure

the inhibition of SMMC-7721 and BEL-7402 cells exposing to 0, 5, 10, 50 and 100 mg/L FHD for 24, 48 and 72 hours. Sixty Kunming mice were randomly and averagely divided into 6 groups. Except those in normal control group, the other mice received inoculation of H22 tumor cells, and then treated with normal saline, 5-fluorouracil (30 mg/kg), and FHD (25, 50, 100 mg/kg), respectively, for 10 days. The following indicators were compared among the 6 groups, including the inhibitory rates of tumor weights, the distribution of H22 cell cycle, the apoptosis of H22 cells, the thymus index ($\times 10^{-3}$) and splenic index ($\times 10^{-3}$) in mice bearing H22 tumors, the splenic lymphocyte transformation efficiency, and the serum levels (ng/L) of tumor necrosis factor (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ).

RESULTS: FHD inhibited the proliferation of SMMC-7721 and BEL-7402 cells *in vitro* in a dose- and time-dependent manner. In comparison with those in the model control mice, when FHD was used at the concentrations of 25, 50 and 100 mg/kg, the growth of H22 tumors was obviously restrained ($P < 0.01$); the proportion of G₀/G₁-phase cells was increased ($30.36\% \pm 5.72\%$, $32.83\% \pm 6.67\%$, $39.67\% \pm 8.01\%$ vs $25.62\% \pm 4.36\%$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), while that of G₂/M-phase cells was decreased ($7.65\% \pm 2.32\%$, $6.33\% \pm 3.43\%$, $2.22\% \pm 0.98\%$ vs $11.13\% \pm 2.77\%$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$); the apoptosis of tumor cells was significantly promoted ($2.41\% \pm 0.42\%$, $2.22\% \pm 0.33\%$, $2.07\% \pm 0.40\%$ vs $1.47\% \pm 0.66\%$, $P < 0.01$); the splenic index was down-regulated (51.43 ± 8.31 , 47.43 ± 7.89 , 48.64 ± 9.35 vs 67.63 ± 7.44 , $P < 0.01$), but the thymus index (33.36 ± 4.09 , 40.35 ± 5.79 , 34.57 ± 6.56 vs 22.43 ± 4.52 , $P < 0.01$), the splenic lymphocyte transformation rate ($10.83\% \pm 3.75\%$, $11.33\% \pm 5.04\%$, $13.58\% \pm 4.62\%$ vs $9.35\% \pm 2.02\%$, $P < 0.05$), and the serum levels of TNF- α (257.56 ± 42.29 , 386.36 ± 25.97 , 364.52 ± 23.62 vs 101.43 ± 24.72 , $P < 0.01$) and IFN- γ (355.83 ± 35.74 , 392.31 ± 25.17 , 357.38 ± 34.82 vs 172.35 ± 29.02 , $P < 0.01$) were markedly elevated.

CONCLUSION: FHD has inhibitory effect on

■背景资料

白花蛇舌草是一种具有突出抗癌作用的中药, 但其抗癌有效成分及作用机制, 目前仍缺乏清楚的认识. 本文从体外、体内实验的药效学角度讨论了总黄酮成分的抗肝癌作用, 并从细胞周期调控、凋亡、免疫等多角度, 探讨了其抗癌机制.

■相关报道

许多报道表明,中药的抗肿瘤作用有赖于多个环节,其中,细胞周期阻滞是造成抗肿瘤效应的重要基础之一;通过免疫调控机制发挥抗肿瘤作用,对于多数具有抗肿瘤效果的中药来说,是不可忽视的途径;而细胞凋亡,是几乎所有干预手段的最终结局,以上机制均能在肿瘤相关基因表达上找到答案。

hepatoma cells both *in vivo* and *in vitro*, which is related to the blocking of tumor cell proliferation cycle, promotion of tumor cell apoptosis and regulation of immune circumstances.

Key Words: *Hedyotis diffusa willd.*; Flavonoids; Hepatoma; Inhibitory effect; Cell proliferation cycle; Apoptosis; Immunization; Tumor necrosis factor- α ; Interferon- γ

Zhang S, Song YQ, Zhou S, Yang ZH, Liu ZT, Ni TS, Yue W. Inhibitory effect of flavonoids from *Hedyotis diffusa willd.* on hepatoma cells *in vitro* & *in vivo* and its influence on transplanted H22 tumor cells' proliferation cycle, apoptosis and immune circumstance in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1347-1352

摘要

目的: 研究白花蛇舌草总黄酮(FHD)对人肝癌细胞SMMC-7721, BEL-7402的体外抑制作用,对小鼠移植性肝癌H22的体内抑制作用和对其增殖周期、凋亡、免疫功能的影响。

方法: MTT法评价FHD在0, 5, 10, 50, 100 mg/L浓度下,于24, 48, 72 h对人肝癌细胞SMMC-7721, BEL-7402的抑制率变化。昆明♂小鼠60只,随机取10只为正常对照组,余接种H22瘤株,随机分为模型对照组、5-FU阳性对照组(30 mg/kg)和高中低剂量FHD给药组(剂量分别为25, 50, 100 mg/kg),腹腔给药10 d后,比较各组瘤质量抑制率、H22细胞周期分布及凋亡率,比较各组荷瘤小鼠的胸腺指数($\times 10^{-3}$)、脾脏指数($\times 10^{-3}$)、脾淋巴细胞转化率和血清TNF- α 、IFN- γ 水平(ng/L)。

结果: FHD对SMMC-7721、BEL-7402细胞具有体外抑制作用,且呈剂量依赖性和时间依赖性($P < 0.05$)。与模型对照组相比,25, 50, 100 mg/kg FHD显著抑制小鼠移植性H22肿瘤($P < 0.01$),使G₀/G₁期H22细胞比例逐渐增加($30.36\% \pm 5.72\%$, $32.83\% \pm 6.67\%$, $39.67\% \pm 8.01\%$ vs $25.62\% \pm 4.36\%$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),G₂/M期细胞比例逐渐下降($7.65\% \pm 2.32\%$, $6.33\% \pm 3.43\%$, $2.22\% \pm 0.98\%$ vs $11.13\% \pm 2.77\%$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),促进肿瘤细胞凋亡($2.41\% \pm 0.42\%$, $2.22\% \pm 0.33\%$, $2.07\% \pm 0.40\%$ vs $1.47\% \pm 0.66\%$, $P < 0.01$),降低荷瘤小鼠脾脏指数(51.43 ± 8.31 , 47.43 ± 7.89 , 48.64 ± 9.35 vs 67.63 ± 7.44 , $P < 0.01$),升高胸腺指数(33.36 ± 4.09 , 40.35 ± 5.79 , 34.57 ± 6.56 vs 22.43 ± 4.52 , $P < 0.01$)和脾淋巴细胞转化率($10.83\% \pm 3.75\%$, $11.33\% \pm 5.04\%$, $13.58\% \pm 4.62\%$ vs $9.35\% \pm 2.02\%$, $P < 0.05$),并提高血清TNF- α (257.56 ± 42.29 , 386.36 ± 25.97 , 364.52

± 23.62 vs 101.43 ± 24.72 , $P < 0.01$)、IFN- γ 水平(355.83 ± 35.74 , 392.31 ± 25.17 , 357.38 ± 34.82 vs 172.35 ± 29.02 , $P < 0.01$)。

结论: FHD在体外、体内均具有抑制肝癌细胞的作用,此作用与阻滞肿瘤细胞增殖周期、促进肿瘤细胞凋亡、调节机体免疫环境有关。

关键词: 白花蛇舌草; 总黄酮; 肝癌; 抑制作用; 增殖周期; 凋亡; 免疫; 肿瘤坏死因子- α ; 干扰素- γ ; MTT法

张硕, 宋衍芹, 周三, 杨志宏, 刘占涛, 倪同尚, 岳旺. 白花蛇舌草总黄酮对肝癌的体内外抑制作用及对小鼠移植性肝癌H22细胞增殖周期、凋亡、免疫环境的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(12):1347-1352

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1347.asp>

0 引言

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa willd.*)是茜草科耳草属植物,在中国云南、广西、广东、福建、浙江、江苏等地均有生长^[1]。近年来,关于其抗肿瘤作用日益成为研究热点。然而,对其黄酮类(flavonoids)成分的抗癌作用及机制研究鲜见报道^[2-3]。我们通过体内、体外实验,研究了白花蛇舌草总黄酮(flavonoids from *Hedyotis diffusa willd.*, FHD)对肝癌的抑制作用,并从细胞周期调控、凋亡、免疫角度展开了机制探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 18-22 g昆明种小鼠,♂,清洁级,购自成都中医药大学实验动物中心。小鼠HepA22肝癌细胞株(H22),人肝癌细胞株SMMC-7721, BEL-7402, 购自四川大学华西医学中心肿瘤研究所。FHD: 白花蛇舌草经成都中医药大学中药鉴定教研室鉴定后,由药物化学教研室提取(经检测,其纯度为85.63%);经500 mL/L乙醇溶解,生理盐水稀释,0.22 μ m滤膜过滤除菌,用于体内实验;经500 mL/L乙醇溶解, RPMI1640稀释,0.22 μ m滤膜过滤除菌,用于体外实验。氟尿嘧啶(5-FU)注射液(天津金耀氨基酸有限公司), RPMI1640、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司), MTT, PI(Sigma公司), DMSO(成都科龙化工试剂厂), 伴刀豆蛋白A(ConA, Sigma公司), 小鼠TNF- α , IFN- γ ELISA试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对培养人肝癌细胞的体外抑制作用 复苏

表 1 FHD对小鼠移植性肿瘤H22的抑制作用(mean ± SD)

分组	动物数(始/终)	平均体质量(g)(始/终)	瘤质量(g)	抑瘤率(%)	
模型对照组	10/10	22.4/33.8	1.624 ± 0.422	—	
FHD组	25 mg/kg	10/10	22.6/32.6 ^d	1.033 ± 0.376 ^a	36.4
	50 mg/kg	10/10	22.5/31.7 ^d	0.835 ± 0.342 ^b	48.6
	100 mg/kg	10/10	22.3/30.8 ^d	0.651 ± 0.440 ^b	59.9
5-FU对照组	10/8	22.2/21.6 ^b	0.531 ± 0.287 ^b		67.3

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型对照组; ^d $P < 0.01$ vs 5-FU对照组。

人肝癌细胞株SMMC-7721, BEL-7402, 用含100 mL/L胎牛血清、50 U/L青霉素和50 mg/L链霉素的RPMI1640培养液在37℃恒温、50 mL/L CO₂ 密闭环境中培养。将对数生长期的SMMC-7721, BEL-7402细胞按 5×10^3 /孔接种于96孔培养板, 孵育24 h待贴壁后加入FHD。FHD取5个浓度组, 终浓度分别为0, 5, 10, 50, 100 mg/L, 每个实验组重复6孔。每个浓度组选取24, 48, 72 h 3个作用时间点进行MTT检测, 观测FHD对两种细胞株的生长抑制情况。以490 nm波长测定吸光度(A)值。抑制率 = (对照孔 A_{490} - 实验孔 A_{490}) / 对照孔 A_{490} × 100%。

1.2.2 对小鼠皮下移植性肝癌H22的抑制作用 随机取10只小鼠为正常对照组。H22细胞复苏后培养传代, 收集对数生长期细胞, 以生理盐水调整细胞浓度至 1×10^6 /L, 将0.5 mL细胞悬液接种于小鼠腹腔中, 7 d后抽取小鼠腹水, 用生理盐水稀释成1:4的细胞悬液, 以0.2 mL/只接种于余下的50只小鼠右前肢腋窝皮下。24 h后将已经接种的小鼠随机分为5组, 每组10只, 即: 模型对照组(生理盐水)、5-FU阳性对照组(5-FU, 30 mg/kg)、FHD高中低剂量组(25, 50, 100 mg/kg)。各组每天称质量, 腹腔注射给药, 连续给药10 d, 末次给药24 h后颈椎脱臼处死, 剥取瘤块称质量, 计算抑瘤率。抑瘤率(%) = (阴性对照组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 阴性对照组平均瘤质量 × 100%。

1.2.3 对小鼠移植性肝癌H22细胞增殖周期及凋亡的影响 从每组所取出的瘤块中各取1-2 mm³ 研磨制成细胞悬液, 用PBS洗3次, 用700 mL/L的4℃冰乙醇固定, PI染色, 用流式细胞仪(FCM)分析细胞周期各期细胞分布情况及细胞凋亡率。

1.2.4 对H22荷瘤小鼠免疫功能的影响 胸腺、脾脏指数测定: 取各组小鼠胸腺、脾脏称质量, 除以相应的体质量乘以100%, 分别得出胸腺指数和脾脏指数。

脾脏淋巴细胞转换实验: 将从各组小鼠中无菌分离出的脾脏剪碎, 过200目不锈钢滤网, 用37℃预温的D-Hank's液反复冲洗悬浮, 1000 r/min下离心2次, 每次10 min, 破红细胞后, 再经D-Hank's液离心清洗, 以RPMI1640+100 mL/L小牛血清配成浓度为 2×10^8 /L细胞悬液, 接种于96孔培养板内, 每孔200 μL。设无ConA组和加ConA组。无ConA组取正常对照组标本, 6个复孔; 其余各组均加ConA, 并且ConA终浓度均为10 mg/L, 也分别设6个复孔。培养72 h后, 行MTT检测, 以570 nm波长测定吸光度(A)值。计算刺激指数(SI = ConA组孔 A_{570} / 无ConA组孔 A_{570})和淋巴细胞转化率[transfer rate = (模型组标本孔加ConA后SI / 剂量组标本孔加ConA后SI) × 100%]。

H22荷瘤小鼠血清TNF-α, IFN-γ水平的检测: 按照试剂盒要求采用ELISA检测H22荷瘤小鼠血清TNF-α, IFN-γ的含量。根据标准品的浓度和其相应的吸光度(A)值作出标准曲线求得曲线方程, 再根据样品的A值求得样品内细胞因子的浓度。

统计学处理 所有实验数据均采用mean ± SD表示, 数据处理采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 对培养人肝癌细胞的体外抑制作用 FHD对SMMC-7721, BEL-7402细胞均具有明显的抑制作用($P < 0.05$), 并且呈剂量依赖性和时间依赖性(图1)。

2.2 对小鼠皮下移植性肝癌H22的抑制作用 各FHD组瘤质量均显著低于模型对照组($P < 0.01$), 低中高剂量组的抑瘤率分别为36.4%, 48.6%, 59.9%, 但各组抑瘤率仍低于5-FU对照组的67.5%。5-FU对照组的终末体质量显著低于模型对照组($P < 0.01$); 各FHD组的终末体质量与模型对照组无显著差异($P > 0.05$), 且显著高于5-FU对

■创新盘点

目前, 多数对白花蛇舌草抗癌作用的研究停留在粗提物的水平, 缺乏对确切成分的深入研究。许多研究或偏重于体外实验, 或偏重于体内实验, 而没有回答体内、体外实验的结果是否一致的问题。本研究提出了体外与体内实验相结合的抗癌作用评价思路, 并在此基础上从细胞周期调控、细胞凋亡、免疫调节及分子靶点等多角度, 展开多层次的探讨, 使得中药成分抗癌作用的研究更加系统、全面。

■应用要点

本研究发现,白花蛇舌草总黄酮对人肝癌SMMC-7721, BEL-7402细胞具有体外抑制作用,且呈剂量依赖性和时间依赖性,通过增加 G_0 - G_1 期细胞比例,降低 G_2 /M期细胞比例,实现细胞周期阻滞,促进肿瘤细胞凋亡,维护机体正常免疫功能,并提高TNF- α , IFN- γ 水平. 这为将白花蛇舌草总黄酮开发为安全有效的抗肝癌新药提供了实验依据.

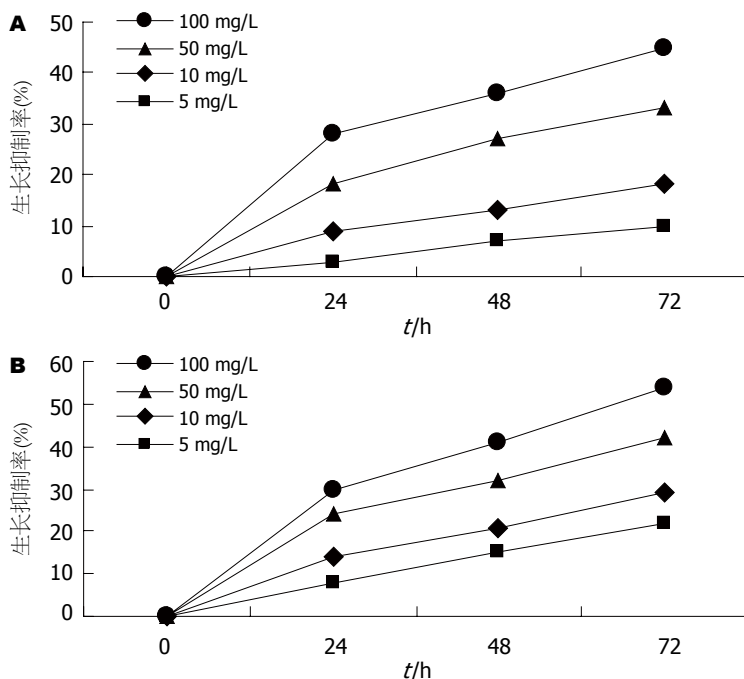


图 1 FHD对SMMC-7721, BEL-7402细胞生长的抑制作用. A: SMMC-7721; B: BEL-7402.

表 2 FHD对小鼠移植性肿瘤H22细胞增殖周期及凋亡的影响(mean \pm SD, $n = 8$)

分组	细胞周期分布(%)			凋亡细胞(%)
	G_0/G_1 期	G_2/M 期	S期	
模型对照组	25.62 \pm 4.36	11.13 \pm 2.77	63.41 \pm 8.96	1.47 \pm 0.66
FHD组 25 mg/kg	30.36 \pm 5.72 ^a	7.65 \pm 2.32 ^a	60.35 \pm 9.27	2.41 \pm 0.42 ^b
50 mg/kg	32.83 \pm 6.67 ^a	6.33 \pm 3.43 ^a	59.64 \pm 7.97	2.22 \pm 0.33 ^b
100 mg/kg	39.67 \pm 8.01 ^b	2.22 \pm 0.98 ^b	56.15 \pm 6.38	2.07 \pm 0.4 ^b
5-FU对照组	30.53 \pm 6.99	2.01 \pm 0.73 ^b	66.87 \pm 8.36	2.76 \pm 0.88 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型对照组.

对照组($P < 0.01$)(表1).

2.3 对荷瘤小鼠H22细胞增殖周期及凋亡的影响 FHD可浓度依赖性地引起H22细胞 G_0/G_1 期比例逐渐增加,相应 G_2/M 期细胞比例逐渐下降,各浓度组与模型对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$),而S期细胞所占的比例不变($P > 0.05$).各FHD组、5-FU组的H22细胞凋亡率显著高于模型对照组($P < 0.01$)(表2).

2.4 对H22荷瘤小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾脏淋巴细胞转化率的影响 小鼠荷瘤后,脾脏指数显著升高($P < 0.01$),胸腺指数和脾淋巴细胞转化率显著降低($P < 0.01$);给予高中低剂量FHD后,荷瘤小鼠脾脏指数显著降低($P < 0.01$),胸腺指数显著升高($P < 0.01$),脾淋巴细胞转化率也显著升高($P < 0.05$);给予5-FU后,荷瘤小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾脏淋巴细胞转化率显著降低($P < 0.05$)(表3).

2.5 对荷瘤小鼠血清TNF- α , IFN- γ 水平的影响 给予高中低剂量FHD后,荷瘤小鼠血清TNF- α , IFN- γ 水平均显著升高($P < 0.01$)(表4).

3 讨论

本研究的体外实验表明, FHD对人肝癌细胞SMMC-7721, BEL-7402的生长有显著抑制作用,且呈剂量和时间依赖性. 体内实验表明, FHD显著抑制小鼠移植性肝癌H22的生长,且亦呈剂量依赖性. 体内、体外实验的结果均表明, FHD对肝癌具有确切的抑制作用.

细胞增殖是细胞生命活动的基本表现之一,是一种受到严格调控的精确有序过程. 肿瘤细胞则表现为调控失常,不受节制地无限繁殖. 通过影响或调节细胞周期可以抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞分化或导致细胞死亡. 现有的一些抗肿瘤药物正是通过影响细胞周期而发挥作用

表 3 FHD对H22荷瘤小鼠脾脏指数、胸腺指数、脾脏淋巴细胞转化率的影响(mean \pm SD, $n = 8$)

分组	脾脏指数($\times 10^{-3}$)	胸腺指数($\times 10^{-3}$)	脾淋巴细胞转化率(%)
正常对照组	41.08 \pm 5.69	35.72 \pm 6.78	12.73 \pm 2.32
模型对照组	67.63 \pm 7.44 ^b	22.43 \pm 4.52 ^b	9.35 \pm 2.02 ^b
FHD组			
25 mg/kg	51.43 \pm 8.31 ^d	33.36 \pm 4.09 ^d	10.83 \pm 3.75 ^c
50 mg/kg	47.43 \pm 7.89 ^d	40.35 \pm 5.79 ^d	11.33 \pm 5.04 ^c
100 mg/kg	48.64 \pm 9.35 ^d	34.57 \pm 6.56 ^d	13.58 \pm 4.62 ^c
5-FU对照组	58.66 \pm 9.54 ^c	18.73 \pm 8.08 ^c	7.86 \pm 2.11 ^c

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型对照组.

的^[4-7]. 本研究发现, FHD可浓度依赖性地提高G₀/G₁期细胞比例, 降低G₂/M期细胞数目. 由此推测, FHD作用于G₀/G₁期, 使细胞更多地停滞于静止期, 减少其进入分裂期. 我们在FHD抑制肝癌细胞生长的靶基因调控研究中, 发现FHD可将蛋白激酶MAP2K6的表达上调至正常水平^[21], 而细胞周期阻滞往往需要MAP2K6的参与^[8-9]. 这些结果说明, 促进肿瘤细胞周期阻滞可能是FHD抑制肝癌细胞生长的机制之一.

肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞增殖加快有关, 也与肿瘤细胞死亡受抑制密切相关. 随着对凋亡的深入认识, 人们发现细胞凋亡抑制是肿瘤形成的一个共同的重要事件, 而诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径. 我们发现, FHD可显著增加小鼠种植性H22细胞的凋亡率. 我们在FHD抑制肝癌细胞生长的靶基因调控研究中还发现, FHD可下调肝癌细胞中bcl-2基因的表达^[21]. bcl-2基因是一种典型的细胞凋亡抑制基因^[10-12]. 这为揭示FHD通过诱导肝癌细胞凋亡产生抗癌作用的机制提示了重要的研究方向.

越来越多的学者认为, 机体整体的免疫功能状态, 对于抗肿瘤具有重要价值. 降低对免疫系统的破坏性, 在抗肿瘤方案中已被摆到了十分突出的位置. 本研究考察了FHD对荷瘤小鼠免疫器官的影响, 发现FHD可降低小鼠荷瘤后升高的脾脏指数, 并升高胸腺指数. 与化疗药5-FU降低机体免疫功能的作用相比, FHD维护免疫功能的作用具有显著优势. ConA是一种丝裂原, 他可以刺激淋巴细胞发生增殖和分化, 这一过程与体内淋巴细胞的活化过程相似, 因此, ConA诱导的淋巴细胞转化被用作评价淋巴细胞功能的指标. 我们发现, 模型对照组小鼠淋巴细胞增殖能力较正常小鼠降低, FHD使荷瘤小鼠淋巴细胞转化能力明显增高. 这表明, FHD体内给药可促进荷瘤小鼠的淋巴细胞增殖. 我们推测: FHD

表 4 FHD对H22荷瘤小鼠血清TNF- α , IFN- γ 水平的影响(mean \pm SD, $n = 8$, ng/L)

分组	TNF- α	IFN- γ
模型对照组	101.43 \pm 24.72	172.35 \pm 29.02
FHD组		
25 mg/kg	257.56 \pm 42.29 ^b	355.83 \pm 35.74 ^b
50 mg/kg	386.36 \pm 25.97 ^b	392.31 \pm 25.17 ^b
100 mg/kg	364.52 \pm 23.62 ^b	357.38 \pm 34.82 ^b

^b $P < 0.01$ vs 模型对照组.

促淋巴细胞增殖的作用是其抗肿瘤的免疫基础之一.

细胞因子是由免疫细胞产生的一类小分子免疫调节物质, 他们在中药抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[13]. 干扰素(interferon, IFN)是一族糖蛋白, 具有抗病毒、调节免疫、抗增殖等一系列生物学特性, 是重要的免疫细胞因子. IFN- γ 主要是由活化的T细胞和NK细胞产生的, 可以直接抑制肿瘤细胞的增殖, 且具有广泛的免疫调节作用, 能激活和促进单核巨噬细胞以及NK细胞的吞噬作用, 促进T细胞和B细胞的分化和成熟, 刺激B细胞产生抗体, 增强杀伤性T细胞(CTL)介导的细胞毒作用, 还可以诱导肿瘤细胞表达MHC-1类抗原, 从而增强免疫细胞对肿瘤细胞的识别, 具有正向调控细胞免疫功能的作用^[14], 并诱导肿瘤细胞的凋亡^[15-16]. 因此, IFN- γ 对于增强机体的抗肿瘤免疫起到至关重要的作用. 尽管这样, IFN- γ 对于肿瘤生长的影响是双向的, 即在低剂量下会诱发肿瘤的免疫耐受, 促进肿瘤的发展, 而只有在高剂量下, 才会明显抑制肿瘤细胞^[17]. 本研究发现, FHD可以大幅度提高荷瘤小鼠血清中IFN- γ 的水平, 这对抑制肿瘤细胞是有利的. 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一类能直接造成肿瘤细胞坏死的细胞因

同行评价

本文主要从药理学角度研究了白花蛇舌草总黄酮对肝癌的体外、体内抑制作用, 从细胞周期调控、细胞凋亡、免疫调节等角度, 探讨其抗癌机制, 有利于帮助读者更全面地认识白花蛇舌草总黄酮的抗肝癌作用及机制, 是一篇典型的中药药理实验论文, 有一定实际应用价值.

子. 近年来, 随着基础和临床研究的不断深入, TNF在肝癌病理生理治疗中的作用越来越突出. TNF- α 在体内是淋巴细胞和NK细胞产生的一种多功能细胞因子, 在参与机体的炎症和免疫调节中具有重要作用, 是一种可以直接造成肿瘤细胞死亡的细胞因子^[18-20]. 本研究发现, FHD可以显著提高荷瘤小鼠血清中TNF- α 水平, 这表明, FHD可以通过促进TNF- α 的分泌达到间接抑制肿瘤的效果.

总之, FHD在体外、体内均具有抑制肝癌的作用, 此作用与阻滞肿瘤细胞增殖周期、促进肿瘤细胞凋亡、调节机体免疫环境密切相关.

4 参考文献

- 1 崔健, 施松善, 王顺春, 王峥涛. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展. 上海中医药杂志 2005; 39: 57-59
- 2 任风芝, 刘刚叁, 张丽, 牛桂云. 白花蛇舌草黄酮类化学成分研究. 中国药理学杂志 2005; 40: 502-504
- 3 方岩雄, 张永成, 陈敏敏, 郑穗华, 张焜. 抗肿瘤药物白花蛇舌草及其活性成分. 中成药 2004; 26: 577-579
- 4 Sausville EA. Cyclin-dependent kinase modulators studied at the NCI: pre-clinical and clinical studies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3: 47-56
- 5 Grant S, Roberts JD. The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2003; 6: 15-26
- 6 Senderowicz AM. Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52 Suppl 1: S61-73
- 7 Senderowicz AM. Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: S84-95
- 8 Wang X, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS, Fearn C, Wang Y, Huang S, Han J. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4543-4552
- 9 Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Brocker EB, Rapp UR, Ludwig S. The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 857-865
- 10 Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. BCL2 expression correlates with metastatic potential in pancreatic cancer cell lines. *Cancer* 2001; 92: 1122-1129
- 11 Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1221-1228
- 12 Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-487
- 13 章九红. 中医药抗肿瘤体液免疫的研究现状. 中医药信息 2006; 23: 33-35
- 14 李德春, 朱兴国, 余文渊. IFN- γ 、IL-12对B7-1转染肝癌细胞诱导T淋巴细胞活化的影响. 江苏医药杂志 2005; 31: 24-26
- 15 韩丽辉, 孙汶生, 贾晓青, 马春红, 高立芬, 刘素侠, 王晓燕. γ -干扰素对HBV相关性肝癌细胞凋亡的免疫调节效应研究. 中国现代普通外科进展 2005; 8: 269-271
- 16 韩丽辉, 孙汶生, 马春红, 刘素侠, 王晓燕, 于建国, 张利宁, 陈有海. IFN- γ 对TRAIL诱导HBV相关性肝癌细胞凋亡的调节作用. 中华微生物学和免疫学杂志 2003; 23: 34-37
- 17 贺宇飞, 张桂梅, 张慧, 陈洪涛, 冯作化. 不同剂量IFN- γ 体内对小鼠H22肝癌发生发展的作用研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2005; 25: 292-296
- 18 古翠萍. TNF- α 抗肿瘤作用机制新进展. 中国肿瘤 2007; 16: 102-105
- 19 Horie T, Dobashi K, Iizuka K, Yoshii A, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Interferon-gamma rescues TNF-alpha-induced apoptosis mediated by up-regulation of TNFR2 on EoL-1 cells. *Exp Hematol* 1999; 27: 512-519
- 20 Dudich E, Semenkova L, Dudich I, Gorbatoeva E, Tochtamisheva N, Tatulov E, Nikolaeva M, Sukhikh G. alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases. *Eur J Biochem* 1999; 266: 750-761
- 21 张硕, 宋衍芹, 周三, 倪同尚, 岳旺. 白花蛇舌草总黄酮抑制人肝癌细胞的靶基因调控. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1060-1066

电编 张敏 编辑 张焕兰

氧化苦参碱对人结肠癌细胞P21, P27, Cyclin E1及CDK2表达的影响

陆丽华, 冉志华

陆丽华, 冉志华, 上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市消化疾病研究所 上海市 200001

陆丽华, 医学硕士, 主要从事消化道肿瘤的基础研究。

通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所. z-ran@online.sh.cn
电话: 021-58752345 传真: 021-63266027

收稿日期: 2007-01-29 接受日期: 2007-03-26

Effects of oxymatrine on the expression of P21, P27, Cyclin E1 and CDK2 in human colon cancer cell line SW1116

Li-Hua Lu, Zhi-Hua Ran

Li-Hua Lu, Zhi-Hua Ran, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Zhi-Hua Ran, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn

Received: 2007-01-29 Accepted: 2007-03-26

Abstract

AIM: To observe the effect of oxymatrine (OM) on the expression of P21, P27, Cyclin E1 and CDK2 in human colon cancer cell line SW1116, investigate the pathways of OM in inhibiting tumor cell proliferation, and explore its anti-tumor mechanism.

METHODS: Human colon cancer cell line SW1116 was cultured and then treated with different concentrations (2, 3, 4 g/L) of OM, respectively, for 24 and 48 hours. Flow cytometry was used to detect the cycle changes of SW1116 cells. Reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot were performed to measure the expression of P21, P27, Cyclin E1 and CDK2 at mRNA and protein level.

RESULTS: In comparison with those in control group, the percentages of G₁/G₀-phase cells were significantly increased after treatment with 2, 3, 4 g/L OM (24 h: 67.5% ± 0.1%, 69.5% ± 1.4%, 71.0% ± 1.0% vs 58.6% ± 0.4%, $P < 0.05$; 48

h: 68.5% ± 0.3%, 71.9% ± 0.9%, 78.0% ± 0.4% vs 58.8% ± 0.1%, $P < 0.05$); the mRNA and protein expression of Cyclin E1 was down-regulated while those of P21 and P27 were up-regulated ($P < 0.05$); the mRNA expression of CDK2 was lowered, but the protein expression of CDK2 had no significant changes ($P > 0.05$).

CONCLUSION: OM may inhibit the proliferation of SW1116 cells by blocking cell cycle, down-regulating the expression of Cyclin E1 and up-regulating the expression of P21 and P27.

Key Words: Colon cancer; Oxymatrine; Cell cycle; Flow cytometry; Reverse transcription polymerase chain reaction; Western blot

Lu LH, Ran ZH. Effects of oxymatrine on the expression of P21, P27, Cyclin E1 and CDK2 in human colon cancer cell line SW1116. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1353-1357

摘要

目的: 观察氧化苦参碱(OM)对人结肠癌细胞P21, P27, Cyclin E1及CDK2表达的影响, 研究其抑制细胞增殖的其他途径, 探讨OM抗肿瘤的作用机制。

方法: 培养人结肠癌细胞株SW1116, 以2, 3, 4 g/L OM作用24和48 h, 以流式细胞仪测定OM对SW1116细胞的周期阻断作用; 并采用RT-PCR、Western blot法测定细胞周期相关蛋白P21、P27、Cyclin E1和CDK2的表达水平。

结果: 与对照组相比, 不同浓度(2, 3, 4 g/L)OM可使细胞阻滞于G₁/G₀期(24 h: 67.5% ± 0.1%, 69.5% ± 1.4%, 71.0% ± 1.0% vs 58.6% ± 0.4%, $P < 0.05$; 48 h: 68.5% ± 0.3%, 71.9% ± 0.9%, 78.0% ± 0.4% vs 58.8% ± 0.1%, $P < 0.05$), 下调Cyclin E1的mRNA和蛋白表达水平($P < 0.05$), 上调细胞周期负调控因子P21、P27的mRNA及蛋白表达水平($P < 0.05$), 降低CDK2的mRNA水平而对其蛋白表达无影响。

■背景资料

氧化苦参碱(OM)是中药苦参的主要有效成分, 具有抗炎、抗心率失常、抗肿瘤、防止肝纤维化等作用。OM的临床前实验的研究将为OM正式进入临床应用做好铺垫, 深入的分子机制研究有利于明确其抗肿瘤的机制。

■相关报道

建议阅读《氧化苦参碱对人结肠癌细胞株SW1116杀伤作用的实验研究》。他证实OM对人结肠癌细胞株SW1116具有剂量依赖性的杀伤作用,可能通过影响hTERT及其上游基因的表达来抑制端粒酶活性,发挥其抗肿瘤作用。另外,正文中提到了两篇OM的临床应用的报道。

结论: OM可能通过阻滞细胞周期,降低Cyclin E1蛋白,上调P21、P27的基因表达,来发挥其抗肿瘤作用。

关键词: 结肠癌; 氧化苦参碱; 细胞周期; 流式细胞术; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹

陆丽华, 冉志华. 氧化苦参碱对人结肠癌细胞P21, P27, Cyclin E1及CDK2表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1353-1357

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1353.asp>

0 引言

氧化苦参碱(oxymatrine, OM), 分子式 $C_{15}H_{24}N_2O_2$, 是中药苦参的主要有效成分, 具有抗炎、抗心率失常、防止肝纤维化^[1]等多种作用。临床上, 它常用于治疗慢性乙型肝炎、肿瘤放化疗引起的白细胞低下等^[2]。近年来, OM的抗肿瘤作用被发现^[3]。OM对一些肿瘤细胞株具有很强的杀伤作用, 如人肝癌细胞株HepG2^[3]、人红白血病细胞株K-562^[3]等。动物实验提示, OM对鼠肝癌有一定的治疗作用^[4]。我们先前的研究已经证实OM对人结肠癌细胞株SW1116具有剂量依赖性的杀伤作用, 可能通过影响hTERT及其上游基因的表达来抑制端粒酶活性, 发挥其抗肿瘤作用^[5]。我们主要研究OM对人结肠癌细胞株SW1116细胞周期的阻断作用及其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株SW1116来自消化所实验室, OM为天晴复欣苦参素注射液, BRL RPMI1640完全培养液、TRIzol试剂均购自美国Gibco公司, 胰蛋白酶、HEPES、二甲亚砜均购自美国Sigma公司, 左旋谷氨酰胺(德国Merk公司), 四唑蓝(MTT)(北京鼎国生物技术有限公司), 氯仿、异丙醇、750 mL/L乙醇(均为分析纯试剂)均购于上海长城华美仪器化剂有限公司; MMLV逆转录酶、逆转录缓冲液均为美国Promega公司产品; 引物合成、oligo dT18均来自上海生工生物工程有限公司; dNTP、RNA酶抑制剂均购自华美生物工程公司。细胞总蛋白抽提试剂盒由上海睿星基因公司提供。BCA蛋白质定量试剂盒、ECL发光检测试剂盒均为Pierce Chemical公司的产品。一抗: 鼠抗人P21 mAb(610241)、鼠抗人P21 mAb(556430)均为BD公司产品, 鼠抗人Cyclin E1 mAb(CC05)购自

Calbiochem, CDK2为上海睿星基因公司产品。

1.2 方法 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640完全培养液, 于含50 mL/L CO_2 、950 mL/L空气的 CO_2 孵箱中, 在37℃、95%湿度条件下培养人结肠癌细胞株SW1116。不同浓度的OM作用于结肠癌细胞株SW1116细胞24 h和48 h, 以流式细胞仪测定OM对SW1116细胞的周期阻断作用; 并采用RT-PCR、Western blot法测定细胞周期相关蛋白P21, P27, Cyclin E1和CDK2的表达水平。

1.2.1 流式细胞术分析 取对数生长期的SW1116细胞, 按 1×10^7 细胞/L、每瓶5 mL接种于25 cm^2 培养瓶, 培养24 h后, 加入终浓度为2, 3, 4 g/L的OM, 对照组加入等量的RPMI1640培养液, 继续培养不同时间。2.5 g/L胰酶消化收集各组细胞, 用冷的PBS洗2次, 每次4℃ 1000 g离心5 min。去上清后加入4℃ PBS 0.5 mL, 充分混匀悬浮细胞, 计数制成 1×10^9 细胞/L $\times 1$ mL单细胞悬液。在震荡器上缓慢加入预冷的950 mL/L乙醇2 mL, 充分混匀。用PBS洗2次固定细胞, 加入RNA酶A(上海生工生物工程公司)100 kU/L, 37℃水浴摇床振荡30 min, 10 g/L含Triton X-100的碘化丙啶(Sigma)染色, 4℃避光30 min。尼龙网过滤, 流式细胞仪(COULTER EPICS XL)上样检测。

1.2.2 RT-PCR检测 (1)细胞总RNA的抽提、质检: SW1116细胞接种于25 cm^2 培养瓶, 24 h后分别加入终浓度为2, 3和4 g/L的OM, 对照组加入等量的RPMI1640培养液, 在不同时间点收取细胞, 吸去上清液, PBS洗3次。细胞总RNA的抽提采用TRIzol试剂(Gibco BRL), 根据说明书操作。RNA产物置-70℃冰箱保存备用。提取的RNA经分光光度计检测的 A_{260}/A_{280} 值为1.8-2.0, 从电泳结果来看, 其18S和28S条带都很清晰, 亮度比约为2:1, 说明总RNA纯度基本达到实验要求且无明显降解; (2)引物序列: 根据基因库中的基因序列, 采用Primer 5.0引物设计软件, 由计算机辅助设计, 并由上海生工生物工程公司分别合成针对P21, P27, Cyclin E1, CDK2, β -actin的PCR扩增引物(表1); (3)RT-PCR: 按二步法进行RT-PCR反应, 先将mRNA反转录为cDNA, 然后再以cDNA为模板进行PCR扩增反应: 取10 μ g总RNA样品+2 μ L Oligo(dT)18(0.5 g/L), 加入DEPC水至24 μ L, 70℃水浴5 min, 迅速转移至冰浴5 min, 快速离心后加入5 \times 逆转录缓冲液10 μ L+2 μ L 10 mmol/L dNTPMix(上海生工)+1 μ L RNA酶抑制剂(4×10^7 U/L)(华美生物公司)+M-MLV逆转录酶2 μ L(华美生物公司, 4×10^8 U/L), 加入DEPC

表 1 RT-PCR引物序列及反应条件

基因	引物序列	PCR扩增片段(bp)	反应条件
β -actin	5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3' 5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'	404	94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸10 min
P21	5'-TTG ATT AGC AGC GGA ACA-3' 5'-TAC AGT CTA GGT GGA GAA ACG-3'	270	94℃变性5 min; 94℃ 60 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环28次; 72℃延伸5 min
P27	5'-CAA GTA CGA GTG GCA AGA-3' 5'-TCC ATG AAG TCA GCG ATA-3'	492	94℃变性5 min; 94℃ 60 s, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环29次; 72℃延伸5 min
Cyclin E1	5'-CTG GAT GTT GAC TGC CTT GA-3' 5'-CCG CTG CTC TGC TTC TTA C-3'	359	94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸5 min
CDK2	5'-CCT TGT TTG TCC CTT CTA C-3' 5'-CAA ATC CAC CCA CTA TGA-3'	395	94℃变性3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸5 min

■创新盘点

关于OM对肿瘤的细胞周期的影响的报道罕见。本文探讨了OM对SW1116细胞的细胞周期的影响并深入到分子机制,发现OM可能通过阻滞细胞周期,降低Cyclin E1蛋白,上调P21、P27的基因表达,来发挥其抗肿瘤作用。

表 2 OM作用24和48 h后SW1116细胞的细胞周期分布(mean \pm SD, %)

分组	24 h			48 h		
	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M期	S期	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M期	S期
2 g/L	67.5 \pm 0.1 ^a	10.0 \pm 1.1	22.6 \pm 0.9 ^a	68.5 \pm 0.3 ^a	10.5 \pm 0.5	21.1 \pm 0.8 ^a
3 g/L	69.5 \pm 1.4 ^a	12.5 \pm 1.3	18.0 \pm 0.1 ^a	71.9 \pm 0.9 ^a	6.4 \pm 0.1	21.8 \pm 1.1 ^a
4 g/L	71.0 \pm 1.0 ^a	11.1 \pm 0.0	17.9 \pm 0.9 ^a	78.0 \pm 0.4 ^a	7.6 \pm 0.4	14.5 \pm 0.1 ^a
对照组	58.6 \pm 0.4	13.5 \pm 0.1	28.0 \pm 0.4	58.8 \pm 0.1	10.2 \pm 0.2	31.2 \pm 0.2

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

水至终体系50 μ L, 混匀, 置42℃水浴1 h, 95℃ 5 min终止反应。产物置于-20℃冰箱保存备用。取5 μ L PCR扩增产物加1 μ L 6 \times 上样缓冲液上样于含0.5 mg/L溴化乙锭的15 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 在紫外线下生物电泳图像分析系统(FR-200型, 上海复日生物公司)上观察结果并照相。

1.2.3 Western印迹试验 7个75 cm²瓶子收细胞, 分别计数, 按1 \times 10⁷细胞加200 μ L低盐细胞裂解液计算, 分别加入细胞裂解液4℃裂解1 h, 14 000 r/min 20 min, 收集上清。BCA蛋白质定量试剂测定蛋白质浓度。-70℃冰箱保存备用。适量的总蛋白质在120 g/L SDS-PAGE胶电泳分离后, 80 V电压电泳, 湿转1 h。牛奶封闭2.5 h, 分别用鼠源性单克隆抗体P21、P27、Cyclin E1及CDK2一抗与膜4℃孵育过夜。1 \times TBST洗涤30 min, 羊抗鼠的二抗与膜孵育30 min后洗涤30 min。用同样方法标记鼠单克隆抗体 β -actin作点样对照。Pierce Chemical检测试剂与膜作用后暗室曝光, X线片显影、定影。

统计学处理 所有实验均重复3次。数据用均数 \pm 标准差表示, 采用SPSS10.0统计软件包, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OM对SW1116细胞周期的影响 OM作用于SW1116细胞24 h时, G₀/G₁期细胞比例增加, S期细胞比例减少($P < 0.05$)。此种细胞周期改变也存在于OM作用于SW1116细胞48 h后($P < 0.05$, 表2)。

2.2 OM对SW1116细胞周期相关蛋白的mRNA表达量的影响 β -actin作为内参以保证在相等的mRNA含量下进行比较。与对照组相比, P21的表达量均有所升高($P < 0.05$)。P27在OM 2 g/L 24 h组表达无明显变化, 在2 g/L 48 h组表达升高($P < 0.05$), 更高浓度组表达也升高($P < 0.05$)。p27 mRNA的改变呈现明显的时间依赖性。Cyclin E1基因表达逐渐降低($P < 0.05$)。CDK2基因表达逐渐降低(OM 2 g/L 24 h组与对照组相比差异无统计学意义, 其余各组 $P < 0.05$)(图1)。

2.3 OM对SW1116细胞周期相关蛋白表达的影响 应不同浓度的OM干预人结肠癌细胞株SW1116, 运用Western blot法分别检测干预后24、48 h的蛋白表达情况, P21、P27的蛋白表达水平相比对照组明显增强($P < 0.05$), 呈时间、剂量依赖性。Cyclin E1的蛋白表达水平相比对照组明显呈时

■应用要点

此文为OM抗肿瘤的临床应用做好了铺垫,有助于阐明OM抗肿瘤的机制。

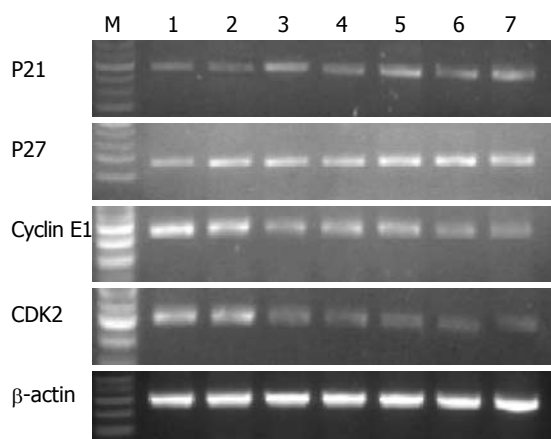


图1 OM对SW1116细胞P21, P27, Cyclin E1, CDK2 mRNA的作用。M: DNA ladder; 1: 对照组; 2-7: 2 g/L 24 h, 2 g/L 48 h, 3 g/L 24 h, 3 g/L 48 h, 4 g/L 24 h, 4 g/L 48 h。

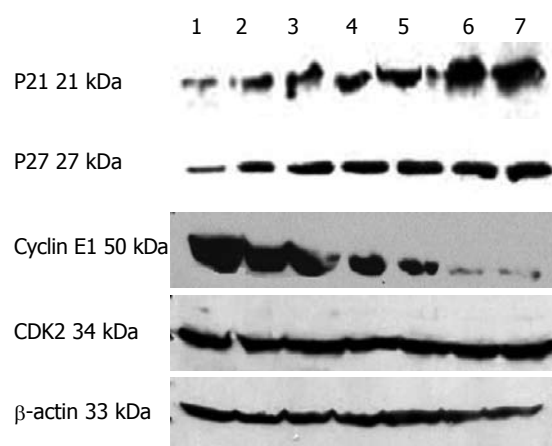


图2 OM对SW1116细胞P21, P27, Cyclin E1, CDK2蛋白表达的影响。1: 对照组; 2-7分别为2 g/L 24 h, 2 g/L 48 h, 3 g/L 24 h, 3 g/L 48 h, 4 g/L 24 h, 4 g/L 48 h。

间、剂量依赖性减弱($P < 0.05$)。与对照组相比, CDK2的蛋白表达无明显变化($P > 0.05$)(图2)。

3 讨论

结直肠癌的发病率占美国常见恶性肿瘤的第3位^[6]。结肠癌早期症状不明显, 只有部分患者有手术完全切除的机会, 化疗的疗效不高, 5 a生存率低^[7], 急需有效的新化疗药物应用于临床。OM可抑制部分肿瘤的增殖和转移, 在诱导肿瘤细胞分化、促进肿瘤细胞凋亡以及对分化和凋亡基因的调控上, 亦表现出一定的作用^[3]。他还能抑制肿瘤诱导血管内皮细胞增殖的作用, 同时其兼有升高白细胞、使免疫活性T细胞增多、提高机体免疫力的作用, 这是众多化疗药所不能比拟的^[8-9]。本实验旨在研究传统中药OM在抗肿瘤方面的独特效用, 为临床治疗结肠癌提供新的思路。

我们用流式细胞仪检测细胞周期来分析OM抑制结肠癌细胞增殖的原因。OM引起结肠癌SW1116细胞G₀/G₁期细胞比例增加, S期细胞比例减少($P < 0.05$)。这提示, OM作用于SW1116细胞后引起G₁/S期阻滞, 从而抑制其增殖。细胞周期分为4期(G₁、S、G₂、M期), 其中关键的两期为DNA合成(S)期和细胞分裂(M)期。细胞周期停滞(cell cycle arrest)是指正常细胞受到不当因素影响时, 主动停止在细胞周期的某一阶段, 以消除所受到的不利影响^[10]。近年来, 阻滞恶性肿瘤的细胞周期成了肿瘤治疗的一种新尝试^[11]。在高等真核细胞中, 细胞周期是由一组称为细胞周期蛋白(cyclin)与一组依赖于cyclin的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)来调控的。另有对CDK

活性起负调控作用的蛋白质称为CDK抑制蛋白(CKI), 包括CIP/KIP与INK4两大家族^[12], 可抑制CDK/Cyclins复合物的活性, 负性调节细胞进程。p21、p27属于CIP/KIP家族。

我们对OM导致细胞周期阻断于G₁/S期的分子机制作了进一步的研究。正常细胞中, Cyclin D1和CDK4先结合形成复合体, CDK4发挥激酶活性, 其先磷酸化pRb^[13]。之后, 进入S期必需的转录因子E2F从Rb-E2F复合体中解离^[14]。这促进G₁/S-Cyclin(即Cyclin E)的积累而刺激CDK2的活性, 从而激活另一些转录因子, 使与DNA合成有关的基因表达, 细胞即由G₁期进入S期^[15]。在结肠癌细胞株SW1116中, OM的药物干预可下调Cyclin E1的mRNA水平和蛋白表达, CDK2的蛋白表达无明显变化。我们认为OM影响了CDK2的基因转录而未参与其翻译过程, SW1116中CDK2蛋白的量未改变。这提示表达于G₁期晚期的Cyclin E1下调, 随之CDK2的活性下降, 导致细胞阻滞于G₁-S检测点。这与漆树黄酮(fisetin)干预人结肠癌细胞株HT-29, 引起G₁期阻滞, Cyclin E蛋白下调, CDK2蛋白水平无明显变化相符^[16]。除了周期蛋白和磷酸化对CDK活性进行调节外, CKI(如P21、P27)对CDK活性起负调控作用。P27和P21能抑制包括Cyclin E-CDK2在内的多种G₁期Cyclin-CDK激酶活性^[17], 使细胞不能通过G₁期^[18], 从而防止细胞过度增生形成肿瘤。P21的过表达可抑制哺乳动物的细胞增生。人结肠癌细胞株HT-29中, P21的过表达引起明显的细胞生长抑制^[19]。OM作为抗癌药物作用于SW1116细胞株后, P21的mRNA和蛋白表达明显增加。Galizia *et al*^[20]报道结肠癌患者中

P27表达下调, Claudio *et al*^[21]研究认为, P27的表达水平是 I -III期结肠癌患者根治术后无瘤生存期和总生存期的独立预后因素. 此研究认为, OM可使SW1116细胞中P27 mRNA和蛋白表达明显增加.

关于OM的临床应用已有少量的报道. 一组临床试验用吗特灵(苦参总碱注射液)治疗晚期恶性肿瘤79例, 完全缓解2例, 部分缓解19例, 有效率为26.58%. 吗特灵的毒副反应轻微(I度), 79例患者均能耐受, 不需特殊处理^[22]. 我国贵州的一组临床试验用复方苦参注射液(岩舒)治疗56例晚期癌症无化疗指征的患者(其中11例肺癌), 完全缓解0例, 部分缓解19例, 近期总有效率34%(19/56), 毒副反应较轻^[23].

总之, OM干预结肠癌SW1116细胞株后, 细胞周期阻滞于G₁期, 其降低Cyclin E1蛋白的表达水平, 上调P21、P27蛋白的表达. 本研究的结果提示OM的抗癌作用与其阻滞细胞周期、调节细胞周期相关蛋白的表达有关.

4 参考文献

- 1 Zhang MJ, Huang J. Recent research progress of anti-tumor mechanism matrine. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2004; 29: 115-118
- 2 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 49-52
- 3 王云, 龙发. 苦参抗肿瘤机制的研究进展. *现代肿瘤医学* 2005; 13: 280-282
- 4 Zhou AL, Zhu YJ, Hu YE, Mao JH, Jiang DR. Effect of acupoint-injection of oxymatrine on experimental hepatic carcinoma and study on the mechanism. *Zhongguo Zhen Jiu* 2007; 27: 48-52
- 5 Ananthakrishnan AN, Schellhase KG, Sparapani RA, Laud PW, Neuner JM. Disparities in colon cancer screening in the Medicare population. *Arch Intern Med* 2007; 167: 258-264
- 6 邹健, 冉志华, 许琦, 陈翔, 萧树东. 氧化苦参碱对人结肠癌细胞株SW1116杀伤作用的实验研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 207-211
- 7 Van Cutsem E, Costa F. Progress in the adjuvant treatment of colon cancer: has it influenced clinical practice? *JAMA* 2005; 294: 2758-2760
- 8 王兵, 王国俊, 徐钧. 氧化苦参碱对肿瘤诱导血管内皮细胞增殖的抑制作用. *实用肿瘤杂志* 2000; 15: 297-300
- 9 许相儒, 蒋纪恺. 苦参及其生物碱抗肿瘤活性研究进展. *中国中西医结合杂志* 1998; 18: 314-316
- 10 Freire R, van Vugt MA, Mamely I, Medema RH. Claspins: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell Cycle* 2006; 5: 2831-2834
- 11 Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1487-503
- 12 Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 1997; 29: 91-107
- 13 Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005; 24: 2909-2915
- 14 Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000; 14: 2393-2409
- 15 Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299: 35-55
- 16 Lu X, Jung J, Cho HJ, Lim DY, Lee HS, Chun HS, Kwon DY, Park JH. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 2005; 135: 2884-2890
- 17 Campanini F, Santucci MA, Brusa G, Pattacini L, Arpinati M, Rondelli D, Gamberi B, Barbieri E, Babini L, Tura S. Expression of P21(WAF1/CIP1/SID1) cyclin-dependent kinase inhibitor in hematopoietic progenitor cells. *Gene* 2001; 273: 173-180
- 18 Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1487-1503
- 19 Izawa H, Yamamoto H, Damdinsuren B, Ikeda K, Tsujie M, Suzuki R, Kitani K, Seki Y, Hayashi T, Takemasa I, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Monden M. Effects of p21cip1/waf1 overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells. *Int J Oncol* 2005; 27: 69-76
- 20 Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3490-3499
- 21 Claudio PP, Russo G, Kumar CA, Minimo C, Farina A, Tutton S, Nuzzo G, Giulianti F, Angeloni G, Maria V, Vecchio FM, Campli CD, Giordano A. pRb2/p130, vascular endothelial growth factor, p27(KIP1), and proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma: their clinical significance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3509-3517
- 22 朱嘉玲, 陈金钟. 吗特灵治疗晚期恶性肿瘤79例近期疗效观察. *山东医药* 2003; 43: 40-40
- 23 胡和平, 陈贵明. 复方苦参注射液治疗晚期恶性肿瘤56例. *临床医药实践* 2003; 12: 440-440

■同行评价

本文提出了比较有价值的研究发现, 在氧化苦参碱对人结肠癌细胞作用方面有重要贡献. 文章具有一定的科学性和可读性, 进一步充实了该领域的研究内容.

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

牛磺酸对大鼠移植胰腺缺血再灌注损伤的保护作用

张克忠, 刘永锋, 程颖, 刘树荣, 王凤山, 石蕊, 赵宁

■背景资料

缺血再灌注损伤是胰腺移植术后常见的病理生理过程, 是造成移植术后早期胰腺炎、移植胰腺的原发无功能、移植术后胰岛细胞功能不良等各种并发症的主要原因之一, 但其具体机制尚未完全阐明。目前认为胰腺缺血再灌注损伤是多种因素参与并相互作用的结果, 因此探讨其发生机制及防治措施具有重要的临床意义。

张克忠, 刘永锋, 程颖, 刘树荣, 王凤山, 石蕊, 赵宁, 中国医科大学附属第一医院普外一科暨器官移植科 辽宁省沈阳市 110001

张克忠, 在读博士, 研究方向为器官移植、肝胆外科。

通讯作者: 刘永锋, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普外一科暨器官移植科。

yfliu@mail.cum.edu.cn

电话: 024-23265284 传真: 024-23252007

收稿日期: 2007-02-10 接受日期: 2007-03-06

Protective effect of taurine against ischemia and reperfusion injury of transplanted pancreas in rats

Ke-Zhong Zhang, Yong-Feng Liu, Ying Cheng, Shu-Rong Liu, Feng-Shan Wang, Rui Shi, Ning Zhao

Ke-Zhong Zhang, Yong-Feng Liu, Ying Cheng, Shu-Rong Liu, Feng-Shan Wang, Rui Shi, Ning Zhao, Department of Surgery and Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Yong-Feng Liu, Department of Surgery and Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yfliu@mail.cum.edu.cn

Received: 2007-02-10 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of taurine (TAU) on the ischemia and reperfusion injury during pancreas transplantation and its mechanism in rats.

METHODS: Rat models of pancreatic-duodenal transplantation were used in this study. Thirty Wistar rats were randomly allocated into 3 groups ($n = 10$), including control group (CMU-1 preservation solution), experiment group A (CMU-1 + TAU 5 mmol/L) and experiment group B (CMU-1 + TAU 10 mmol/L) (The liquid CMU-1 is multi-organ preservation solution produced in our laboratory). Blood samples were collected 6 hours after reperfusion for examination of serum amylase level. Pancreatic tissues were collect for pathologic observation. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were determined by immunohistochemistry using integrated optical

density (IOD).

RESULTS: In comparison with that in control group, the level of serum amylase was increased 6 hours after reperfusion in experiment group A and B (911.2 ± 9.9 , 959.9 ± 12.5 U/L vs 1239.5 ± 68.3 U/L, both $P < 0.05$). The effect of TAU was enhanced with the increased of concentrations. Immunohistochemistry showed that both TNF- α and IL-1 β were expressed in pancreatic tissues 6 hours after transplantation, and TAU significantly inhibited TNF- α ($12\ 346.4 \pm 4933.69$, $16\ 016.33 \pm 4592.06$ vs $22\ 039.71 \pm 4782.62$, both $P < 0.05$) and IL-1 β ($12\ 417.4 \pm 2222.9$, $15\ 047.68 \pm 4484.4$ vs $19\ 284.46 \pm 3178.19$, both $P < 0.05$) expression in experiment group A and B. Taurine treatment markedly ameliorated the inflammatory reaction of pancreatic tissues.

CONCLUSION: As a kind of cell-protection agent, TAU can inhibit the production of TNF- α and IL-1 β , resist cell edema and alleviate ischemia/reperfusion-induced injury and pancreatitis.

Key Words: Taurine; Pancreas transplantation; Ischemia/reperfusion injury; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β ; Immunohistochemistry

Zhang KZ, Liu YF, Cheng Y, Liu SR, Wang FS, Shi R, Zhao N. Protective effect of taurine against ischemia and reperfusion injury of transplanted pancreas in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1358-1363

摘要

目的: 探讨牛磺酸在大鼠胰腺移植中对移植胰腺缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

方法: 采用大鼠胰十二指肠移植模型。Wistar大鼠30只随机分为三组($n = 10$): (1)对照组: CMU-1液保存6 h再移植; (2)实验组A: CMU-1液+牛磺酸(5 mmol/L)保存6 h再移植; (3)实验组B: CMU-1液+牛磺酸(10 mmol/L)保存6 h再移植(CMU-1液是本实验室配制的多器官保存液)。于移植术后6 h取静脉血作胰腺外分泌功能即血清淀粉酶测定, 取胰腺组织作病理检查。通过免疫组化染色观察炎性细胞因子

TNF- α 及IL-1 β 表达情况. 应用计算机图像分析系统测定其积分光密度值(IOD).

结果: 移植胰腺在通血后6 h血清淀粉酶均升高, 与对照组相比较, 加入牛磺酸后淀粉酶升高较对照组降低(911.2 ± 9.9 , 959.9 ± 12.5 U/L vs 1239.5 ± 68.3 U/L, $P < 0.05$). 随着牛磺酸浓度的增大其作用也显著. 免疫组化结果显示, 移植后6 h胰腺组织TNF- α ($12\ 346.4 \pm 4933.69$, $16\ 016.33 \pm 4592.06$ vs $22\ 039.71 \pm 4782.62$, $P < 0.05$ 及IL-1 β ($12\ 417.4 \pm 2222.9$, $15\ 047.68 \pm 4484.4$ vs $19\ 284.46 \pm 3178.19$, $P < 0.05$)在各组均表达, 但加入牛磺酸后能明显下调TNF- α 及IL-1 β 的表达, 各组内的差异具有显著性($P < 0.05$). 光镜检查可见试验组的移植胰腺炎症改变明显减轻.

结论: 牛磺酸作为一种细胞保护剂能够抑制TNF- α 和IL-1 β 的产生、抗细胞水肿, 减轻胰腺缺血再灌注损伤, 减轻胰腺炎症.

关键词: 牛磺酸; 胰腺移植; 缺血再灌注损伤; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 免疫组织化学

张克忠, 刘永锋, 程颖, 刘树荣, 王凤山, 石蕊, 赵宁. 牛磺酸对大鼠移植胰腺缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1358-1363

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1358.asp>

0 引言

缺血再灌注损伤是造成胰腺移植后各种并发症的主要原因之一, 如移植术后早期胰腺炎^[1]、移植胰腺的原发无功能、移植术后胰岛细胞功能不良等, 这些都大大降低胰腺移植的效果. 目前, 对缺血再灌注损伤的具体机制尚未完全阐明, 在这个过程中有多种因素参与, 如微循环灌注不良、细胞内酸中毒、钙超载、氧自由基的释放、中性粒细胞激活并释放炎症细胞因子等. 其中炎症性细胞因子如TNF- α ^[2]、IL-1 β 起关键作用, 炎症细胞因子大量释放可造成胰腺血管痉挛和损伤, 使毛细血管的内皮遭到破坏、大分子物质外渗和毛细血管床的减少, 进一步加重微循环障碍. 微循环障碍反过来又诱发了炎症介质的释放. 在保存液中加入各种细胞保护剂以减轻缺血再灌注损伤是器官移植研究的目标之一. 牛磺酸(taurine, TAU)是一种含硫氨基酸, 即2-氨基乙磺酸 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S} = 111.1343$). 几乎全部以游离形式存在, 细胞内外浓度比为100-50 000:1, 属于 β -

表 1 CMU-1液的成分

成分	成分	成分	成分
Na ⁺	125 mmol/L	棉子糖	25 g/L
K ⁺	25 mmol/L	右旋糖苷-40	50 g/L
H ₂ PO ₄ ⁻	25 mmol/L	组氨酸	60 mmol/L
乳糖醛酸	100 mmol/L	黏滞度	5.2 mpas
渗透压	340 mosm/L	pH值	7.4 \pm 0.2

氨基酸, 是一种细胞保护剂, 具有重要生物学作用: 清除氧自由基, 抗脂质过氧化损伤, 抑制细胞凋亡和直接的膜保护作用, 能够调节细胞钙稳态, 对线粒体结构和功能起稳定作用, 维持细胞内外渗透压平衡, 抑制细胞因子的产生^[3-5]. 我们通过大鼠胰十二指肠移植造成胰腺缺血再灌注损伤模型, 观察胰腺移植术后胰腺组织病理学变化、血清淀粉酶和细胞因子TNF- α 、IL-1 β 的变化, 探讨牛磺酸在大鼠胰腺移植中对移植胰腺缺血再灌注损伤的保护作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 取Wistar大鼠(体质量200-250 g, 购于中国医科大学实验动物部)30只随机分为3组($n = 10$): (1)对照组: CMU-1液保存6 h再移植; (2)实验组A: CMU-1液+牛磺酸5 mmol/L保存6 h再移植(牛磺酸购自北京奥博星生物技术责任有限公司); (3)实验组B: CMU-1液+牛磺酸10 mmol/L保存6 h再移植(CMU-1液是本实验室配制的多器官保存液)(表1).

1.2 方法 建立大鼠胰十二指肠移植模型, 于大鼠胰腺移植后6 h处死采静脉血检测血清淀粉酶, 取胰腺组织做病理学及免疫组化染色检测.

1.2.1 建立大鼠胰十二指肠移植模型 供体手术: 术前12 h禁食不禁水, 乙醚持续吸入麻醉, 腹正中切口开腹, 提起十二指肠并切断Treitz韧带, 由横结肠系膜上锐性剥离胰腺, 结扎切断结肠动静脉. 向右推开小肠, 提起胃, 结扎并切断胃左动脉和脾动脉. 于脾门部将脾动静脉一并结扎成束, 由大网膜剥离胰腺实质. 结扎切断胃网膜右动静脉和胃右动静脉. 于近端在胃幽门轮处结扎切断十二指肠, 远端于Treitz韧带处切断十二指肠. 游离胆管和肝动脉, 于近肝门处一并结扎切断. 将腹腔干及肠系膜上动脉分支处的腹主动脉周围的组织剔除, 游离腹主动脉, 并将包括腰动脉在内的分支全部结扎切断. 靠近胰腺将肠系膜上静脉结扎切断, 用直角钳在腹腔

■ 研发前沿

冷保存再灌注损伤及防治一直是胰腺移植领域的研究难点. 牛磺酸具有清除氧自由基, 抑制细胞凋亡, 调节细胞钙稳态, 维持细胞内外渗透压平衡, 抑制细胞因子的产生等药理学作用, 在移植领域的应用正日益受到人们的关注.

■创新盘点

本文首次证明了在保存液中加入牛磺酸后能明显抑制移植胰腺TNF- α 及IL-1 β 的表达,减轻移植胰腺的再灌注损伤,减轻胰腺炎症。

干分支处上1 cm阻断腹主动脉血流,于肠系膜上动脉分支处下方穿刺腹主动脉灌注胰腺,灌注高度60 cm,灌注液约4 mL,同时于肝门部门静脉分支处切断门静脉,胰腺颜色变白后,将胰腺取出,放入相应保存液中保存6 h后移植。受体手术:麻醉后用50 U/L的肝素生理盐水2 mL从尾静脉注射以肝素化,取腹正中切口开腹。钝性游离腹主动脉和下腔静脉的前面,用血管夹同时阻断腹主动脉和下腔静脉血流,用8-0丝线将供体胰腺复主动脉与受体腹主动脉作端侧吻合,门静脉与受体下腔静脉作端侧吻合。供通血前切除脾脏以减少血液丢失,用7-0丝线将供体十二指肠断端与受体空肠作端侧吻合,逐层关腹。胰腺移植术后6 h取腔静脉血并处死大鼠,取移植胰腺组织作病理及免疫组化。

1.2.2 胰腺外分泌功能检查 血清淀粉酶:采用碘淀粉酶比色法测定,100 mL血清中的淀粉酶在37℃条件下,15 min水解5 mg淀粉为一个单位。

1.2.3 组织病理学检查 取材-固定,经过脱水,二甲苯标本透明,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红染色,光镜下检查。

1.2.4 TNF- α 及IL-1 β 免疫组化染色 TNF- α 一抗BA0131购自武汉博士德生物工程有限公司,即用型非生物素免疫组化检测试剂盒KIT-9901,购自迈新生物技术有限公司。IL-1 β 一抗BA0962购自武汉博士德生物工程有限公司,免疫组化操作步骤按试剂盒说明书进行。免疫组化结果采用计算机图像灰度分析,以积分光密度值(IOD)作计量分析,每张片选4个视野。

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD表示,采用SPSS10.0软件方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺外分泌功能检测 胰腺移植通血6 h后血清淀粉酶对照组为1239.5 \pm 68.3 U/L,加入牛磺酸后淀粉酶较对照组降低,实验组A为959.9 \pm 12.5 U/L;实验组B为911.2 \pm 9.9 U/L,各组间差异具有显著性($P<0.05$)。实验结果表明大鼠胰腺移植时在保存液中加入牛磺酸后能抑制血清淀粉酶升高,且随着牛磺酸浓度的增大其作用也显著。

2.2 光镜观察 对照组移植后6 h可见胰腺间质充血水肿,血管周围有炎性细胞浸润,并且伴有出血,间隙增宽,腺泡受压萎缩,胰腺腺泡细胞内有空泡形成,并可见腺泡细胞死亡(图1A)。实验

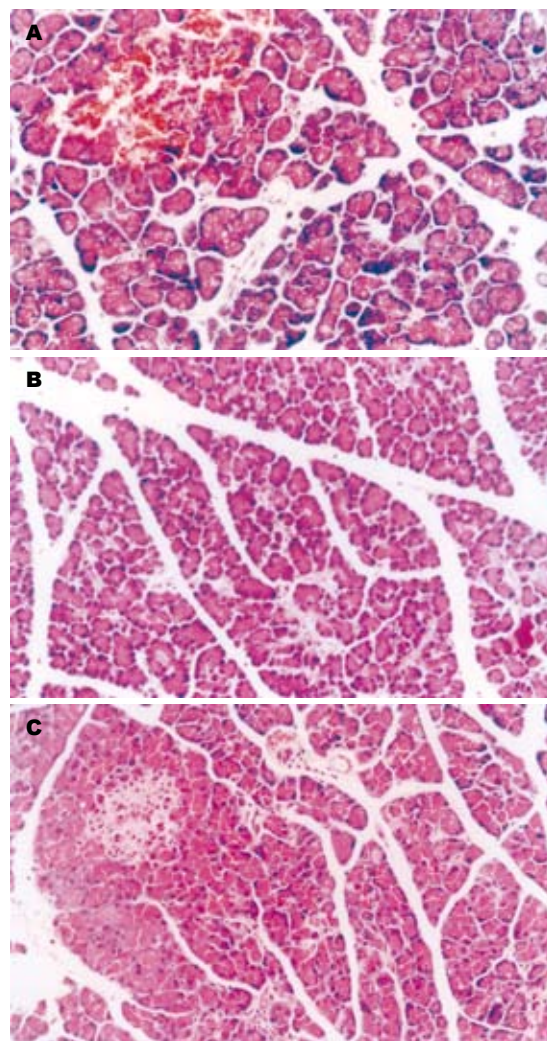


图1 大鼠胰腺移植(HE \times 200)。A: 对照组; B: 实验组A; C: 实验组B。

组A间质轻度水肿,腺泡轻度肿胀,无明显受压,无出血,在血管周围有少量炎症细胞浸润,腺泡细胞内无空泡形成,在相同时限内胰腺炎症明显减轻(图1B)。实验组B在光镜下与实验组A无明显差别(图1C)。

2.3 免疫组化测定 移植胰腺组织内TNF- α 及IL-1 β 的表达,移植后6 h胰腺组织的TNF- α 及IL-1 β 在各组间的表达均增多,其表达部位多位于细胞的胞质内,而且胰腺腺泡细胞、血管内皮细胞、胰岛细胞内均有表达(图2A,图3A),并且随着牛磺酸浓度的增加,TNF- α 及IL-1 β 的表达也逐渐减弱,表明加入牛磺酸后能明显抑制TNF- α 及IL-1 β 的表达且呈剂量依从关系(图2B-C,图3B-C),3组间的差异具有显著性($P<0.05$,表2)。

3 讨论

胰腺小叶为胰腺微循环形态与机能的基本单位,

■应用要点
牛磺酸作为药物的单体成分, 其化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确, 副作用很小, 目前已用于临床。

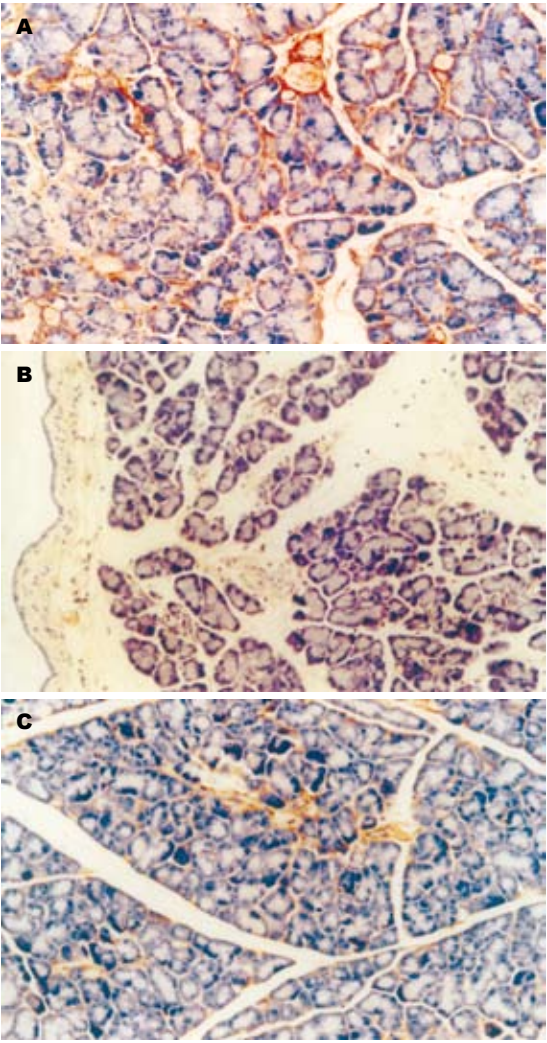


图 2 大鼠胰腺移植TNF- α (SABC $\times 200$). A: 对照组; B: 实验组A; C: 实验组B.

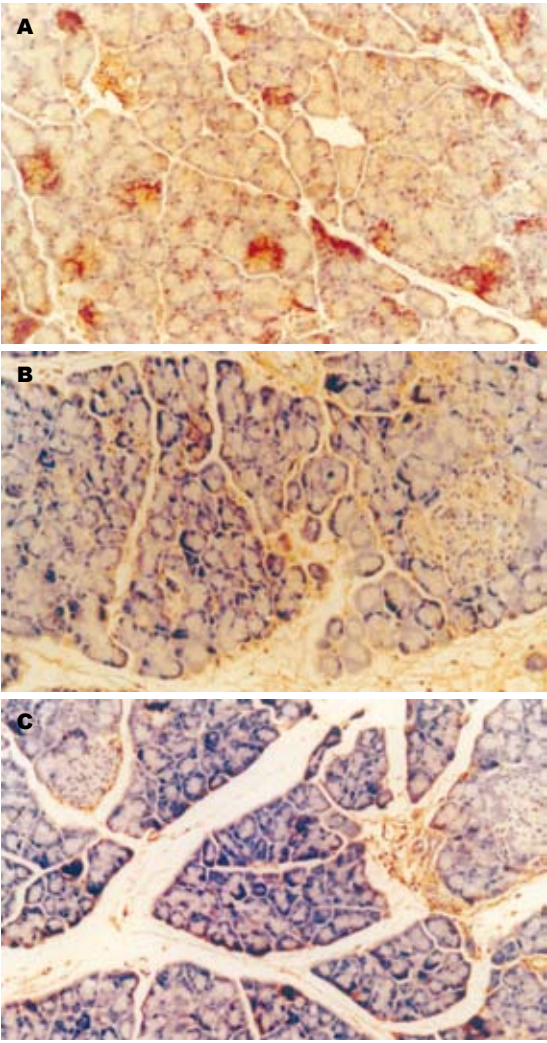


图 3 大鼠胰腺移植IL-1 β (SABC $\times 200$). A: 对照组; B: 实验组A; C: 实验组B.

胰腺微循环的流向是由内分泌部流向外分泌部, 胰岛-腺泡-门脉循环是胰腺微循环的基本特征. 胰腺小叶多由独支的小叶内动脉供血, 相邻小叶内动脉及其分支间无吻合存在, 属于终动脉. 由于胰腺的微循环结构特点, 对缺血缺氧特别敏感, 缺血再灌注损伤是胰腺移植后胰腺炎的主要因素, 在这个过程中氧自由基、巨噬细胞、中性粒细胞激活、细胞内酸中毒、微循环灌注不良、细胞内环境稳态破坏是缺血再灌注损伤的主要机制^[6]. 中性粒细胞激活后, 一方面游走黏附至静脉壁的血管内皮细胞形成血栓阻塞微血管减少血流, 造成微循环障碍, 导致胰腺水肿并进一步加重胰腺缺血^[7-8], 我们发现大鼠胰腺移植后胰腺明显的肿胀, 对照组大鼠胰腺通血后呈现暗红色, 术后6 h供体胰腺仍稍显暗红色. 实验组的大鼠胰腺在通血后呈现淡红色, 在术后6 h供体胰腺为淡红色. 3组大鼠在移植后

表 2 各组TNF- α 及IL-1 β 的IOD值		
	TNF- α	IL-1 β
对照组	22 039.71 \pm 4782.62	19 284.46 \pm 3178.19
实验组A	16 016.33 \pm 4592.06 ^a	15 047.68 \pm 4484.4 ^a
实验组B	12 346.4 \pm 4933.69 ^a	12 417.4 \pm 2222.9 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

血清淀粉酶均升高, 但实验组淀粉酶升高较对照组明显降低, 另外, 从移植胰腺的病理改变来看, 对照组大鼠在移植术后胰腺腺泡肿胀明显, 间隙增宽, 腺泡受压萎缩, 胰腺腺泡细胞内有空泡形成, 说明胰腺移植术后存在胰腺炎症改变. 加入牛磺酸后胰腺水肿明显减轻. 表明牛磺酸确实具有抗细胞水肿作用, 其机制可能与牛磺酸的跨细胞膜转运特性有关. 牛磺酸作为有机溶质分子, 是一种渗透调节物质. 高渗时, 牛磺

■名词解释

NF- κ B: 是促炎性细胞因子转录调节过程中重要的核转录因子。在静息细胞, I κ B与NF- κ B结合后组成p50-p65-I κ B三聚体复合物, 可阻止NF- κ B由胞质进入胞核, 使其以失活状态存在于细胞质中, TNF- α 及IL-1 β 可诱导I κ B蛋白被磷酸化, 使p50-p65-I κ B三聚体复合物解聚而激活NF- κ B, 使之快速易位进入核内, 与相应靶基因的启动子或增强子 κ B位点结合, 迅速诱导靶基因的转录。

酸跨膜转运至细胞内增加^[9-11]; 但是在实验组, 增加牛磺酸的浓度后移植胰腺的病理改变不十分明显, 这可能与细胞膜表面的牛磺酸转运体数量饱和有关。通过本实验也可以推测, 由于器官切取时存在热缺血和冷缺血, 细胞能量代谢降低, 必然导致细胞渗透压改变及细胞肿胀, 在保存液中加入牛磺酸, 由于细胞内外浓度差以及细胞内外渗透压差的关系使牛磺酸跨细胞膜转运至细胞内增多, 从而在再灌注后发挥其细胞保护效应。移植胰腺的缺血再灌注损伤与细胞因子的过度表达有关, 中性粒细胞和巨噬细胞被激活后可释放前炎症性细胞因子如TNF- α 及IL-1 β 。二者均是导致组织损伤的重要炎症介质^[12-13], 并且具有趋化性, 能够促进中性粒细胞的释放, 诱导单核细胞和多型核粒细胞浸润到炎症局部, 进一步促进TNF- α 及IL-1 β 的释放形成一种恶性循环, 进一步加重组织水肿、渗出和坏死等病理改变^[14-17]。TNF- α 可以同死亡受体TNFR1结合诱导胰岛凋亡^[18-19]。IL-1 β 可以同胰岛表面的受体IL-1 β R结合诱导NO合成增加, 并且通过诱导DNA条状断裂导致细胞死亡或者导致细胞凋亡^[20]。因此, 抑制TNF- α 及IL-1 β 的释放对减轻胰腺移植后的非特异性炎症反应及排斥反应均具有重要意义。我们在实验中发现, 胰腺经冷保存再移植后TNF- α 及IL-1 β 表达明显增多, 胰腺腺泡细胞、血管内皮细胞及胰岛细胞均能产生TNF- α 及IL-1 β 且存在于胞质内。表明胰腺移植术后早期胰腺炎与这两种细胞因子的表达增多相关。在保存液中加入牛磺酸后能明显抑制移植胰腺TNF- α 及IL-1 β 的表达, 且有剂量依从关系。可见牛磺酸通过抑制细胞因子的产生减轻胰腺炎症改变。其抑制细胞因子产生的机制可能是牛磺酸能够阻止I κ B-a降解, 从而阻止NF- κ B从细胞质向细胞核易位从而降低其活性, 减弱IL-1 β , TNF- α mRNA的转录, 减少细胞因子的表达^[21-22]。结合本实验结果表明牛磺酸作为胰腺移植的一种细胞保护成分是可行的。Mochizuki *et al*^[23]和Tappaz^[24]证明TNF- α 和IL-1 β 能够增加牛磺酸的摄取活性200%和160%。且随着时间的延长其摄取量也增加, 刺激24 h其摄取量达到高峰平台期, 且随着TNF- α 浓度的增加, 其摄取量也增加。可见TNF- α 不仅是移植后胰腺炎的始动因子, 另一方面也可以通过牛磺酸的转运增加, 发挥牛磺酸的生物学效应, 减轻移植胰腺的再灌注损伤。另外在中性粒细胞内牛磺酸通过髓过氧化物酶-卤化物系统和次卤酸反应

生成的氯牛磺酸也具有细胞保护效应, 其机制主要是通过阻止I κ B的磷酸化减弱NF- κ B的活性从而够阻止iNOS和TNF- α mRNA的合成, 抑制NO及TNF- α 的产生从而发挥抗氧自由基损伤^[25-27]。可见牛磺酸的生物学作用不仅通过其自身而且还通过其代谢产物来发挥的。此外牛磺酸还可以通过抑制氧化应激及抑制细胞凋亡减轻缺血再灌注损伤^[28-30]。Oriyanhan *et al*^[31]在心脏停跳液中加入牛磺酸能促进移植后心脏功能的恢复。可见牛磺酸通过多种机制减轻胰腺移植后的缺血再灌注损伤, 其机制是通过抑制DNA的氧化损伤和心肌细胞凋亡来实现的。

总之, TNF- α 和IL-1 β 在胰腺缺血再灌注损伤过程中起重要作用。牛磺酸作为一种细胞保护剂能够抑制TNF- α 和IL-1 β 的产生、抗细胞水肿, 减轻胰腺缺血再灌注损伤, 减轻胰腺炎症。本实验为在保存液中加入各种细胞保护剂以期减少移植术后并发症提高移植效果提供了一种实验依据。

4 参考文献

- 1 Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. Ischemia/Reperfusion-Induced pancreatitis. *Dig Surg* 2000; 17: 3-14
- 2 Morard M, Rocco P, Lima L, Miranda A, Madi K, Boasquevisque C. Therapeutic potential of a new TNF-alpha modulator and phosphodiesterases inhibitor on pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Rev Port Pneumol* 2006; 12: 27-28
- 3 Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C949-953
- 4 Ahn BO, Kim KH, Lee G, Lee HS, Kim CD, Kim YS, Son MW, Kim WB, Oh TY, Hyun JH. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Pharmacology* 2001; 63: 1-7
- 5 Hashiguchi Y, Fukushima R, Saito H, Naka S, Inaba T, Lin MT, Muto T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alter plasma concentration and interorgan fluxes of taurine in dogs. *Shock* 1997; 7: 147-153
- 6 Obermaier R, Benz S, Kortmann B, Benthues A, Ansoerge N, Hopt UT. Ischemia/reperfusion-induced pancreatitis in rats: a new model of complete normothermic in situ ischemia of a pancreatic tail-segment. *Clin Exp Med* 2001; 1: 51-59
- 7 Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 823-830
- 8 Puhl G, Schaser KD, Pust D, Kohler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 555-563
- 9 Deleuze C, Duvoid A, Moos FC, Hussy N. Tyrosine

- phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 2000; 523 Pt 2: 291-299
- 10 Warskulat U, Zhang F, Haussinger D. Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 1997; 26: 1340-1347
 - 11 Wettstein M, Haussinger D. Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26: 1560-1566
 - 12 Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, Billiar TR, Maeta H. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway. *Hepatology* 2006; 44: 573-580
 - 13 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* 2002; 36: 1231-1236
 - 14 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 132-144
 - 15 Denham W, Norman J. The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 767-781
 - 16 Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 401-410
 - 17 Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2004; 114: 877-883
 - 18 Ehrnfeldt C, Kumagai-Braesch M, Uzunel M, Holgersson J. Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes *in vitro*. *Xenotransplantation* 2004; 11: 184-194
 - 19 Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 2002; 51: 311-316
 - 20 Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Kloting I, Heinke P, Schmidt S. IL-1 β , IFN- γ and TNF- α increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun* 2003; 20: 303-312
 - 21 Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN. Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappaB in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 82-90
 - 22 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197-1208
 - 23 Mochizuki T, Satsu H, Shimizu M. Signaling pathways involved in tumor necrosis factor alpha-induced upregulation of the taurine transporter in Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 3069-3074
 - 24 Tappaz ML. Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res* 2004; 29: 83-96
 - 25 Liu Y, Tonna-DeMasi M, Park E, Schuller-Levis G, Quinn MR. Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated C6 glioma cells by suppressing inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59: 189-195
 - 26 Barua M, Liu Y, Quinn MR. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- α gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. *J Immunol* 2001; 167: 2275-2281
 - 27 Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc* 2006; 38: 3351-3357
 - 28 Takahashi K, Ohyabu Y, Takahashi K, Solodushko V, Takatani T, Itoh T, Schaffer SW, Azuma J. Taurine renders the cell resistant to ischemia-induced injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 726-733
 - 29 Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 277: C1229-1238
 - 30 Oz E, Sivrikoz MC, Halit V, Altunkaya A, Take G. The role of taurine added to pulmonary reperfusion solutions in isolated guinea pig lungs. *Amino Acids* 2002; 22: 391-403
 - 31 Oriyhan W, Yamazaki K, Miwa S, Takaba K, Ikeda T, Komeda M. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels* 2005; 20: 278-285

■同行评价

本文研究了牛磺酸对大鼠移植胰腺缺血再灌注损伤的保护作用, 立意新颖, 材料方法科学性强, 结果结论可信, 有较高的实用价值。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

丙酮酸乙酯对急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用

朱峰, 葛春林, 郭仁宣

■背景资料

急性肺损伤是急性坏死性胰腺炎最常见的胰外器官早期并发症。目前对其早期防治尚缺乏有效的手段, 本研究通过建立大鼠急性坏死性胰腺炎合并肺损伤模型, 观察丙酮酸乙酯延迟应用对急性坏死性胰腺炎肺损伤的作用并探讨其可能机制。

朱峰, 葛春林, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

朱峰, 医学博士, 主要从事重症急性胰腺炎诊治方面的研究。

通讯作者: 郭仁宣, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外二科。zhuzhufeng-7@163.com

电话: 024-83283330

收稿日期: 2006-12-06 接受日期: 2007-02-08

Protective effects of ethyl pyruvate against acute lung injury induced by acute necrotizing pancreatitis in rats

Feng Zhu, Chun-Lin Ge, Ren-Xuan Guo

Feng Zhu, Chun-Lin Ge, Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhuzhufeng-7@163.com

Received: 2006-12-06 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of ethyl pyruvate (EP) on the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) in serum and mRNA expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in lung tissues, and explore the mechanisms of ethyl pyruvate in protecting the lungs against acute injury induced by acute necrotizing pancreatitis (ANP).

METHODS: ANP model was induced by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into pancreatic duct. Animals were divided randomly into 3 groups: control group, ANP group, and EP treatment group. EP solution was administered intravenously every 6 hours (40 mg/kg once). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of HMGB1 in lung tissues was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The partial pressure of blood oxygen (PaO₂) was measured, and histological examination of the lungs was also performed.

RESULTS: The serum levels of TNF- α and IL-6 were rapidly increased after ANP model was induced, and reached peak at the 6th hour, but they were decreased at the 12th hour. In comparison with those in ANP group, the serum levels of TNF- α and IL-1 β were markedly lowered in EP group 6 and 12 hours after ANP model was induced (TNF- α : 131.6 \pm 29.6 ng/L vs 196.3 \pm 16.3 ng/L, 65.0 \pm 16.6 ng/L vs 90.2 \pm 20.1 ng/L, P < 0.05; IL-1 β : 194.9 \pm 26.8 ng/L vs 223.0 \pm 34.8 ng/L, 105.2 \pm 24.0 ng/L vs 130.4 \pm 23.0 ng/L, P < 0.05). The mRNA expression of HMGB1 in lung tissues was increased significantly at the 12th hour and maintained to the 24th hour after ANP model was induced, whereas in EP group, HMGB1 mRNA expression was significantly lower than that in ANP group at each time point (0.68 \pm 0.11 vs 0.88 \pm 0.11, 0.81 \pm 0.11 vs 1.04 \pm 0.10, 1.08 \pm 0.08 vs 1.33 \pm 0.15, all P < 0.05). The injury of lung tissues in EP group was milder than that in ANP group, and the value of PaO₂ was also obviously higher in EP group than that in ANP group (P < 0.05).

CONCLUSION: EP can inhibit the release of TNF- α and IL-1 β , down-regulate HMGB1 mRNA expression in lung tissues of ANP rats, and protect lungs from acute injury induced by ANP.

Key Words: High mobility group box 1; Acute necrotizing pancreatitis; Acute lung injury; Ethyl pyruvate; Enzyme-linked immunosorbent assay; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhu F, Ge CL, Guo RX. Protective effects of ethyl pyruvate against acute lung injury induced by acute necrotizing pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1364-1369

摘要

目的: 观察丙酮酸乙酯(EP)对急性坏死性胰腺炎(ANP)肺损伤大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肺组织高迁移率族蛋白B1(HMGB1) mRNA表达的影响, 探讨丙酮酸乙酯治疗急性坏死性胰腺炎肺损伤的机制。

方法: 逆行性胰胆管注射50 g/L牛磺胆酸钠制作ANP模型。随机分成3组, 对照组、ANP组和EP治疗组(40 mg/kg, 每隔6 h静脉注射一次)。ELISA法检测血清TNF- α 和IL-1 β 水平; 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肺组织HMGB1 mRNA表达, 并观察血氧变化及肺组织的病理变化。

结果: ANP组血清TNF- α 和IL-1 β 水平在建模后6 h达高峰, 12 h下降, 在此两时点治疗组血清TNF- α 和IL-1 β 水平明显低于ANP组(TNF- α : 131.6 ± 29.6 ng/L vs 196.3 ± 16.3 ng/L, 65.0 ± 16.6 ng/L vs 90.2 ± 20.1 ng/L, $P < 0.05$; IL-1 β : 194.9 ± 26.8 ng/L vs 223.0 ± 34.8 ng/L, 105.2 ± 24.0 ng/L vs 130.4 ± 23.0 ng/L, $P < 0.05$)。ANP组大鼠肺组织HMGB1 mRNA表达水平在ANP后12 h明显升高, 至24 h仍维持在高水平。治疗组肺组织HMGB1 mRNA表达水平在各时间点均明显低于ANP组(0.68 ± 0.11 vs 0.88 ± 0.11 , 0.81 ± 0.11 vs 1.04 ± 0.10 , 1.08 ± 0.08 vs 1.33 ± 0.15 , $P < 0.05$), 且同期肺损伤比ANP组轻。治疗组PaO₂均明显高于ANP组。

结论: 丙酮酸乙酯能显著抑制TNF- α 、IL-1 β 和HMGB1等早晚期炎症因子, 改善低氧血症, 对ANP肺损伤有明显保护作用。

关键词: 高迁移率族蛋白-1; 急性坏死性胰腺炎; 急性肺损伤; 丙酮酸乙酯; 酶联免疫吸附试验; 逆转录-聚合酶链反应

朱峰, 葛春林, 郭仁宣. 丙酮酸乙酯对急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1364-1369
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1364.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是普外科常见的、危重的急腹症, 除有局部的病理损伤表现外, 常伴有明显的全身炎症反应及并发多器官损伤, 其病死率可达10%-25%^[1-3]。其中急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是其常见并发症之一, SAP发病1 wk内死亡的患者, 60%死于ALI/ARDS或伴有ALI/ARDS的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[4], 防治肺损伤成为降低SAP死亡率的重要措施。促炎因子拮抗剂或抑炎因子协同剂的作用是近年来急性胰腺炎并发肺损伤的防治研究的热点。最近研究表明, 高迁移率族蛋白-1(high mobility

group box1, HMGB1)是相对于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)新的“晚期”炎症因子, 能给脓毒症带来更广的“治疗窗”^[5-6]。丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是一种稳定的亲脂性丙酮酸衍生物, 许多研究表明它具有抗炎和免疫调节作用^[7-8]。我们通过50 g/L牛磺胆酸钠逆行胰胆管内注射诱发大鼠急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)合并肺损伤模型, 观察丙酮酸乙酯对相关炎症因子的调节, 探讨丙酮酸乙酯对急性坏死性胰腺炎肺损伤的保护作用及其机制, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 丙酮酸乙酯和牛磺胆酸钠, Sigma公司; TNF- α , IL-1 β 的ELISA试剂盒, 深圳晶美公司; 总RNA提取及逆转录试剂盒, Promega公司; PCR仪及电泳仪; 凝胶扫描分析系统, 美国Kodak。♂清洁级健康Wistar大鼠72只, 体质量250-300 g(由中国医科大学实验动物中心提供)。随机分为3组, 每组24只, 分别为假手术组、ANP组及EP治疗组。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 大鼠于术前12 h禁食, 自由饮水, 100 g/L水合氯醛(4 mL/kg体质量)腹腔内注射麻醉, 固定。参照Aho *et al*介绍的方法逆行胰胆管内注射牛磺胆酸钠制作急性坏死性胰腺炎模型。行上腹部正中切口, 除假手术组仅开腹暴露胰腺并轻轻翻动外, 余2组动物在胆管近肝门端用小动脉夹暂时阻断胆汁流, 4.5号头皮针经十二指肠壁插入胰管开口处, 逆行加压注入50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg体质量, 推注速度为0.2 mL/s), 拔出穿刺针后动脉夹夹闭穿刺点约5 min, 见到部分胰腺明显水肿、出血后, 去除小动脉夹, 将各器官纳入正常解剖位置。分层关闭腹腔。各组按模型制备后6, 12, 24 h分成3个亚组, 每组8只。在上述时点分别采集动静脉血及切取双侧肺叶。

1.2.2 给药剂量及方式 EP治疗组分别于造模成功后2, 8, 14和20 h经阴茎静脉或股静脉注射EP溶液(EP溶于乳酸钠林格液中, 28 mmol/L), 6 h组给药1次, 12 h组给药2次, 24 h组给药4次; 每次剂量为EP 40 mg/kg。ANP组同时点注射等量的乳酸钠林格液。

1.2.3 主要检测指标及方法 (1)动脉血气分析: 于上述时点取抗凝股动脉血0.5 mL作血气分析, 采

■ 研发前沿

促炎因子拮抗剂或抑炎因子协同剂的作用是近年来急性胰腺炎并发肺损伤防治研究的热点, 但这些药物多针对单一靶点, 其应用可致炎症因子失衡进一步加重; 且这些药物的药代动力学和毒性效应也限制了其应用。近来在脓毒症中研究颇多且疗效明显的丙酮酸乙酯在急性胰腺炎及其器官功能损伤中的作用尚鲜有报道。

■创新亮点

本文的创新之处在于较系统地探讨了丙酮酸乙酯对急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用及其可能的作用机制,并表明丙酮酸乙酯在急性坏死性胰腺炎肺损伤发病后有较长的“治疗窗”。

表 1 各组动物血氧分压测定值及肺组织HMGB1 mRNA变化(mean ± SD, $n = 8$)

分组	血氧分压测定值(mmHg)			肺组织HMGB1 mRNA		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	88.62 ± 5.14	91.24 ± 5.42	93.10 ± 4.67	0.48 ± 0.08	0.57 ± 0.11	0.62 ± 0.06
ANP组	80.61 ± 8.97 ^a	72.75 ± 8.27 ^a	69.36 ± 9.90 ^a	0.88 ± 0.11 ^a	1.04 ± 0.10 ^a	1.33 ± 0.15 ^a
治疗组	85.43 ± 7.29	83.42 ± 7.72 ^{ac}	80.35 ± 7.87 ^{ac}	0.68 ± 0.11 ^{ac}	0.81 ± 0.11 ^{ac}	1.08 ± 0.08 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs ANP组。

表 2 各组动物血清TNF- α 及IL-1 β 检测结果(mean ± SD, ng/L)($n = 8$)

分组	血清TNF- α 检测值			血清IL-1 β 检测值		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	55.7 ± 17.3	37.7 ± 12.2	28.5 ± 11.8	59.1 ± 7.9	48.8 ± 7.6	46.9 ± 8.1
ANP组	196.3 ± 16.3 ^a	90.2 ± 20.1 ^a	82.7 ± 28.8 ^a	223.0 ± 34.8 ^a	130.4 ± 23.0 ^a	113.3 ± 24.8 ^a
治疗组	131.6 ± 29.6 ^{ac}	65.0 ± 16.6 ^{ac}	60.5 ± 18.3 ^a	194.9 ± 26.8 ^{ac}	105.2 ± 24.0 ^{ac}	89.9 ± 21.9 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs ANP组。

用全自动进口血气分析仪测定动脉血氧分压; (2)血清TNF- α , IL-1 β 的检测: 于上述时点大鼠100 g/L水合氯醛(4 mL/kg体质量)腹腔内注射麻醉开腹, 下腔静脉采血, 室温下静置2 h, 待析出血清后, 将血清分装冻存于-80℃待检测。采用ELISA法检测各时点血清TNF- α 和IL-1 β 水平, 具体操作步骤按说明书进行; (3)肺组织HMGB1 mRNA表达水平: 采用逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测肺组织中HMGB1 mRNA的表达, 以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内对照。大鼠HMGB1序列(扩增片段为680 bp): 5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3'(上游); 5'-AATTCATCATCATCATCTTCT-3'(下游); GAPDH序列(扩增片段为309 bp): 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'(上游); 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'(下游)。PCR反应条件如下: 94℃预变性3 min, 94℃ 45 s, 61℃ 40 s, 72℃ 1 min, 扩增35个循环, 72℃延伸10 min, 4℃终止反应。取10 μ L扩增产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳(120 V, 45 min), 溴化乙锭染色后, 于凝胶成像分析系统(GDS-8000)中进行条带密度扫描分析, 以HMGB1与GAPDH条带密度比值表示HMGB1 mRNA的表达水平。

1.2.4 肺组织病理形态观察 肺组织40 g/L中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色。光镜下专人阅片行组织学观察。肺脏组织病理学评分参照雷文章^[9]和Osman *et al*^[10]标准。

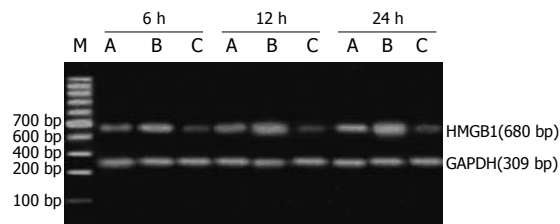


图 1 HMGB1 mRNA在3组大鼠肺组织中的表达(RT-PCR)。A: 治疗组; B: ANP组; C: 对照组。

统计学处理 数据均以mean ± SD表示。统计采用SPSS10.0软件, 单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 血气分析中血氧分压测定结果 ANP组和EP治疗组的血氧分压随制模后时间的延长而降低。同一时间点的血氧分压水平, ANP组和EP治疗组均明显低于假手术组; 而EP治疗组均较ANP组为高, 且在12及24 h组有显著性差异(表1)。

2.2 肺组织中HMGB1 mRNA表达水平的变化 ANP组大鼠肺组织HMGB1 mRNA水平在ANP后12 h明显升高, 至24 h仍维持在高水平。经丙酮酸乙酯延迟治疗, 治疗组肺组织HMGB1 mRNA水平均明显低于ANP组($P < 0.05$)(表1, 图1)。

2.3 血清TNF- α 和IL-1 β 水平的变化 ANP组大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平在ANP后迅速升高, 约在6 h达高峰, 之后迅速下降, 在ANP后12 h即大

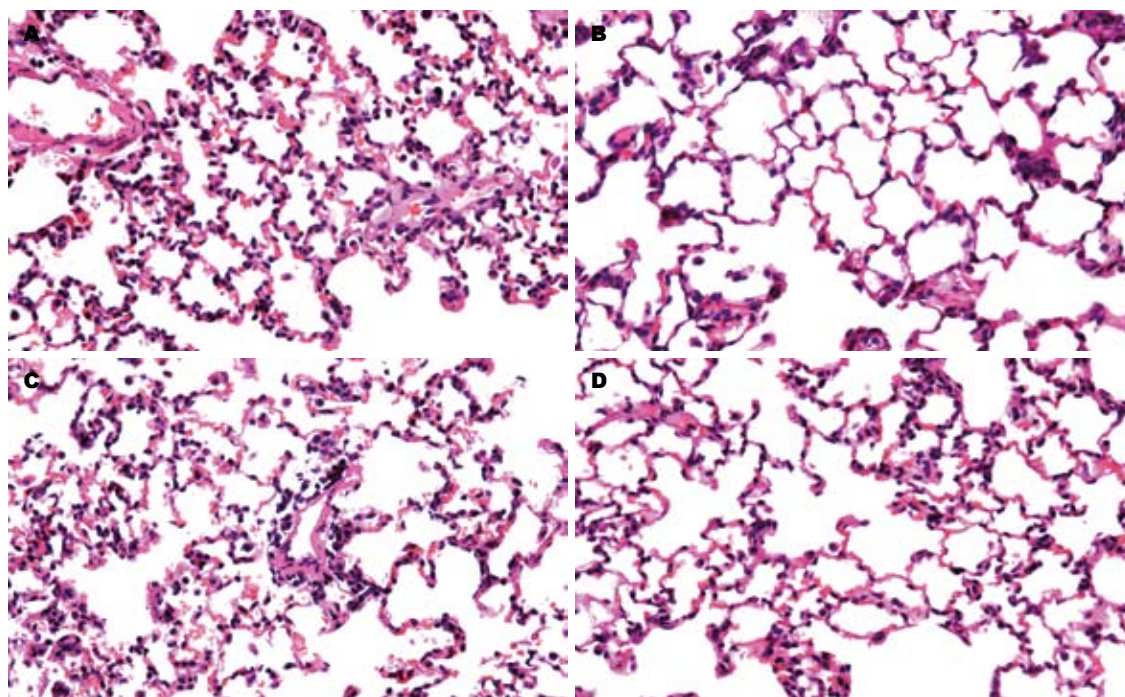


图2 肺组织病理变化($\times 400$). A, C: ANP组12, 24 h; B, D: 治疗组12, 24 h.

■应用要点

本研究结果表明丙酮酸乙酯延迟应用能够减轻急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤, 为其在急性坏死性胰腺炎肺损伤治疗中的应用提供理论基础和实验依据, 也为急性坏死性胰腺炎肺损伤的防治提供了新的思路.

幅下降, 然后一直维持至24 h. 经丙酮酸乙酯延迟治疗, 血清TNF- α 和IL-1 β 水平均低于ANP组, 且在6, 12 h差异显著($P>0.05$, 表2).

2.4 丙酮酸乙酯延迟治疗对ANP大鼠肺组织损伤的影响 假手术组各时点肺脏光镜下未见明显的形态学改变. ANP组及EP治疗组病理改变均随制模后时间延长而加重. ANP组肺脏光镜下见早期肺泡大小不一, 肺泡壁局灶性增厚, 肺静脉及毛细血管充血, 间质充血水肿及炎性细胞浸润, 肺泡内可见炎性细胞及红细胞. 24 h可见肺组织结构紊乱, 局部可见肺泡壁完全性破坏, 断裂、融合成肺大泡或形成局灶性肺不张, 部分标本有间质及肺泡腔出血; EP治疗组与ANP组相比, 肺组织损伤明显减轻(图2).

3 讨论

有研究结果显示, ANP早期大量炎症因子过度释放导致严重的全身炎症反应综合征(SIRS), 是造成全身毛细血管渗漏综合征、多器官功能不全综合征(MODS)、多器官功能衰竭(MOF)的重要原因. 这些炎症因子包括TNF- α , IL-1 β 和HMGB1等. 急性肺损伤是ANP最常见的胰外器官早期并发症. 过度增加的促炎细胞因子对肺脏等器官是有害的, 因此, 在ANP时探索合理的免疫调节治疗策略是必要的.

丙酮酸乙酯是一种稳定的亲脂性的丙酮酸

衍生物, 是有效的氧自由基清除剂^[11-12], 在医学领域的应用很广泛. 近期研究提出, 丙酮酸乙酯是一种有效的抗炎药物^[13-14], 对脓毒症引起的SIRS组织损伤有显著保护作用. 他可抑制内毒素诱导的巨噬细胞内TNF- α 和HMGB1的表达, 并且可能与调节NF- κ B和p38-MAPK细胞信号通路有关^[15]. 既往普遍认为, TNF- α 和IL-1 β 等在全身性炎症反应的早期迅速合成释放, 是引起机体失控性炎症反应和组织损害的关键介质, 故称早期细胞因子^[16-17]. 本实验结果显示, ANP组大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平在ANP后迅速升高, 约在6 h达高峰, 之后迅速下降, 在ANP后12 h即大幅下降, 然后一直维持至24 h. 经丙酮酸乙酯延迟治疗, 血清TNF- α 和IL-1 β 水平均低于ANP组, 且在6, 12 h差异显著. 既往研究表明外源TNF- α 和IL-1 β 可引起明显的组织损伤, 早期应用相应抗体可减轻肺损伤的程度^[18-19], 但临床治疗难以做到早期或预防性干预, 治疗的时机很难把握.

高迁移率族蛋白(HMG)是一大类高度保守的蛋白质, 分子量较低(30 kDa), 带电荷氨基酸含量丰富, 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移迅速而得名^[20]. HMGB1是HMG家族成员之一, 既往的研究表明, HMGB1是细胞核内含量最丰富的非组蛋白染色质蛋白, 他可参与DNA复制、细胞分化及基因表达等多种细胞生命活

■名词解释

HMGB1: 是细胞核内含量丰富的非组蛋白染色质蛋白, 近来研究表明HMGB1是脓毒症发病时重要的迟发炎症介质, 他可能成为脓毒症防治切实可行的干预目标, 能给脓毒症和其他SIRS提供更广的治疗窗。

动^[21]。最近有研究发现, 细胞经内毒素刺激后, 可将HMGB1分泌到细胞外, 介导了内毒素的致死效应。由于内毒素攻击后HMGB1的产生明显晚于其他介质并持续时间较长, 故被称为脓毒症的“晚期”介质^[22]。HMGB1通过两种不同的途径释放至细胞外: 活化的单核/巨噬细胞的主动分泌和坏死细胞的被动释放^[5,23], 同时存在内源危险信号的两种不同释放机制说明了HMGB1作为内源性炎症介质的重要性。与TNF- α 和IL-1 β 等早期细胞因子相比, HMGB1出现较晚且持续时间更长, 因而可能成为脓毒症防治切实可行的潜在干预目标^[24-25], 能给脓毒症和其他SIRS提供更广的治疗窗。本实验结果显示, ANP组大鼠肺组织HMGB1 mRNA水平在ANP后12 h明显升高, 至24 h仍维持在高水平, 这可能与炎症时中性粒细胞在肺组织募集有关^[26]。经丙酮酸乙酯延迟治疗, 治疗组肺组织HMGB1水平12和24 h明显低于ANP组($P<0.05$)。同时同一时间点的血氧分压水平, EP治疗组均较ANP组为高, 且在12及24 h组有显著性差异, 且EP治疗组与ANP组相比, 肺组织损伤明显减轻。

本研究表明, 丙酮酸乙酯能明显抑制ANP肺损伤早期和晚期炎症细胞因子的释放或表达, 减轻肺组织病理损伤程度, 与专门调控单一细胞因子的重组蛋白相比, 丙酮酸乙酯在ANP肺损伤发病后有较长的“治疗窗”, 无潜在的免疫反应, 无细胞毒性, 这些优点充分说明, 丙酮酸乙酯对ANP肺损伤的防治具有良好应用前景。鉴于目前所有的治疗经验都来自动物实验, 所以对丙酮酸乙酯的抗炎作用机制和安全性仍需作进一步研究。

4 参考文献

- Pitchumoni CS, Patel NM, Shah P. Factors influencing mortality in acute pancreatitis: can we alter them? *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 798-814
- Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B. Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 50-60
- Mayerle J, Hlouschek V, Lerch MM. Current management of acute pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 473-483
- Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285:

248-251

- Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock* 2001; 15: 247-253
- Yang R, Han X, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol-induced liver injury and inflammation in mice. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 322-331
- Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int* 2003; 64: 1620-1631
- 雷文章, 韦靖江, 沈文律, 金立人. 实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系. *中华实验外科杂志* 1995; 12: 131-132
- 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
- Dobsak P, Courderot-Masuyer C, Zeller M, Vergely C, Laubriet A, Assem M, Eicher JC, Teyssier JR, Wolf JE, Rochette L. Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 651-659
- Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 307-316
- Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *Crit Care Med* 2003; 31: S51-56
- Venkataraman R, Kellum JA, Song M, Fink MP. Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide-induced shock. *Shock* 2002; 18: 507-512
- Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12351-12356
- Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 40: 1-4
- Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546-552
- Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Repine JE. Tumor necrosis factor induced acute lung leak in rats: less than with interleukin-1. *Inflammation* 1996; 20: 461-469
- Yoshinari D, Takeyoshi I, Koibuchi Y, Matsumoto K, Kawashima Y, Koyama T, Ohwada S, Morishita Y. Effects of a dual inhibitor of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit Care Med* 2001; 29: 628-634
- Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth*

- Factor Rev* 2006; 17: 189-201
- 21 Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 152-153
- 22 Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Treutiger CJ. The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 231-236
- 23 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195
- 24 Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Crit Care Med* 2003; 31: S46-50
- 25 Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 2950-2954
- 26 Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, Mitra S, Kwak SH, Yamada S, Maruyama I, Ishizaka A, Abraham E. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L958-965

■同行评价

本文研究了丙酮酸乙酯对急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用, 论文书写规范, 逻辑清楚, 参考文献引用也比较新颖, 有着实际的指导意义。

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 •

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在新疆乌鲁木齐市召开“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。会议将出论文集汇编,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。

持续释放人血管抑素的基因修饰化工程细胞hE/293细胞株的建立

赵卉, 潘静坤, 罗芸, 田磊, 薛毅珑

■背景资料

近年来的研究发现, 血管新生(angiogenesis)是绝大多数实体瘤维持其恶性进展所必需的, 这为肿瘤的治疗提供了一条新的思路, 并形成了抗肿瘤血管生成疗法。到目前为止, 多种血管形成抑制因子已被分离纯化并对其抑制肿瘤的作用进行了研究, 其中一些因子已经进入临床试验有希望在肿瘤治疗领域发挥重要作用。

赵卉, 潘静坤, 罗芸, 田磊, 薛毅珑, 中国人民解放军总医院老研所细胞室 北京市 100853

赵卉, 2004年石河子大学医学院硕士, 2005年至今中国人民解放军总医院博士在读, 主要从事生物型人工器官在临床的应用方面的研究。

通讯作者: 薛毅珑, 100853, 北京海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院老研所细胞室. xueyl@plagh.com
电话: 010-66937914

收稿日期: 2007-02-09 接受日期: 2007-03-17

Construction of gene engineered hE/293 cells continuously releasing human endostatin

Hui Zhao, Jin-Kun Pan, Yun Luo, Lei Tian, Yi-Long Xue

Hui Zhao, Jin-Kun Pan, Yun Luo, Lei Tian, Yi-Long Xue, Institute of Geriatrics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yi-Long Xue, Institute of Geriatrics, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, HaiDian District, Beijing 100853, China. xueyl@plagh.com

Received: 2007-02-09 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To express the recombinant eukaryotic expression vector containing human endostatin gene in human embryonic kidney HEK293 cells, and construct a cell line continuously secreting human endostatin (hES).

METHODS: Human endostatin cDNA containing interleukin-2 (IL-2) secreting peptide was cloned into eukaryotic expression plasmid pSNA2 to construct the recombinant plasmid pSNA2/endostatin. The plasmid pSNA2/endostatin was transfected into HEK293 cells by cationic liposome. The positive cell clones were selected by G418 and then named hE/293 cells. The expression of endostatin protein was analyzed by Western blot. The release of biologically active endostatin was confirmed using assays of ECV304 proliferation and the angiogenesis experiment of chicken chorioallantoic membrane (CAM).

RESULTS: Enzyme digestion and sequence

analysis confirmed that the eukaryotic expression vector pSNA2/endostatin had been successfully constructed. After G418 selection, 3 strains of cells stably expressing hES were obtained, named as hE/293 cells. Western blot showed that ES protein with a molecular weight of 20 kDa existed in the supernatant of hE/293 cells. No endostatin expression was found in the control cells. The assays of ECV304 proliferation showed that the supernatant of hE/293 cells inhibited ECV304 cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor in comparison with that of HEK29 cells (48 h: 0.125 ± 0.007 vs 0.159 ± 0.020 , $P < 0.01$; 72 h: 0.088 ± 0.016 vs 0.249 ± 0.070 , $P < 0.01$). There were fewer blood vessels in the CAM treated with ES protein.

CONCLUSION: Target cell line hE/293 is successfully constructed which it can stably secrete hES protein, inhibit the ECV304 cell proliferation and CAM angiogenesis.

Key Words: Endostatin; Eukaryotic expression vector; HEK293 cell; hE/293 cell

Zhao H, Pan JK, Luo Y, Tian L, Xue YL. Construction of gene engineered hE/293 cells continuously releasing human endostatin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1370-1375

摘要

目的: 在人胚肾HEK293细胞中转染真核表达载体pSNA2/hEndostatin (hEndostatin, 人血管抑素), 建立能稳定分泌hES的基因工程细胞株。

方法: 将含有IL-2分泌肽的人endostatin(ES)全长cDNA插入真核表达载体pSNA2, 产生重组质粒pSNA2/hEndostatin; 利用阳离子脂质体介导将其转染入HEK293细胞中; 用G418筛选出阳性克隆细胞, 将其命名为hE/293细胞。用Western blot法检测hE/293细胞培养上清中分泌的hES蛋白。血管内皮细胞(ECV304)增殖抑制试验及鸡胚尿囊膜试验观察其分泌的hES蛋白的抗增殖活性。

结果: 经过双酶切和DNA测序证实构建出了含hES基因的真核表达载体. 通过G418抗性筛选筛选出稳定表达hES的细胞株3株, 将其命名为hE/293细胞; Western blot检测该细胞株培养上清中存在分子量为20 kDa的ES蛋白; ECV304增殖抑制试验显示, 与HEK293细胞组相比, hE/293细胞组分泌的ES蛋白对bFGF刺激的血管内皮细胞增殖有明显的抑制作用(48 h: 0.125 ± 0.007 vs 0.159 ± 0.020 , $P < 0.01$; 72 h: 0.088 ± 0.016 vs 0.249 ± 0.070 , $P < 0.01$); 鸡胚尿囊膜试验证实hE/293细胞分泌的ES蛋白可以抑制鸡胚尿囊膜血管生长.

结论: 所构建的hE/293细胞株可以稳定的分泌hES蛋白, 并能抑制ECV304细胞生长及鸡胚尿囊膜血管生长.

关键词: 人内皮抑素; 真核表达载体; 人胚胎肾细胞; hES细胞株; Western blot

赵卉, 潘静坤, 罗芸, 田磊, 薛毅珑. 持续释放人血管抑素的基因修饰化工程细胞hE/293细胞株的建立. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1370-1375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1370.asp>

0 引言

肿瘤的生长必须依赖于新生血管形成, 抑制肿瘤血管的生成可以抑制肿瘤的生长和转移, 这为肿瘤的治疗提供了一条新的思路, 并形成了抗肿瘤血管生成疗法^[1-2]. 近年来人们发现了大量的抗血管生成复合物, 其中有许多已经在试验研究中显示了抗血管生成活性^[3-4]. 在目前发现的内源性血管生成抑制因子中以内皮抑素(endostatin, ES)最引人瞩目. ES是1997年O'Reilly *et al*^[5]从鼠血管内皮瘤(EOMA)细胞的培养液上清中分离到一种分子量为20 kDa左右的蛋白, 对血管内皮细胞有特异性生长抑制作用. 大量研究发现, ES能在一定浓度范围内(100-600 mg/L)特异性的抑制内皮细胞增殖并表现出剂量依赖性, 对静止的细胞、正常的细胞、发生转化的细胞及瘤细胞无明显影响^[6]. Bergers *et al*^[7]发现, 无论在预防期(实体瘤开始形成)、干扰期(实体瘤已形成)还是抑制晚期(肿瘤晚期), ES都能抑制血管生成的启动及进一步生长. 我们成功的构建了分泌型人内皮抑素的真核表达载体pSNA2/endostatin, 将其转染到人胚胎肾细胞系HEK293中, 为进一步利用该基因进行细胞移植治疗奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人携带血管内皮抑素基因的质粒pAVV-hEndostatin质粒由哈佛大学教授馈赠, 含人IL-2信号肽, IL-2信号肽加内皮抑素序列endostatin cDNA全长为672 bp; 真核表达载体pSNA2.0质粒由解放军总医院消化内科徐世平主任馈赠, 全长7.1 kb; PCR、RT-PCR试剂盒为TaKa公司产品; DH-5 α 感受态细胞购于北京京科宏达公司; 无内毒素质粒大提试剂盒、DNA快速纯化/回收试剂盒、LipofectamineTM2000细胞转染试剂盒购自Invitrogen公司, DMEM培养基购于Gibco公司, HEK293细胞由军科院王嘉宁博士馈赠; 引物合成由上海生工合成, 测序由英俊公司完成; 鼠抗人endostatin抗体购自R&D公司, 二抗购自武汉博士德公司; G418购自Promega公司, SPF级鸡胚购自维通利华.

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 pSNAV2.0和pAVV-hEndostatin质粒各1 μ g以EcoR I 和Bgl/II 双酶切, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定, DNA凝胶回收试剂盒回收pSNAV2.0质粒酶切产物的7.1 kb片段和pAVV-hEndostatin质粒酶切产物的672 bp片段. 取pSNAV2.0质粒酶切产物7.1 kb片段1 μ L, pAVV-hEndostatin质粒酶切产物672 bp片段7 μ L, T4 DNA连接酶Buffer 1 μ L, T4 DNA连接酶1 μ L, 16 $^{\circ}$ C水浴连接过夜. 取5 μ L连接产物热休克法转化入感受态大肠杆菌DH-5 α , 次日挑取单克隆培养, 接入5 mL Amp LB培养基, 37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜, 取3 mL菌液提取质.

1.2.2 构建后表达质粒鉴定 (1)EcoR I +Bgl/II 双酶切鉴定目的片段, 将构建好的质粒命名为pSNA2-hEndostatin. 质粒5 μ L稀释于含Bgl/II 限制酶10 U, EcoR限制酶10 U缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C水浴酶切4 h. 行10 g/L琼脂糖凝胶电泳, BIO-RAD凝胶成像系统下观察结果; (2)PCR鉴定插入目的片段. 引物1: 5'-CGAATTCGCGGGCGGCCGCTC, 引物2: 5'-TCTGCATTGAGAACAGCTTC(上海基康合成). 反应总体积25 μ L: 连接产物pSNAV2.0-hEndostatin质粒0.1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, 引物20 pmol/L各0.4 μ L, dNTP 1.6 μ L, 无菌去离子双蒸水15.2 μ L, Taq酶0.3 μ L(Promega). 采用BIO-RAD扩增仪, 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 56 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min. 反应完毕取PCR产物5 μ L 20 g/L琼脂糖凝胶电泳; (3)测序鉴定目的片段. 将培养

■ 研发前沿

内皮抑素(endostatin, ES)是目前发现的作用最强的内源性血管抑制因子, 其研究主要集中在以下几个方面: 利用基因工程表达的重组蛋白开发为抗肿瘤药物, 内皮抑素基因治疗, 腹膜内植入渗透泵持续释放ES.

■相关报道

最近有报道报道利用应用微囊化分泌ES的细胞治疗肿瘤,发现经过微囊移植的裸鼠瘤组织血管生成显著减少,肿瘤抑制率达到35%,但这方面的报道仅限于几项治疗脑胶质瘤的研究。

pSNAV2.0-hEndostatin的菌种送到英俊公司测序。测序结果与PubMed上公布的序列进行Blast比对,确定测序正确后,用大提试剂盒提取质粒,用于转染。

1.2.3 pSNAV2.0-hEndostatin转染HEK293细胞 HEK293细胞用100 mL/L小牛血清DMEM培养基培养,常规传代、接种、冻存。转染方法参照LipofectamineTM2000说明书进行。转染完毕加入无抗生素的100 mL/L小牛血清DMEM培养液继续培养24 h。

1.2.4 转染细胞的筛选 按照1:3比例传代,传代后用无抗生素的100 mL/L小牛血清DMEM培养液继续培养24 h,去除培养液,更换为含G418 350 mg/L的DMEM培养液继续培养14 d,每隔2 d更换一次培养液,第15天换为含G418 175 mg/L的DMEM培养液继续培养14 d,每隔2 d更换一次培养液。标记阳性集落位置,去除培养液,用微量加样枪吸取少量2.5 g/L胰酶轻轻吹打细胞,使细胞脱落,将消化液连同脱落的细胞一起转移到含G418 100 mg/L的DMEM培养液继续培养,每株细胞给以编号、扩增培养、传代、冻存同时收集上清备用,并将其命名为hE/293细胞。

1.2.5 Western印迹分析 收集稳定转染的细胞和未经转染的对照组细胞培养液上清,1000 g离心2 min沉淀细胞,收集上清,离心式超滤浓缩装置(美国Millipore公司)浓缩,样品蛋白经150 g/L SDS-PAGE上分离后湿转到PVDF膜上,封闭液处理,以鼠抗人ES多克隆抗体为一抗,HRP标记的兔抗鼠多克隆抗体为二抗,温育,充分洗膜后,加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

1.2.6 血管内皮细胞(ECV304)细胞增殖抑制试验 ECV304细胞常规消化传代,以 1×10^3 细胞/孔种植于96孔板中,24 h贴壁后,加入E/293浓缩上清培养液20 μ L,对照组加入正常HEK293细胞培养液20 μ L,每组做5个复孔,吸附2 h后,加入正常培养液80 μ L,含bFGF终浓度为3 mg/L继续培养24, 48, 72 h后,取出培养板吸弃培养液PBS清洗两遍,加入MTT 10 μ L 7 $^{\circ}$ C孵育4 h,吸去MTT,加入150 μ L DMSO,37 $^{\circ}$ C孵育5 min,剧烈振荡15 min,490 nm检测吸光度值。

1.2.7 鸡胚尿囊膜试验 选取5日龄鸡胚用碘酒和酒精消毒后,在超净工作台用眼科尖嘴镊小心敲开蛋壳,将甲基纤维素膜加在绒毛尿囊膜上,用微量加样器吸取浓缩的hE/293细胞分泌上清加在甲基纤维素膜上,然后用无菌的滤纸膜覆

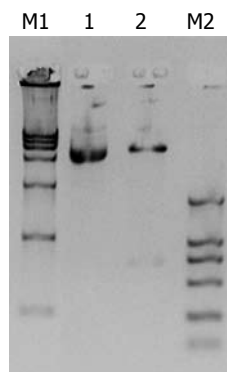


图1 重组质粒pSNAV2.0-hEndostatin的双酶切鉴定结果。M1: DL15000(TaKaRa, 上样量5 μ L, 条带大小分别为15 000, 10 000, 7500, 5000, 2500, 1000和250 bp); M2: DL2000(TaKaRa, 上样量5 μ L, 条带大小分别为2000, 1000, 750, 500, 250和100 bp); 1: pSNAV2.0-hEndostatin质粒; 2: *Bgl*I + *Eco*R I 双酶切pSNAV2.0-hEndostatin质粒。

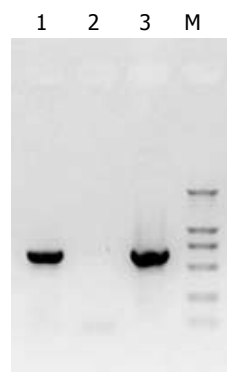


图2 重组质粒pSNAV2.0-hEndostatin的PCR鉴定结果。M: DL2000(TaKaRa, 上样量5 μ L, 条带大小分别为2000, 1000, 750, 500, 250和100 bp); 1: 以pSNAV2.0-hEndostatin质粒为模板的PCR产物; 2: 阴性对照; 3: 以pAVV-hEndostatin质粒为模板的PCR产物。

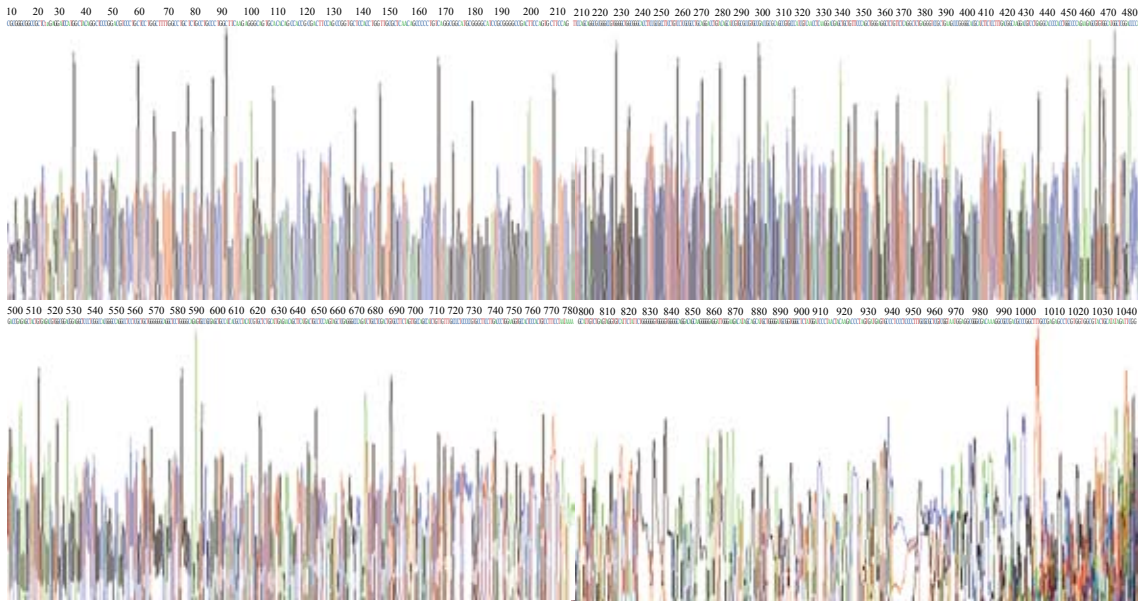
盖蛋壳缺口,避免蛋清直接与空气接触,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中培养4 d,每4 h翻动一次,5 d后打开扩大蛋壳缺口,观察鸡胚绒毛膜血管生成情况,并用彩色相机摄影保存。

2 结果

构建的重组质粒pSNAV2.0-hEndostatin质粒经*Eco*R I + *Bgl*I 双酶切得到7.1 kb和672 bp两条带(图1)。PCR扩增条带预期为637 bp(图2)。测序结果与NCBI上BLAST比对同源性达到100%(图3)。pSNAV2.0-hEndostatin转染HEK293细胞后,经过G418筛选后形成阳性克隆(图4)。选取hE/293细胞培养上清,离心过滤后,超滤浓缩后行SDS-PAGE和Western blot检测,结果在hE/293细胞培养液上清中可以检测到能与ES抗体发生特异性抗原抗体反应的条带, M_r 20 000,与内皮抑素蛋白分子量一致,说明筛选的hE/293细胞能分泌

■创新盘点

本研究成功的构建了真核表达载体,并将其转染到人正常细胞中,筛选了3株稳定分泌ES的细胞。



■应用要点
稳定分泌ES的细胞可以在体外大量培养、扩增,建立细胞“银行”,为进一步利用hE/293细胞治疗肿瘤奠定了基础。

图 3 重组质粒pSNAV2.0-hEndostatin的测序结果.

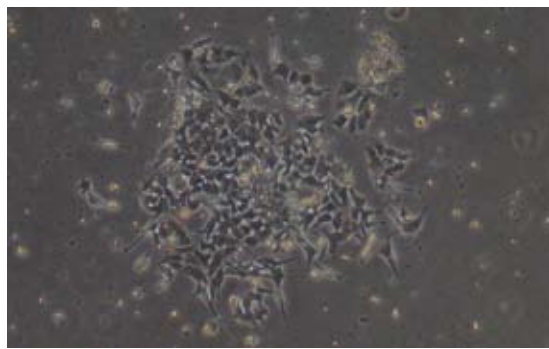


图 4 G418筛选后稳定表达ES的hE/293细胞(× 200).

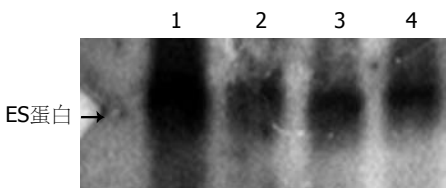


图 5 阳性克隆细胞培养上清中ES蛋白的Western blot分析结果. 1: 4号克隆; 2: 5号克隆; 3: 8号克隆; 4: 5号克隆培养30 d.

ES蛋白(图5). ECV-304细胞生长抑制试验显示, 48 h后试验组ECV304细胞开始不同程度的死亡, 细胞形态及折光性出现异常, 活细胞数量明显减少(图6). 鸡胚绒毛尿囊膜实验显示, 在给予hE/293培养上清的鸡胚尿囊膜血管稀疏, 血管密度明显减少(图7).

3 讨论

尽管有大量的动物实验证实ES有抗肿瘤活

表 1 ECV304细胞的吸光度值(mean ± SD, $n = 6$)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组 (HEK/293)	0.113 ± 0.005	0.159 ± 0.020	0.249 ± 0.070
实验组 (E/293)	0.115 ± 0.003	0.125 ± 0.007 ^b	0.088 ± 0.016 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

性^[8-10], 但应用ES蛋白进行抗肿瘤治疗存在问题: (1)ES在体内半衰期短, 理想的抗肿瘤疗效的产生需要相对较高的注射剂量, 并且需要反复、多次给药, 疗程持续时间比较长; (2)ES在体外极不稳定, 在体外短时间内即失去活性; (3)应用基因工程获得的外源性重组蛋白的制备纯化十分困难, 且ES蛋白生成需要正确的重折叠, 目前的制备的工艺提供临床长期、大剂量用药有一定困难^[11-15]. 针对以上问题, 国内外科学家一直在积极的探索利用ES的基因进行治疗, 期望通过ES在体内的表达, 维持有效的ES浓度, 获得更好的治疗效果. 应用最多的是利用腺病毒载体、腺相关病毒载体等载体等将ES基因导入动物体内, 产生了持续表达的内源性蛋白产物, 观察到与体外重组蛋白相同的生物学活性与功能^[16-18]. 虽然基因治疗避免了反复注射及可能发生的免疫反应, 但存在着潜在的毒性和感染颗粒传播, 治疗的长效性, 转染的效率, 以及目的蛋白表达的量也存在着问题^[19-20]. 近来Read

名词解释

微囊化细胞 (microen capsulated cells): 是用亲水性高分子材料与细胞混合, 经过微囊发生器形成直径0.4-0.8 mm的包裹细胞的球囊, 具有半通透性、免疫隔离性和良好的组织相容性。微囊化细胞可在体内长期存活, 维持正常的生理功能。

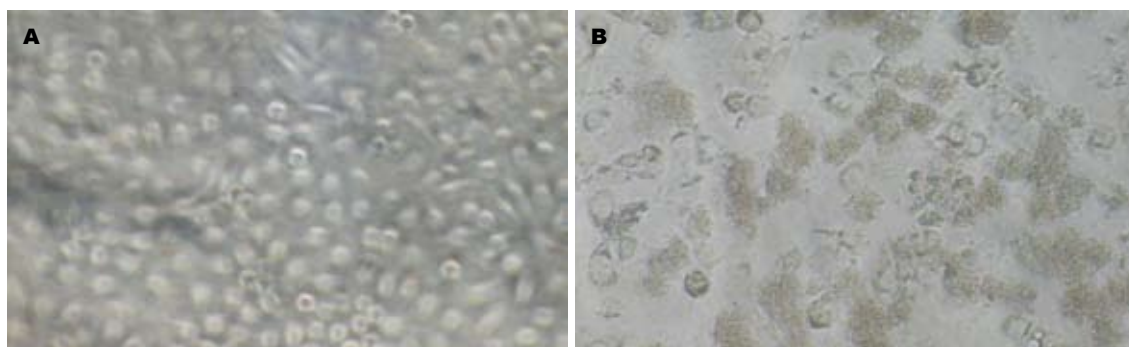


图6 ECV304细胞生长抑制试验(72 h). A: HEK293组($\times 200$); B: hE/293组($\times 200$).

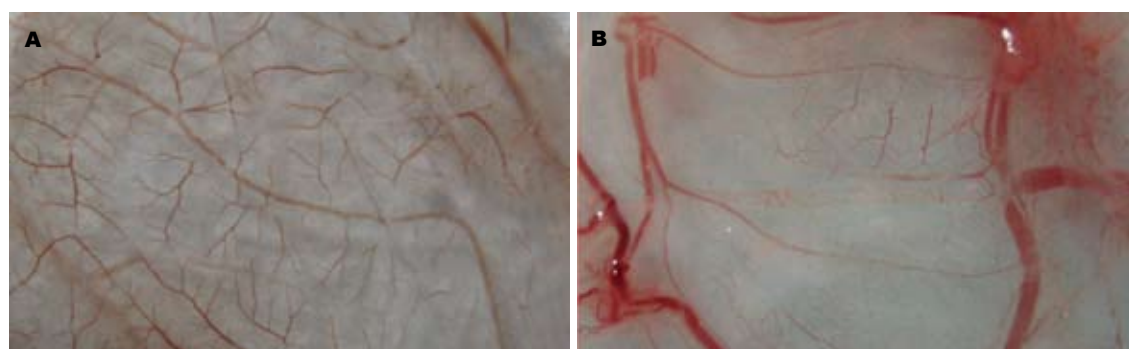


图7 浓缩的hE/293细胞分泌上清抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管(CAM)生成. A: HEK293组; B: hE/293组

et al^[21]报道用微胶囊包裹可分泌内皮抑素的细胞, 然后将其植入胶质瘤荷瘤鼠内, 18 d后观察到治疗组中肿瘤细胞向周围组织的浸润受到抑制, 治疗组中肿瘤血管生成显著减少, 肿瘤抑制率达35%, 但这方面的报道仅限于几项治疗脑胶质瘤的研究^[22-24].

本研究构建了真核表达载体pSNAV2.0-hEndostatin, 测序证实hES插入位点和方向正确, 其中ES的序列和已知的ES序列完全相同, 保证了产物的正确性. 重组质粒具有真核细胞的筛选标志, 便于阳性细胞的筛选, 并且由于携带人IL2信号肽序列, 因此转染细胞具有外分泌的功能, 可以成功分泌ES蛋白到组织中发挥其生物学功能. 我们用其转染人体正常细胞HEK293, 经过G418筛选成功建立蛋白稳定表达细胞系并命名为hE/293, 蛋白印迹表明hE/293细胞能分泌ES蛋白到细胞外. 应用hE/293细胞分泌上清对bFGF刺激的血管内皮细胞(ECV304)增殖能力的影响进行了测定. 结果显示hE/293细胞培养上清对bFGF刺激的血管内皮细胞有显著的增殖抑制作用. 鸡胚尿囊膜试验显示hE/293细胞培养上清能够抑制新生血管的生成. 我们前期研究中建立了稳定的微囊化基因工程细胞制备平台, 借助微囊的免疫隔离作用, 进行微囊化的基

因工程细胞移植使其在体内持续表达目的蛋白, 这样既可以保证蛋白在体内的活性又无需对其进行化学提纯, 并且大大降低了工作量和工作成本, 最重要的是不会引起机体免疫反应, 无需改变宿主基因组, 具有安全性^[25-27]. 本次研究将hE/293细胞在体外大量培养、扩增, 建立细胞“银行”, 为进一步利用微囊包裹hE/293细胞治疗肿瘤奠定了基础.

参考文献

- 1 Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 273-286
- 2 Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3906-3927
- 3 Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997; 78: 672-677
- 4 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328
- 5 SO'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285
- 6 KArnaud S, Malatesta F, Guigliarelli B, Gayda JP,

- Bertrand P, Miraglio R, Denis M. Purification and characterization of the oxidase from the marine bacterium *Pseudomonas nautica* 617. *Eur J Biochem* 1991; 198: 349-356
- 7 Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999; 284: 808-812
- 8 Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S. Recombinant adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1342-1347
- 9 Chen QR, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3308-3312
- 10 Peroulis I, Jonas N, Saleh M. Antiangiogenic activity of endostatin inhibits C6 glioma growth. *Int J Cancer* 2002; 97: 839-845
- 11 Dutour A, Monteil J, Paraf F, Charissoux JL, Kaletta C, Sauer B, Naujoks K, Rigaud M. Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol Ther* 2005; 11: 311-319
- 12 Thomas JP, Arzooarian RZ, Alberti D, Marnocha R, Lee F, Friedl A, Tutsch K, Dresen A, Geiger P, Pluda J, Fogler W, Schiller JH, Wilding G. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 223-231
- 13 Eisterer W, Jiang X, Bachelot T, Pawliuk R, Abramovich C, Leboulch P, Hogge D, Eaves C. Unfulfilled promise of endostatin in a gene therapy-xenotransplant model of human acute lymphocytic leukemia. *Mol Ther* 2002; 5: 352-359
- 14 Jia L, Zhang MH, Yuan SZ, Huang WG. Antiangiogenic therapy for human pancreatic carcinoma xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 447-450
- 15 Jia S, Zhu F, Li H, He F, Xiu R. Anticancer treatment of endostatin gene therapy by targeting tumor neovasculature in C57/BL mice. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 23: 251-257
- 16 李喆, 潘欣, 潘卫, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 戚中田, 毕建威, 华积德. 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定. 世界华人消化杂志 2003; 11: 741-744
- 17 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田. 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1282-1285
- 18 Martinico SC, Jezzard S, Sturt NJ, Michils G, Tejpar S, Phillips RK, Vassaux G. Assessment of endostatin gene therapy for familial adenomatous polyposis-related desmoid tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 8233-8240
- 19 Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, Gobbi A, Corsini C, Ferrucci PF, Martinelli G, Pruneri G. Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2000; 96: 282-287
- 20 Nakashima Y, Yano M, Kobayashi Y, Moriyama S, Sasaki H, Toyama T, Yamashita H, Fukai I, Iwase H, Yamakawa Y, Fujii Y. Endostatin gene therapy on murine lung metastases model utilizing cationic vector-mediated intravenous gene delivery. *Gene Ther* 2003; 10: 123-130
- 21 Read TA, Farhadi M, Bjerkvig R, Olsen BR, Rokstad AM, Huszthy PC, Vajkoczy P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6830-6837
- 22 Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PM. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 35-9
- 23 Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 29-34
- 24 Bjerkvig R, Read TA, Vajkoczy P, Aebischer P, Pralong W, Platt S, Melvik JE, Hagen A, Dornish M. Cell therapy using encapsulated cells producing endostatin. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 88: 137-141
- 25 薛毅珑, 罗芸, 徐龙河, 高宇红, 何立敏, 崔忻, 李雁凌, 郭水龙, 李新建, 田磊, 潘静坤, 孙燕, 罗健, 张伟京, 李留树, 邸立军, 张树才, 王杰军. APA-BCC微胶囊蛛网膜下植入对癌痛病人的镇痛效应. 中国疼痛医学杂志 2005; 11: 231-235
- 26 罗芸, 李雁凌, 薛毅珑, 郭水龙, 高宇红, 崔忻. APA-BCC镇痛微囊在癌痛患者脑脊液中的生物学变化. 标记免疫分析与临床 2005; 12: 97-99
- 27 薛毅珑, 肖秀斌, 张伟京, 苏航, 贾海威, 达永, 陈喜林. 海藻酸钙-聚赖氨酸-海藻酸钙微囊化牛肾上腺嗜铬细胞植入镇痛治疗中人体的免疫反应. 中国临床康复 2004; 8: 7998-7999

■同行评价

本文目的明确,思路清楚,成功构建了human ES表达载体,并证实了表达产物抑制血管生长功能. 文字通顺,语言简练,结果和数据准确,有参考价值.

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

厦门市乙型肝炎患者病毒基因型的分析

董菁, 任建林, 王琳, 卢雅丕, 林逊汀, 林振和, 林辉, 廉亚美

■背景资料

本文以多对型特异性引物-巢式PCR法检测厦门市乙型肝炎患者血清中HBV基因型的分布情况, 属于分子流行病学研究, 其目的是重点了解HBV在当地的基因型分布情况, 为进一步了解厦门同安地区原发性肝癌高发的原因寻找背景资料。

董菁, 任建林, 王琳, 卢雅丕, 林逊汀, 林振和, 林辉, 廉亚美, 厦门大学医学院附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004

董菁, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事肝癌发病机制方面的研究。

厦门市首批重大疾病科研攻关项目, No. WKZ0501

厦门市卫生局医学科研立项项目, No. WSK0506

厦门大学引进人才科研启动基金, No. Z03109

通讯作者: 董菁, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学医学院附属中山医院消化内科. dj1550@xmu.edu.cn

电话: 0592-2292017

收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-29

Preliminary study on hepatitis B virus genotypes in Xiamen city

Jing Dong, Jian-Lin Ren, Lin Wang, Ya-Pi Lu, Xun-Ting Lin, Zhen-He Lin, Hui Lin, Ya-Mei Lian

Jing Dong, Jian-Lin Ren, Lin Wang, Ya-Pi Lu, Xun-Ting Lin, Zhen-He Lin, Hui Lin, Ya-Mei Lian, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by Xiamen Municipal Foundation for Major Diseases, No. WKZ0501, the Medical Research Granted Project of Xiamen Health Bureau, No. WSK0506, and the Scientific Research Launch Fund for Introduction of Talents into Xiamen University, No. Z03109

Correspondence to: Dr. Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. dj1550@xmu.edu.cn

Received: 2006-04-06 Accepted: 2006-04-29

Abstract

AIM: To investigate the genotypes of hepatitis B virus (HBV) in Xiamen city by nested polymerase chain reaction (PCR) with multiplex pairs of genotype-specific primers.

METHODS: A total of 250 HBV-infected patients were included in this study. The serum samples were collected and the serum HBV DNA was used as templates. Ten outer and inner primers were designed on the basis of nucleotide sequences in the regions of Pre-S1 and S genes, of which 8 genotype-specific inner primers were divided into 2 groups: A and B. Genotype A, B, C or D, E, F of HBV were amplified, respectively. The genotypes of the second-round PCR

products were identified using agarose gel electrophoresis (30 g/L).

RESULTS: Of the 250 selected patients, 120 received the above genotyping successfully. There were 90 (75.0%) diagnosed with chronic hepatitis B, 7 (5.8%) with acute hepatitis B, 8 (6.7%) with liver cirrhosis, and 15 (12.5%) with hepatocellular carcinoma. Of the 120 cases, 58 (48.3%) were found with genotype B, 30 (25.0%) with genotype C and 32 (26.7%) with genotype B/C. In the patients with positive HBeAg, genotype B and B/C were confirmed in 63.8% and 21.9% of them, respectively. However, the patients with genotype B/C and B accounted for 68.8% and 25.9% of the anti-HBe-positive patients. There were significant differences between the 2 subgroups in the genotype distribution ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Genotype B prevails among HBV-infected patients in Xiamen city, and type B/C HBV infection a considerable problem.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Gene recombination; Nested polymerase chain reaction; Specific primer

Dong J, Ren JL, Wang L, Lu YP, Lin XT, Lin ZH, Lin H, Lian YM. Preliminary study on hepatitis B virus genotypes in Xiamen city. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1376-1381

摘要

目的: 采用多对型特异性引物, 通过巢式PCR法检测厦门市乙型肝炎患者血清中乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布情况。

方法: 收集250例HBV感染患者血清, 提取血清中HBV DNA作为模板, 设计HBV前S1基因和S基因中区域内设计出10条内外引物, 并将其中8条型特异性内引物分成A、B两组, 分别扩增A、B、C和D、E、F型HBV, 然后将第2轮PCR产物以用30 g/L琼脂糖进行电泳, 根据PCR产物电泳显示的产物长度判定HBV基因型, 以了解厦门HBV基因型分布情况。

结果: 共120例确定了HBV基因型。患者群

中慢性乙型肝炎90例,占75.0%,急性乙型肝炎、肝炎肝硬化、原发性肝癌分别占5.8%(7/120)、6.7%(8/120)和12.5%(15/120)。分型结果: B型58例(48.3%)、C型30例(25.0%), B/C混合型32例(26.7%)。HBeAg阳性患者中B基因型占63.8%, B/C型混合感染21.9%; 抗-HBe阳性患者中以B/C型混合感染68.8%, B型25.9%, HBeAg阳性组与抗-HBe组之间比较发现B型和B/C混合型之间($P<0.05$)。

结论: 厦门乙型肝炎患者HBV基因型以B型为主, B/C混合感染是一个值得重视的问题。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因重组; 巢式PCR法; 特异性引物

董菁, 任建林, 王琳, 卢雅丕, 林逊汀, 林振和, 林辉, 廉亚美. 厦门市乙型肝炎患者病毒基因型的分析. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1376-1381

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1376.asp>

0 引言

1988年, 日本学者Okamoto *et al*^[1]提出HBV基因型的概念, 之后学者提出HBV可分为8个基因型^[3-5], A型分布北欧和非洲, B型和C型主要在东亚, D型在中东、北非和南欧, E型在非洲, F型仅在南美, G型在中、北美洲和欧洲, H型在中、北美洲。国内研究提出, 北方城市以基因C型流行为主, 南方以基因B型为主, 少数民族地区和西藏地区则以D型为主^[6-13]。判断HBV基因型的方法以全基因测序合并生物信息学分析^[14]方法最为精确, 混合性型特异性引物聚合酶链反应(PCR)法^[15-16]、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法^[17-18]、微板核酸杂交ELISA法^[19]和抗体法血清分析法^[20]等各有特色。混合性型特异性引物聚合酶链反应法可操作性较好, 结果容易判读, 是目前国内研究者常用的方法^[10,12], 我们应用这种方法初步调查了厦门地区HBV基因型情况。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-02/2005-09厦门大学附属中山医院消化科住院所有HBsAg阳性血清250例。男性171例, 女性79例, 患者群包括急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化和原发性肝癌患者。PCR扩增仪(美国SABC公司), 血清病毒基因组抽提试剂盒购自北京天为(公司); dNTP, PCR缓冲液、Taq酶、Marker 2000均为TaKaRa公司产品,

琼脂糖购自Promega公司; 引物由上海英骏公司合成。

1.2 方法 自静脉中采集全血5 mL, 分离血清, 200 μ L血清加入浓度为20 g/L蛋白酶K及其200 μ L蛋白酶K缓冲液, 55℃消化12 h, 按天为公司血清病毒基因组抽提试剂盒提供的方法提取HBV DNA, DNA -20℃保存备用。HBV基因型分析参考Naito *et al*^[15]设立的6种主要基因型分型方法, 建立HBV基因型的检测方法。简言之, 应用巢式-多引物-多聚酶链反应, 外引物: 上游引物序列: 5'-AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC-3', 下游引物序列: 5'-AAG GCA TCA AGG CAG GAT AGC-3', 目的片段长度约1429 bp, 自前S1区起始处至S区终止子下游226 bp。A组内引物: 上游通用引物序列: 5'-GGC TCA AGT TCC GGA ACA GT-3', A基因型特异性下游引物: 5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3', B基因型特异性下游引物: 5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3', C基因型特异性下游引物: 5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'; B组内引物: 下游通用引物序列: 5'-GGA GGC GGA TCT GCT GGC AA-3', D基因型特异性上游引物: 5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3', E基因型特异性上游引物: 5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3', F基因型特异性上游引物: 5'-GCT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3'。由于G、H型未在亚洲被发现, 未安排这2种型别的检测。外引物扩增PCR程序: 94℃ 1 min预变性, 94℃ 1 min 30 s变性, 59℃ 1 min 30 s退火, 72℃ 2 min延长, 共30个循环, 72℃延长10 min。内引物扩增PCR程序参数如下: 94℃ 1 min预变性, 94℃ 30 s变性, 58℃ 30 s退火, 72℃ 30 s延长, 共35个循环。巢式PCR产物经过30 g/L琼脂糖凝胶电泳后判断HBV基因型。

2 结果

2.1 HBV基因型判别 通过两轮PCR进行扩增, B型PCR预计长度为251 bp, C型为121 bp, 经过30 g/L琼脂糖凝胶电泳后能清晰直观地辨别出HBV的基因型(图1), 混合感染是指电泳中可见清晰的两条PCR产物条带, 见图1A中X170和图1B中X175。本试验未检测出厦门地区HBV感染者体内有A, D, E, F型HBV病毒株的存在。试验组共250例, 经实验确定分型者120例(48.0%)。分型的120例患者中, 男性91例, 平均年龄39.71±6.36岁; 女性29例, 平均年龄43.28±4.16岁(两组

■研发前沿

本文以多对型特异性引物-巢式PCR法检测乙型肝炎患者血清中HBV基因型分布, 支持以往研究中发现的中国东南沿海地区以B型为主要流行基因型的结论, 同时也发现HBV感染群中存在较多的B/C混合性感染, 究竟是混合性感染还是HBV发生亚型间基因重组, 需要进一步研究。

■创新盘点

本文丰富了大陆地区HBV基因型分布的数据,有助于描绘全国HBV基因型流行病学图谱,进一步工作将着重于HBV B/C混合感染的原因以及不同型别与疾病进展关系的研究。

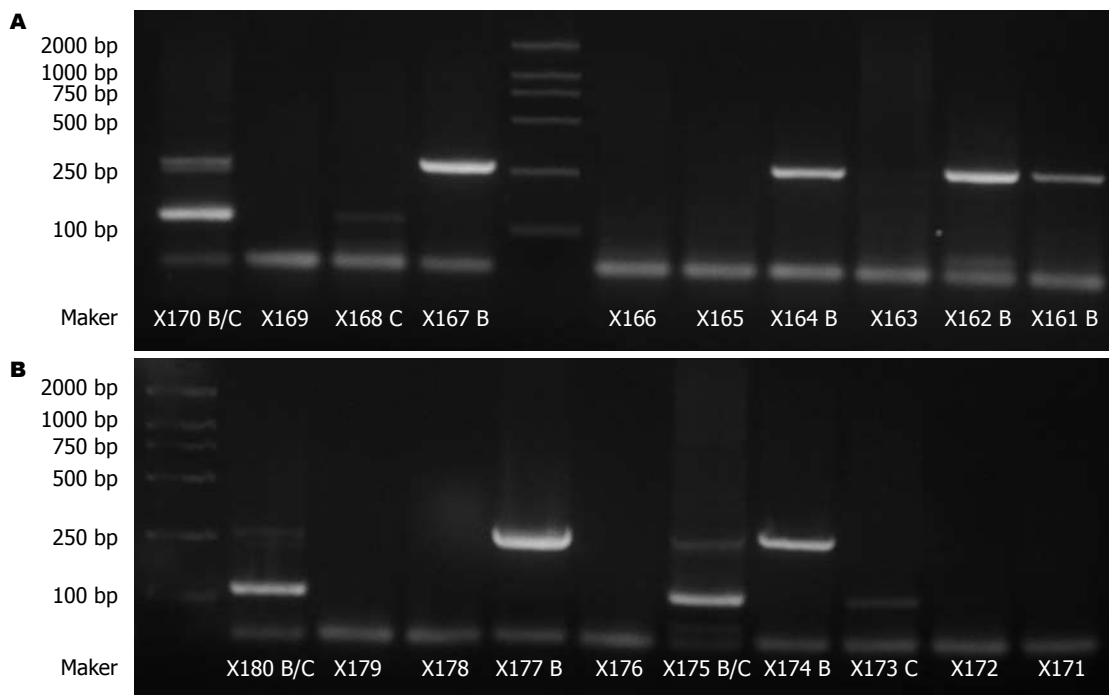


图1 混合性型特异性引物巢始PCR产物电泳图。

表1 HBV基因型性别分布与HBeAg/抗-HBe标志物的关系(n, %)

指标	B	C	B/C混合感染	合计
男	42 (72.4)	23 (76.7)	26 (81.3) ¹	91 (75.8) ²
女	16 (27.6)	7 (23.3)	6 (18.7)	29 (24.2)
HBeAg阳性	37 (63.8)	13 (43.3)	7 (21.9) ²	57 (47.5)
抗-HBe阳性	15 (25.9)	15 (50.0)	22 (68.8)	52 (43.3)
HBeAg/抗-HBe均阴性	5 (8.6)	2 (6.7)	2 (6.2)	9 (7.5)
HBeAg/抗-HBe均阳性	1 (1.7)	0 (0)	1 (3.1)	2 (1.7)
急性乙型肝炎	4 (6.9)	2 (6.7)	1 (3.1)	7 (5.8)
慢性乙型肝炎	47 (81.0)	22 (73.3)	21 (65.6)	90 (75.0)
肝炎肝硬化	3 (5.2)	1 (3.3)	4 (12.5)	8 (6.7)
原发性肝癌	4 (6.9)	5 (16.7)	6 (18.8)	15 (12.5)
总计	58	30	32	120

¹ $P = 0.34$, 男女分型之间无差别; ² HBeAg阳性组与抗-HBe阳性组相比, 其B型与B/C混合型分布的比较有明显差异, $P < 0.05$ 。

相比, $P = 0.34$); 分型组中, 急性乙型肝炎7例, 慢性乙型肝炎90例, 肝炎肝硬化8例, 原发性肝癌15例。120例分型结果为: B型58例(48.3%), C型30例(25.0%), B/C混合型32例(26.7%)。

2.2 HBV基因型分布特征 120例患者HBV基因分型结果中, 男91例, 女29例, 性别之间的型别分布没有差异(表1)。HBeAg阳性组中以B基因型比较多见, 为30.8%(37/120), B/C型混合感染占5.8%(7/120); 抗-HBe阳性患者中以B/C型混合感染多见18.3%(22/120), B型少见12.5%(12/120)。上述2组之间的比较B型与B/C型分布之间具有

明显差异($P < 0.05$, 表1)。

2.3 HBV基因型与疾病进展的关系 诊断标准为2000年西安会议《病毒性肝炎防治方案》(试行)标准^[21]。结果发现, 本组收集到的HBV DNA阳性的血清中, 仅有7例急性乙型肝炎, 8例肝炎肝硬化, 15例原发性肝癌, 基因型分布没有统计学差异, 但肝炎肝硬化与原发性肝癌患者中B/C混合感染比例略高于B, C单独感染(表1)。

3 讨论

HBV是嗜肝DNA病毒科的原型病毒, HBV的

高变异性与其独特的生活史有关. 在DNA病毒群中, 只有HBV和花椰菜镶嵌病毒(cauliflower mosaic virus)生活史中, 必须经过RNA中间体阶段, 之后在经历逆转录过程, 方可形成子代HBV基因组^[22]. 由于在此过程中, 逆转录酶并不具有校读功能, 即缺少3'-5'酶切功能, 因而造成母代与子代病毒基因组之间具有细微的编码变异现象, 这种两代之间的差异率较其他DNA病毒要明显为高. Okamoto *et al*^[23]早年的研究结果认为HBeAg阳性的患者体内HBV基因组内部替换率为 10^{-5} /年, 这个数据高于一般DNA病毒基因组突变率, 但低于RNA病毒基因组突变率. 这种病毒母代与子代之间的差异可能是病毒进化的一种方式, 而HBV基因型就是进化的阶段性结果^[24].

通过比较病毒学研究方法, Okamoto *et al*^[1]于1988年提出以一种不同于以往HBV血清型分型方式, 将当时的HBV病毒群分为4个基因型, 分别命名为A, B, C, D型. 1994年Norder *et al*^[2]发现E, F基因型, 2000年Stuyver *et al*^[3]发现G型, 2000年Arauz-Ruiz *et al*^[4]发现H型. 2002年之后, 有实验室提出基因型之下可以被细化分为新的亚基因型, Kramvis *et al*^[25]提出存在A'型; 2003年Sugauchi *et al*^[26]提出B型内可分为Ba和Bj两种亚型; 2004年Huy *et al*^[27]提出基因型C型可以至少被分为2个亚型, 即C1和C2型. 魏来^[28]总结了近年关于HBV基因型研究的进展, 各地学者分别提出HBV基因型的亚型分布, 关于HBV基因型的研究有进一步精细划分的趋势, 这也是各地域学者进一步分子流行病学调查的重点.

目前而言, 有5种主要方法进行HBV基因型分型, 即全基因组测序结合生物信息学分析^[14], 混合性型特异性引物PCR法^[15-16], PCR-RFLP法^[17-18], 微板核酸杂交ELISA法^[19]和抗体法血清分析法^[20], HBV基因组测序结合生物信息学分析是最可靠的分型方法, 也是新基因型确定的唯一方法, 但实验耗费时间, 需要较高的技术和分析软件. 目前研究常用的是相对简便的混合性型特异性引物PCR法优点是操作简便, 判读容易, 在诊断重叠感染方面有优势, 但单核苷酸多态性(SNP)可能导致实验失败, 并且不能判断新的基因型. 我们采用后一种分法对厦门市HBV基因型进行了分析, 研究发现120例患者体内的HBV基因型以B型为主, 占48.3%, C型占25.0%, B/C混合感染占26.7%. 2003年胡盈莹 *et al*^[11]曾经对福建省部分地区HBV基因型进行分析, 应用的是PCR-RFLP法, 当时检测了431份患者血

清, B型占63.8%, C型占23.2%, D型和混合感染占11.8%; 其中涉及厦门24例, 其中B型15例, C型6例, D型3例. 他们与我们的结果有一定差异, 表现B型所占的比例大于我们的报道, 这可能与样本量过少有关. 我们的研究支持南方以B基因型为主要流行型别的结论, 也支持B、C基因型为中国大陆主要流行基因型的结论. 国内文献[7,11]提出D基因型少量存在于中国大陆HBV感染患者群中, 在新疆地区D型所占比例可高达17.07%^[29], 但我们没有在本组资料中发现A, D, E, F基因型的存在, 这与温志立 *et al*^[10]的报道相一致.

我们的研究提示, 厦门地区的HBV患者血清中检验出B/C混合感染在患者群中所占的比例较高, 混合感染占26.7%, 超过了C基因型的感染比例. 董菁 *et al*^[12-13]早先小样本北京HBV感染者的资料分别提示B/C混合感染占33.3%(5/15)和17.6%(3/17). 马金春 *et al*^[30]报道应用PCR微板核酸杂交-ELISA技术检测湖北黄石地区HBV基因型报道B/C混合感染占5.2%(8/153); 谷鸿喜 *et al*^[8]应用本报道采用的方法, 发现东北地区B/C混合感染占3.0%(14/464), 均少于本组报道B/C混合感染所占比例. 许正锯 *et al*^[31]在泉州地区的报道发现混合感染主要以B/D、C/D混合型为主, 未见B/C混合感染, 跟我们的报道不同, 需要进一步地区间比对研究. 温志立 *et al*^[10]应用混合性型特异性引物PCR法在湖南地区, 黄晶 *et al*^[6]应用巢式PCR-RFLP的基因分型方法在广东地区报道的结果均未发现B/C混合感染的存在, 究竟是地域原因还是研究方法原因还需要进一步探讨. Bartholomeusz *et al*^[32]比较了目前HBV基因型分型的5种主要方法, 认为混合性型特异性引物PCR法的优势就是易于诊断重叠感染方面. 我们的研究提出一个问题: B/C混合感染是一种普遍现象, 排除混合性型特异性引物PCR法导致的一种误差外, 需要进一步探讨B/C形成原因.

1996年, Bollyky *et al*^[33]比较了25株HBV病毒全基因组序列后认为2株存在基因型之间基因重组现象, 分别为A/D和B/A重组, 由此提出HBV基因重组概念; 2000年, Morozov *et al*^[34]比较了99株HBV病毒全基因组序列, 发现其中9株具有亚型间重组(intertypic recombination)特点, 这之中有3例为A/D重组, 其余6例为B/C重组, 均来源于东亚地区. 上述研究结果提示HBV基因型之间重组是一个并不少见的现象. 2003

■名词解释

亚型间重组: 是指HBV不同基因型之间存在基因片段交换, 其机制尚不清楚.

同行评价

本文以“混合性型特异性引物聚合酶链反应法”对厦门地区250例乙肝血清进行了病毒基因型的鉴定,实验设计合理,结果可靠,写作规范,讨论较有深度,有较高的流行病学价值。

年Sugauchi *et al*^[26]提出东南亚地区存在的Ba亚型起特点就是B/C基因型重组。结合本研究结果,我们认为在中国大陆B或者C型HBV需要进一步分析,应用混合性型特异性引物PCR法检测出的B/C混合感染病毒株中,可能混有未发现的B/C基因重组亚型病毒株。

总之,我们的研究提示,B型是厦门地区HBV病毒主要流行型别,B/C混合感染占患者群的26.7%,其中可能存在B/C基因型重组病毒株,需要进一步研究。由于中国地域广大,HBV感染人群众多,仍需要各地对当地流行的HBV基因型进行分析报道,以便综合反映国内HBV感染全貌。

参考文献

- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002; 83: 2773-2777
- 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1362-1364
- 夏国良, Nainan OV, 贾志远, 刘洪斌, 罗述斌, 李荣成, 曹慧霖, 刘崇柏, Margolis HS. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. 中华流行病学杂志 2001; 22: 348-351
- 谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治. 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1073-1076
- 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕. 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1696-1699
- 温志立, 谭德明. 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病病毒基因型. 世界华人消化杂志 2004; 12: 332-335
- 胡盈莹, 江家骥, 欧文湖, 林国贤, 苏智军, 刘家俊, 李勤光, 姚履枫, 林彩文, 李丹, 陈怡. 福建省部分地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义的探讨. 中西医结合肝病杂志 2003; suppl: 3-8
- 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-前-S基因区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 785-789
- 董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 794-800
- Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 7): 1341-1348
- Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-364
- Kirschberg O, Schuttler C, Repp R, Schaefer S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-genotypes A-F. *J Clin Virol* 2004; 29: 39-43
- Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC, Chen WJ. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 95-101
- Kato H, Ruzibakiev R, Yuldasheva N, Hegay T, Kurbanov F, Achundjanov B, Tuichiev L, Usuda S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J Med Virol* 2002; 67: 477-483
- Teles SA, Martins RM, Vanderborcht B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 1999; 23: 1074-1078
- Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods* 1999; 80: 97-112
- 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. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- Seeger C. Hepadnavirus replication. In *Molecular Biology of the Hepatitis B Virus*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991: 213-226
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 1987; 57: 231-236
- Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 2001; 82: 693-712
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83: 835-839
- Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Gish RG, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003; 124: 925-932
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292
- 魏来. 乙型肝炎病毒的基因型: 研究的进展, 临床的方向. 中华医学杂志 2005; 85: 1160-1161
- 董梅, 张跃新. 乙型肝炎病毒基因型分布及临床意义. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 56-57
- 马金春, 李新建, 王鲁文, 廖勇峰, 胡希亚, 王琰, 王桂珍, 龚作炯. 黄石地区乙型肝炎病毒基因型分布及其

- 临床相关性. 世界感染杂志 2005; 5: 371-374
- 31 许正锯, 黄以群, 张启华, 杨红, 陈先礼, 王崇国. 泉州地区乙型肝炎病毒基因型分布特点及临床意义. 中华传染病杂志 2004; 22: 393-395
- 32 Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14: 3-16
- 33 Bollyky PL, Rambaut A, Harvey PH, Holmes EC. Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. *J Mol Evol* 1996; 42: 97-102
- 34 Morozov V, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 2000; 260: 55-65

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统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. 消化系统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), 邮寄者需附软盘; 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.

结肠癌术前多层面CT一站式检查的临床价值

谢琦, 梁碧玲, 黄达德, 江新青, 张静, 陈明旺, 韦程纲

■背景资料

结肠癌的发病率逐年上升, 在治疗前尽可能准确的判断肿瘤的侵犯范围, 对指导临床治疗和判断患者预后有重要的意义。MSCT扫描一圈可获得多层图像, 可进行大范围的薄层扫描, 可显示更好的组织细节, 增强扫描的分期更细、更准。对于结肠癌, 探索最佳的MSCT检查方法、如何对所得大量图像及强大后处理功能进行规范化应用等需要系统的研究。

谢琦, 梁碧玲, 中山大学附属第二医院放射科 广东省广州市 510120

谢琦, 江新青, 陈明旺, 韦程纲, 广州市第一人民医院放射科 广东省广州市 510180

黄达德, 广州市第一人民医院外科 广东省广州市 510180

张静, 广州市第一人民医院病理科 广东省广州市 510180

谢琦, 1992年中山医科大学硕士, 2005年至今中山大学附属第二医院在读博士, 现工作在广州市第一人民医院放射科, 主任医师, 主要从事腹部影像诊断。

广州市医药卫生科技项目, No. 2006-YB-207

通讯作者: 梁碧玲, 510120, 广东省广州市, 中山大学附属第二医院放射科, liangbl@163.net

电话: 020-81332702

收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2007-03-07

Value of multi-slice computed tomography in preoperative "one-station-style" examination for colon cancer

Qi Xie, Bi-Ling Liang, Da-De Huang, Xin-Qing Jiang, Jing Zhang, Ming-Wang Chen, Cheng-Gang Wei

Qi Xie, Bi-Ling Liang, Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Qi Xie, Xin-Qing Jiang, Ming-Wang Chen, Cheng-Gang Wei, Department of Radiology, the First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Da-De Huang, Department of Surgery, the Guangzhou First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Jing Zhang, Department of Pathology, the First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Supported by Medical Science and Technology Project of Guangzhou City, No. 2006-YB-207

Correspondence to: Bi-Ling Liang, Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. liangbl@163.net

Received: 2006-10-18 Accepted: 2007-03-07

Abstract

AIM: To assess the value of three-phase contrasted multi-slice computed tomography (MSCT) pneumocolon in preoperative examination of colon cancer.

METHODS: Sixty-three patients with colonic cancer underwent plain MSCT pneumocolon and multiphase contrasted MSCT within 1 week before operation. Contrast MSCT scans were

performed using 16-slices CT system (Toshiba aquilion16) 22 s (phase I), 37-40 s (phase II) and 60 s (phase III) after intravenous administration of contrast medium. Images were then obtained by CT colonography (CTC), X-ray projection (XRP), multi-planar reformation (MPR), surface shadow display (SSD), CT angiography (CTA) in post-processing workstation. The results were comparatively analyzed with the surgical pathology.

RESULTS: Sixty-four cancer lesions were detected on CT images and in surgery. They located in ascending colon (18 lesions), hepatic flexure of colon (2 lesions), transverse colon (4 lesions), splenic flexure of colon (2 lesions), descending colon (6 lesions), sigmoid (20 lesions, of which 5 lesions in the junction of sigmoid and rectum), and rectum (12 lesions). Extracolonic diseases were found in 16 patients by MSCT or surgery. On multi-phase contrasted CT images, colon cancer lesions demonstrated homogeneous or inhomogeneous enhancement, and the absolutely increased peaks in CT density were at phase II (30 lesions), phase II-III (17 lesions), phase III (13 lesions) and phase I-III (4 lesions). CTA detected blood-supplying artery of 58 cancer lesions (90.6%). The sensitivity, specificity and positive accuracy were 100%, 64.2%, and 92.1% respectively, for pericolic fat involvement, and 78.5%, 86.7%, and 86.1% respectively, for abdominal metastasis-positive lymph-nodes.

CONCLUSION: MSCT pneumocolon and preoperative three-phase contrasted CT can provide information about tumor location, number, stage, blood-supplying artery and extracolonic diseases.

Key Words: Colon cancer; Neoplasm; Multi-slice computed tomography; Pathology

Xie Q, Liang BL, Huang DD, Jiang XQ, Zhang J, Chen MW, Wei CG. Value of multi-slice computed tomography in preoperative "one-station-style" examination for colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1382-1388

摘要

目的: 评估结肠充气多层CT(MSCT)多期增强

扫描对结肠癌患者术前检查的价值。

方法: 63例结肠癌患者术前1 wk内行全腹MSCT平扫与多期增强MSCT扫描。采用Toshiba Aquilion16扫描仪, 增强扫描是在对比剂开始注射后22 s (I期)、37-40 s (II期)、60 s (III期)采集数据。在工作站对采集数据行CT仿真内镜(CTC)、X线模拟投影(XRP)、多平面重组(MPR)、表面遮盖显示(SSD)、CT血管造影(CTA)等后处理观察, 并与手术病理对照。

结果: CT显示64个癌灶, 升结肠18个, 结肠肝曲2个, 横结肠4个, 结肠脾曲2个, 降结肠6个, 乙状结肠20个(包括乙状结肠与直肠交界区5个), 直肠12个; 16例发现肠外病变; 与手术所见同。在不同扫描期相, 原发灶为均匀或不均匀强化。增强扫描肿物峰值强化II期30个, II期-III期17个, III期13个, I-III期4个。58个原发灶(90.6%)可见相应供血动脉增粗, 分支增多。CT判断是否累及肠周脂肪敏感性100%, 特异性64.2%, 准确性92.1%。CT对腹部淋巴结转移瘤诊断总的敏感性78.5%, 特异性86.7%, 准确性86.1%。

结论: MSCT多期增强扫描一次检查为结肠癌术前了解肿瘤位置、数量、范围、血供及其他组织器官病变情况提供了其他影像技术难于同时提供的信息。

关键词: 结肠癌; 多层CT; 病理学

谢琦, 梁碧玲, 黄达德, 江新青, 张静, 陈明旺, 韦程纲. 结肠癌术前多层面CT一站式检查的临床价值. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1382-1388
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1382.asp>

0 引言

结肠癌术前CT检查旨在了解肿瘤的侵犯范围, 为术前分期提供依据。多层CT(multi-slice CT, MSCT)实现了各向同性采集, 可得到高质量的任意断面图, 相应的后处理功能使CT在胃肠道病变的应用进一步拓展^[1-5]。为充分利用MSCT各种功能为结肠癌术前提供更多信息, 我们设计结肠MSCT的检查方法, 现对2004-09/2006-07 63例结肠癌患者的MSCT及手术病理资料总结分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-09/2006-07经全腹MSCT检查诊

断为结肠癌患者128例, 其中63例符合以下条件: (1)在CT检查后1 wk内在本院行手术治疗, 术中作了原发灶切除与腹部淋巴结清扫, 有完整、详实的手术记录; (2)CT检查及手术前患者未行任何抗癌治疗, CT检查符合本研究要求, 并达到预期增强效果。男41例, 女22例。年龄33-83(平均62)岁。术前所有患者行结肠镜检查, 术后癌灶的病理诊断: 黏液腺癌8例, 未分化腺癌1例, 低分化腺癌6例, 中分化腺癌45例, 高分化腺癌2例, 腺鳞癌1例。

1.2 方法 CT检查用Toshiba Aquilion16扫描仪。检查前按钡灌肠要求对患者进行结肠清洁, 扫描前肌肉注射654-2 10-20 mg 10 min后, 经肛门插管缓慢注入空气1000-1500 mL, 使结肠充分扩张。用定位片观察肠管充气情况, 如果不满意, 继续注入适量气体, 即行从膈顶至盆底的常规平扫, 再以3 mL/s的速度静脉注射300 mgI/mL(优维显300, Schering)的对比剂100 mL, 在开始注射对比剂后22 s (I期)、37-40 s (II期)、60 s (III期)时嘱患者屏气, 重复上述范围的扫描。扫描时间13-17.5 s, 采集层厚2 mm, 螺距(HP)15, 150 mAs, 120 kV, 所得数据以2 mm层厚、1 mm间隔重建后传到工作站进行多平面重组(multi-planar reformation, MPR)、表面遮盖显示(surface shadow display, SSD)、CT仿真结肠镜(CT colonography, CTC)、X线模拟投影(X-ray project, XRP)、CT血管造影(CT angiography, CTA)等后处理观察。CT值测量: 平扫时测量原发灶及长径至少2 mm的淋巴结的CT值, ROI面积1-10 mm²。增强各期图像上, 在与平扫相对应的部位用相同ROI面积测得CT值, 两CT值之差为CT强化值, 以CT强化值观察肿瘤及淋巴结的强化情况。肿瘤局部侵犯的CT诊断标准(图1): 肿瘤峰值强化期, (1)强化组织未侵犯病变段肠管全层, 为部分肌层受累; (2)强化组织侵犯病变段肠管全层, 但相应外缘光整, 周围脂肪间隙清晰, 为全层肌层受累; (3)病变段肠管外缘不光整、毛糙, 周围脂肪间隙可见结节或条索影, 为肠周脂肪受累; (4)肿瘤组织侵犯相邻脏器; (5)远隔脏器可见肿瘤灶。CT诊断淋巴结转移标准(图2-3): 淋巴结与原发灶同步强化, 淋巴结出现与原发灶相同的无强化区或钙化。有上述改变之一判断为淋巴结转移瘤。CT上以伴行血管、最邻近的脏器为参照对腹部淋巴结的部位、大小(长轴为标准)、密度、形态进行观察, CT图像由放射科医师按上述标准在术前分析并记录。

■ 研发前沿

对结肠癌患者行结肠充气的动脉期、肿瘤实质期、门静脉期扫描, 采集的数据根据血管与组织的强化程度不同, 利用CTA、MPR、XRP、CTC等后处理技术系统观察肿瘤的部位、大小、形态、血供状态、侵犯范围, 同时观察肠道本身及肠外伴发与并发病变, 评价各种后处理技术在结肠癌治疗前检查的作用。

■创新盘点

本文首次系统研究了结肠癌患者术前结肠充气多期MSCT增强扫描的价值, 提出针对结肠癌后处理技术的使用及观察程式, 确立MSCT对结肠癌术前“一站式”规范化检查的方法, 有利于进一步探索同时显示癌肿大体形态与功能的最合理扫描程序。

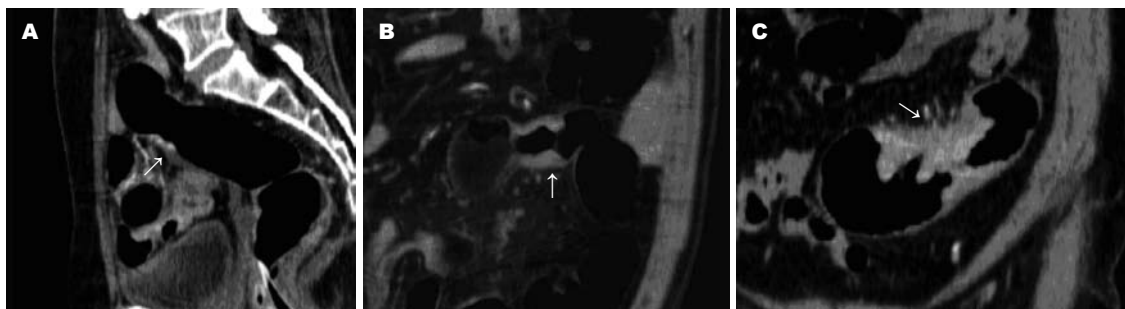


图1 结肠癌术前局部侵犯的CT诊断. A: 强化组织未侵犯病变段肠管全层(箭示), 为部分肌层受累(病理浅肌层受累); B: 强化组织侵犯病变段肠管全层, 但相应外缘光整, 周围脂肪间隙清晰(箭示), 为全层肌层受累(病理累及浆膜下); C: 病变段肠管外缘不光整、毛糙, 周围脂肪间隙可见结节或条索影(箭示), 为肠周脂肪受累(病理累及肠周脂肪)。

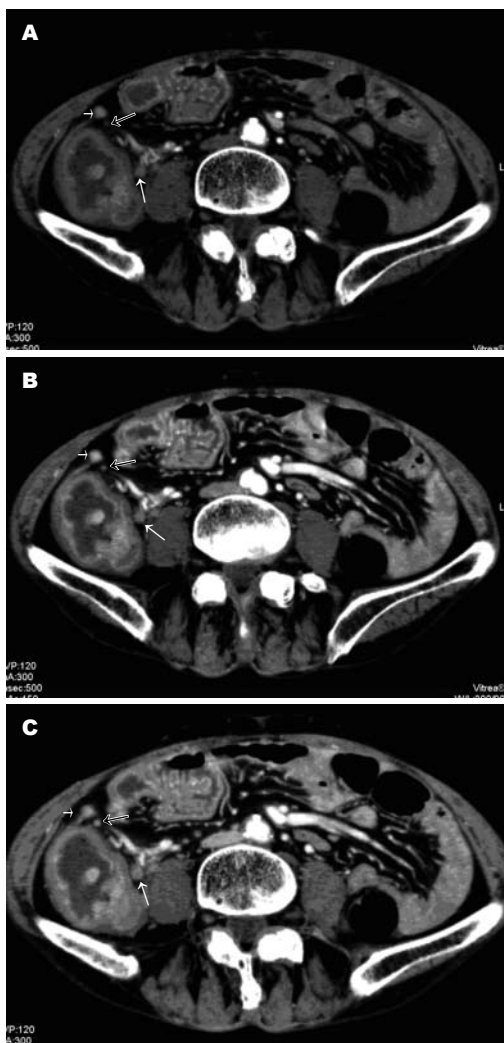


图2 升结肠中分化腺癌. A: MSCT增强Ⅰ期; B: 增强Ⅱ期; C: 增强Ⅲ期, 结肠原发灶明显不均匀强化, 峰值强化在Ⅱ-Ⅲ期, 结肠上淋巴结2枚(3 mm, 9 mm)与原发灶同步强化(黑箭, 短白箭), 病理有癌转移. 结肠旁淋巴结轻微强化, 峰值强化在Ⅲ期(长白箭), 病理无癌转移。

手术病理及临床资料由病理医师和放射科医师收集, 由放射科医师独立整理. 病理上对原发灶在肉眼判断侵犯最广的部位取才并作连续



图3 乙状结肠黏液腺癌. A: 原发灶可见钙化(黑箭), 左髂血管旁淋巴结(1 cm)可见钙化(白箭), 病理有癌转移; B: 原发灶可见无强化区(短白箭), 结肠旁淋巴结(1.2 cm)可见无强化区(长白箭), 呈环状强化, 病理有癌转移。

切片检查; 对术中摘除的淋巴结, 以伴行血管、最邻近的脏器为参照对其部位、大小、形态作详细记录, 对所有切除的淋巴结进行了病理切片检查. 所得资料输入电脑, 在SPSS11.0版软件中建立数据库。

2 结果

2.1 结肠癌灶的MSCT显示情况 CT显示1例为升结肠与乙状结肠同时发生癌(图4), 余为结肠单发癌. 升结肠18个, 结肠肝曲2个, 横结肠4个, 结肠脾曲2个, 降结肠6个, 乙状结肠20个, 乙状结肠与直肠交界区5个, 直肠12个, 与手术所见相同. 手术见5例伴结肠息肉, CT显示3例, 2例未显



图 4 CT显示升结肠(短白箭)与乙状结肠(长白箭)同时发生癌, 手术为中分化腺癌。

表 1 63例64个结肠癌局部侵犯范围CT显示情况与病理对照(个)

病理诊断	CT诊断(cm)					合计
	黏膜	部分	全	累及	脏器	
	下层	肌层	肌层	脂肪	侵犯	
黏膜下层	0	2	0	0	0	2
部分肌层	0	1	1	1	0	3
全肌层	0	0	5	4	0	9
累及脂肪	0	0	0	43	0	43
脏器侵犯	0	0	0	0	7	7
合计	0	3	6	48	7	64

示者是因肠段未扩张。

2.2 MSCT判断肿瘤局部侵犯与远处转移 在不同扫描期相, 原发灶为均匀或不均匀强化(图1-2), 8例见无强化区, 3例伴钙化, 增强扫描肿物峰值强化Ⅱ期30个, Ⅱ期-Ⅲ期17个, Ⅲ期13个, I-Ⅲ期4个。术前CT判断肿瘤侵犯范围情况见表1。CTA成像示64个病灶中58个可见相应供血动脉增粗, 分支增多, 48个回流静脉显影较非病变段肠管的提早。CT显示2例腹膜播散、1例肝转移均经手术病理证实。CT判断是否累及肠周脂肪敏感性100%, 特异性64.2%, 准确性92.1%。

2.3 MSCT诊断淋巴结转移 CT显示177个淋巴结(表2)。平扫5个淋巴结可见钙化, 余淋巴结呈软组织密度。增强扫描, 98个淋巴结均匀强化, 33不均匀强化, 23个环状强化, 23个淋巴结未见强化, 其中10个淋巴结的原发灶有相同改变, 5个伴钙化。

63例患者, 手术切除274个淋巴结。有97个淋巴结(35.4%)CT未显示, 其中 ≥ 5 mm有32个, 分布于横结肠系膜12个, 乙状结肠系膜8个, 左半结肠中间淋巴结7个, 系膜根部5个, 均为消瘦患者。MSCT诊断腹部淋巴结转移情况见表3。

CT对腹部淋巴结转移瘤诊断总的敏感性78.5%, 特异性86.7%, 阳性预测值84.8%, 阴性预

表 2 63例结肠癌腹部淋巴结CT显示情况

淋巴结大小(cm)	淋巴结数目		CT显示率(%)
	手术病理	CT	
<0.5	110	45	40.9
0.5-0.9	102	75	73.5
1-1.4	39	34	87.2
1.5-	23	23	100
合计	274	177	64.6

表 3 MSCT诊断结肠癌淋巴结转移的病理评价(个)

病理诊断	CT诊断(cm)								合计
	<0.5		0.5-0.99		1-1.49		1.5-		
	-	+	-	+	-	+	-	+	
-	95	5	62	6	6	2	0	0	190
+	6	4	9	25	5	21	0	23	84
合计	105	9	71	31	11	23	0	23	274

测值84.8%, 准确性86.1%。若按普通CT诊断标准(淋巴结 ≥ 10 mm即为转移), 本组病例敏感性47.3%, 特异性83.9%, 阳性预测值77.2%, 阴性预测值74.1%, 准确性73.1%。

2.4 MSCT显示伴发病变 CT显示肾结石10例, 1例伴重度肾积水, 动脉瘤2例, 膀胱癌1例, 子宫肌瘤3例。除9例肾结石手术未作探索, 余经手术、病理证实。

3 讨论

对严重衰竭、急性心衰、严重心衰不能平卧或对比剂过敏者不能做肠道CT检查。保证肠道清洁度、结肠良好充气、扩张是取得良好质量图像的重要因素^[6-7]。本组病例根据患者的不同情况采用了不同的肠道清洁方法: (1)检查前2 d半流质, 检查前1 d流质, 检查前一夜7点口服200 mL/L甘露醇250 mL, 并随后2 h内饮温开水1500 mL, 检查当日早晨作清洁灌肠后2 h以上将肠道积水排尽后作CT检查。此方法是常规的清肠方法, 特别是对于便秘的受检者; (2)对病情需要及早检查但又无便秘的患者, 可禁食、禁饮12 h, 检查前夜口服泻药(番泻叶), 次日清晨清洁灌肠后2 h以上将肠道积水排尽后作CT检查。

仅做CTC检查只需平扫^[2-3]。目前结肠检查CT增强扫描采用单期扫描, 即在对对比剂开始注射后40, 60或70 s^[8-10]扫描, 根据所见肿块是否强化鉴别肿瘤与肠道内容物^[8-9], 根据肿块强化程

■应用要点

结肠充气MSCT薄层多期增强扫描一次检查及相应的后处理图像为结肠癌术前了解肿瘤位置、数量、范围、血供情况、其他组织器官病变情况提供了其他影像技术难于同时提供的信息。

■名词解释

1 CT仿真结肠镜(CTC): 利用计算机软件功能, 将螺旋CT容积扫描获得的图像数据进行处理, 重建出结肠内腔表面立体图像, 产生类似纤维内镜所见的图像。

2 CT血管造影(CTA): 经静脉注入对比剂后, 利用螺旋CT对包括靶血管在内的受检层面进行连续不间断的薄层立体容积扫描, 然后运用计算机进行图像后处理, 最终使靶血管立体显影的血管成像技术。

度鉴别结肠息肉与结肠癌^[10]。为了探讨术前CT检查能否根据肿瘤原发灶、转移灶的强化情况更好显示肿瘤侵犯范围, 显示肿瘤血供、腹部血管及其他脏器情况, 从而提供更多有价值的信息, 本研究采用了三期增强扫描, 即在开始注射对比剂后22 s(I期, 动脉期)、37-40 s(II期, 动脉晚期)、60 s(III期, 门静脉期)行全腹扫描。

结肠MSCT检查的后处理技术包括: SSD, 容积再现(volume render, VR), 多平面容积重组(multi-planar volume reformation, MPVR), MPR, 曲面重组(curve planar reformation, CPR), XRP, CTC等。SSD、XRP所得图像可形象显示病变部位、相应肠段轮廓的改变, 相当于气钡双对比造影作用。CTC可清楚并以多角度显示病变外观, 相当于内镜功能; MPR或MPVR可多角度、多方位显示病变侵犯范围、密度改变、各区域淋巴结情况, 有助于淋巴结定位, 相当于虚拟真实的病理解剖; CTA可显示扫描范围内血管的分布、多少, 从而提供病变的血供情况, 相当于血管造影的功能。为充分和快速利用上述后处理技术, 本组病例按以下程式进行观察: CTC观察肠腔有无病变、狭窄, 并标识→SSD、XRP定位→MPR、MPVR观察范围和强化情况→CTA观察病变的血供→观察腹部其他脏器、组织结构情况, 观察扫描野内肺和骨质情况。

结肠癌治疗前侵犯范围的判断是其术分期的基础, 亦是治疗方法选择、评价预后的依据。结肠癌的局部侵犯可沿肠壁纵轴方向扩散或突破肌层向周围组织浸润。根据1997年国际抗癌联盟提出的分期标准, 病理上结肠癌T分期分为^[11]: 肿瘤局限于上皮内或黏膜内(Tis), 侵犯黏膜下层(T1), 肿瘤侵犯肠壁固有肌层(T2), 肿瘤穿透固有肌层至浆膜下或无浆膜段的结肠和直肠的肠旁组织(T3), 肿瘤穿透脏层腹膜或累及其他器官、结构(T4)。Ng *et al*^[12]利用单螺旋CT 10 mm层厚研究认为CT上仅能显示有无累及肠周脂肪和腹膜侵犯, 肠周肿瘤脂肪浸润在CT上表现为脂肪间隙模糊, 见条状、斑片状、结节状影。但上述表现不能与肠周脂肪间隙的纤维反应性增生、炎性反应、淋巴滤泡炎性反应等相鉴别, 而肠周脂肪间隙正常并不意味着肿瘤未累及肠腔外, CT不能显示肠腔外的微灶侵犯^[12-13], 因此, CT在显示肿瘤局部侵犯有一定局限性, 在判断有无肠周脂肪间隙侵犯的敏感性为79%, 特异性33%, 阳性预测值91%, 阴性预测值15%^[12]。Jang *et al*^[14]用SCT增强扫描观察结

肠癌侵犯范围, 结果显示非肿瘤段增厚肠壁不强化, 而肿瘤段肠壁有不均匀强化, SCT增强扫描有助于显示结肠癌侵犯的范围。本研究采用MSCT薄层多期增强扫描, 后处理工作站多方位观察, 可见肿瘤组织明显强化, 与肠壁肌肉有密度差异, 但较难区分黏膜下层与肌层的侵犯, 因此对T2以上的肿瘤出现过度诊断, 显示是否累及肠周脂肪敏感性100%, 但因肠周充血而对肿瘤侵犯范围出现过度判断, 特异性64.2%。

结肠癌术前判断有无腹部淋巴结转移, 是治疗前分期的一重要环节。常规CT对淋巴结缺乏组织特异性, 淋巴结转移的CT诊断常依据大小来判断, 一般以>10 mm者判断为转移淋巴结^[15-18], 对转移淋巴结检出敏感性仅为11%-46%, 特异性95%-100%, 取值标准减小, 敏感性提高, 特异性降低。Noji *et al*^[19]研究胆囊癌术前CT腹主动脉旁淋巴结表现, 将横切面经线>6 mm的淋巴结, 或淋巴结密度不均匀的淋巴结诊断为转移淋巴结, 结果为对淋巴结转移的阳性预测值仅为13%-36%。而在病理检查时可见, 小的淋巴结也常发生转移, 且由于反应增生的淋巴结也可超过10 mm, 所以以大小判断转移有许多局限性。Fukuya *et al*^[20]首次系统的总结了SCT增强扫描对腹部淋巴结转移瘤的检出情况, 结果显示, CT对5 mm以下的淋巴结难于显示; 有癌转移的淋巴结短轴与长轴之比>0.7, 且密度较高, >9 mm转移淋巴结的CT值一般>100 Hu; 在考虑淋巴结大小、密度、形态等因素基础上, 对≥5 mm的转移淋巴结检出敏感性为75.2%。赵志清 *et al*^[21]将胃癌患者≥10 mm或增强扫描CT≥100 Hu的淋巴结诊断为阳性淋巴结, 对淋巴结分期总的准确率为73.3%。

本组病例是采用16层CT 2 mm薄层采集, 50%的重叠重建, 在三维工作站进行连续层面观察, 并将CT平扫与多期增强扫描相结合, 结果提示, MSCT对5 mm以下的淋巴结显示率为40.9%, 大多数有癌转移的淋巴结(68/84, 81%)在MSCT多期增强扫描出现与原发灶同步强化, 部份淋巴结出现与原发灶相同的病理改变, 如黏液样变、钙化, 随着淋巴结的增大, 转移率明显增加。综合上述表现, 对腹部淋巴结转移瘤诊断总的敏感性78.5%, 特异性86.7%, 阳性预测值84.8%, 阴性预测值86.7%, 准确性86.1%。较按“淋巴结≥10 mm即为转移”的标准敏感性、准确性有明显提高。结肠癌在腹部血行播散最常见的靶器官是肝脏, 研究表明MSCT动态增强CT检查

结肠癌隐匿性肝转移瘤具有很大的优越性^[22-23], 对无肉眼可见的肝转移瘤患者, CT可观测到因血管生成而引起的灌注改变^[23]. MSCT可提供良好的CTA图像, 能直观显示腹部血管解剖结构、肠系膜上动脉、肠系膜下动脉、乙状结肠动脉^[1,24-25]及动脉周围的淋巴结情况^[15], 对肿瘤的微创治疗有重要价值. 本组病例观察见大部分肿瘤灶(58/64, 90.6%)可见增粗、增多的肿瘤动脉, 部分肿瘤灶(48/64, 75%)回流静脉提早显影, CTA可在术前显示肿瘤的血供状态.

CT图像还可显示胃肠道外的其他组织与器官的病变^[26]及有无肠梗阻、肠缺血等伴发病变^[27-28]对治疗前制定治疗方案, 评估治疗风险有重要意义.

总之, 在结肠充分扩张的情况下, MSCT薄层多期增强扫描一次检查及相应的后处理图像为结肠癌术前了解肿瘤位置、数量、范围、血供情况、其他组织器官病变情况提供了其他影像技术难于同时提供的信息, 应成为结肠癌治疗前常规检查.

4 参考文献

- Ohtani H, Kawajiri H, Arimoto Y, Ohno K, Fujimoto Y, Oba H, Adachi K, Hirano M, Terakawa S, Tsubakimoto M. Efficacy of multislice computed tomography for gastroenteric and hepatic surgeries. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1532-1534
- Macari M. CT colonography: the real deal. *Abdom Imaging* 2005; 30: 184-194
- Ristvedt SL, McFarland EG, Weinstock LB, Thyssen EP. Patient preferences for CT colonography, conventional colonoscopy, and bowel preparation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 578-585
- Hur J, Park MS, Lee JH, Lim JS, Yu JS, Hong YJ, Kim KW. Diagnostic accuracy of multidetector row computed tomography in T- and N staging of gastric cancer with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2006; 30: 372-377
- Haykir R, Karakose S, Karabacakoglu A, Sahin M, Kayacetin E. Three-dimensional MR and axial CT colonography versus conventional colonoscopy for detection of colon pathologies. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2345-2350
- Macari M, Lavelle M, Pedrosa I, Milano A, Dicker M, Megibow AJ, Xue X. Effect of different bowel preparations on residual fluid at CT colonography. *Radiology* 2001; 218: 274-277
- Mulhall BP, Veerappan GR, Jackson JL. Meta-analysis: computed tomographic colonography. *Ann Intern Med* 2005; 142: 635-650
- Summers RM, Huang A, Yao J, Campbell SR, Dempsey JE, Dwyer AJ, Franaszek M, Brickman DS, Bitter I, Petrick N, Hara AK. Assessment of polyp and mass histopathology by intravenous contrast-enhanced CT colonography. *Acad Radiol* 2006; 13: 1490-1495
- Oto A, Gelebek V, Oguz BS, Sivri B, Deger A, Akhan O, Besim A. CT attenuation of colorectal polypoid lesions: evaluation of contrast enhancement in CT colonography. *Eur Radiol* 2003; 13: 1657-1663
- Luboldt W, Kroll M, Wetter A, Toussaint TL, Hoepffner N, Holzer K, Kluge A, Vogl TJ. Phase- and size-adjusted CT cut-off for differentiating neoplastic lesions from normal colon in contrast-enhanced CT colonography. *Eur Radiol* 2004; 14: 2228-2235
- 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第2版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 784-785
- Ng CS, Doyle TC, Dixon AK, Miller R, Arends MJ. Histopathological correlates of abnormal pericolic fat on CT in the assessment of colorectal carcinoma. *Br J Radiol* 2002; 75: 31-37
- 谢琦, 陈胜利, 吴沛宏, 张静, 曹杰. 结肠癌局部外侵的SCT与手术病理对照研究. *中国医学影像技术* 2002; 18: 160-162
- Jang HJ, Lim HK, Park CK, Kim SH, Park JM, Choi YL. Segmental wall thickening in the colonic loop distal to colonic carcinoma at CT: importance and histopathologic correlation. *Radiology* 2000; 216: 712-717
- Yoon YC, Lee KS, Shim YM, Kim BT, Kim K, Kim TS. Metastasis to regional lymph nodes in patients with esophageal squamous cell carcinoma: CT versus FDG PET for presurgical detection prospective study. *Radiology* 2003; 227: 764-770
- Tunaci M. Carcinoma of stomach and duodenum: radiologic diagnosis and staging. *Eur J Radiol* 2002; 42: 181-192
- Lim JS, Yun MJ, Kim MJ, Hyung WJ, Park MS, Choi JY, Kim TS, Lee JD, Noh SH, Kim KW. CT and PET in stomach cancer: preoperative staging and monitoring of response to therapy. *Radiographics* 2006; 26: 143-156
- Kim AY, Kim HJ, Ha HK. Gastric cancer by multidetector row CT: preoperative staging. *Abdom Imaging* 2005; 30: 465-472
- Noji T, Kondo S, Hirano S, Tanaka E, Ambo Y, Kawarada Y, Morikawa T. CT evaluation of paraaortic lymph node metastasis in patients with biliary cancer. *J Gastroenterol* 2005; 40: 739-743
- Fukuya T, Honda H, Hayashi T, Kaneko K, Tateshi Y, Ro T, Maehara Y, Tanaka M, Tsuneyoshi M, Masuda K. Lymph-node metastases: efficacy for detection with helical CT in patients with gastric cancer. *Radiology* 1995; 197: 705-711
- 赵志清, 郑可国, 许达生. 螺旋CT在胃癌术前TNM分期中的应用价值. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1785-1789
- Terayama N, Matsui O, Ueda K, Kobayashi S, Sanada J, Gabata T, Kawamori Y, Kadoya M. Peritumoral rim enhancement of liver metastasis: hemodynamics observed on single-level dynamic CT during hepatic arteriography and histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26: 975-980
- Luccichenti G, Cademartiri F, Sianesi M, Roncoroni L, Pavone P, Krestin GP. Radiologic assessment of rectosigmoid cancer before and after neoadjuvant radiation therapy: comparison between quantitation techniques. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 526-530
- Matsuki M, Kani H, Tatsugami F, Yoshikawa S, Narabayashi I, Lee SW, Shinohara H, Nomura E, Tanigawa N. Preoperative assessment of vascular anatomy around the stomach by 3D imaging using

■同行评价

本文研究了结肠癌术前多层面CT一站式检查的临床价值, 实验结果可信, 有较高实用价值.

- MDCT before laparoscopy-assisted gastrectomy. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 145-151
- 25 Sahani DV, Krishnamurthy SK, Kalva S, Cusack J, Hahn PF, Santilli J, Saini S, Mueller PR. Multidetector-row computed tomography angiography for planning intra-arterial chemotherapy pump placement in patients with colorectal metastases to the liver. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 478-484
- 26 Mauchley DC, Lynge DC, Langdale LA, Stelzner MG, Mock CN, Billingsley KG. Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer. *Am J Surg* 2005; 189: 512-517; discussion 517
- 27 Hara AK. Extracolonic findings at CT colonography. *Semin Ultrasound CT MR* 2005; 26: 24-27
- 28 Taourel P, Garibaldi F, Arrigoni J, Le Guen V, Lesnik A, Bruel JM. Cecal pneumatosis in patients with obstructive colon cancer: correlation of CT findings with bowel viability. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 1667-1671

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 •

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、抗乙肝病毒治疗新策略、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.

Survivin、P16及RB表达与原发性胆囊癌发生和发展的关系

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭克建

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 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

许元鸿, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事胆道胰腺肿瘤的诊断和治疗。

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

电话: 024-83283330

收稿日期: 2007-03-18 接受日期: 2007-04-13

Correlations of Survivin, P16 and Retinoblastoma expression with the occurrence and progression of primary gallbladder carcinoma

Yuan-Hong Xu, Bing Ou-Yang, Guo-Zhi Yu, Ke-Jian Guo

Yuan-Hong Xu, Bing Ou-Yang, Guo-Zhi Yu, Ke-Jian Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xu Yuan-Hong, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yuanhongxu@hotmail.com

Received: 2007-03-18 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To investigate the roles of Survivin, P16 and Retinoblastoma (RB) protein expression in the occurrence and progression of primary gallbladder carcinoma (PGC).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of Survivin, P16 and RB in 46 cases of PGC tissues, 22 cases of cancer-adjacent tissues and 19 cases of benign lesions.

RESULTS: The positive rates of Survivin, P16 and RB expression in PGC tissues were 69.6% (32/46), 47.8% (22/46) and 71.7% (33/46), respectively, significantly different from those in the benign (0%, 73.7%, 94.7%) and cancer-adjacent (0%, 95.4%, 95.4%) tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). P16 expression was negatively correlated with Survivin and RB expression ($r = -0.691$, $P < 0.01$; $r = -0.6556$, $P < 0.01$). The positive rate

of Survivin expression in P16/RB-deleted cases was 93.8%, significantly higher than that in P16/RB-positive ones ($\chi^2 = 9.228$, $P < 0.01$). Survivin expression was also correlated closely with the differentiation degree ($P = 0.003$), invasion depth ($P = 0.003$) and lymph node metastasis ($P = 10^{-6}$), while loss expression of P16 was correlated closely with the tumor invasion depth ($P = 0.04$) and lymph node metastasis ($P = 0.001$).

CONCLUSION: P16/RB deletion in combination with high Survivin expression might be one of the critical pathways in PGC carcinogenesis, and high expression of Survivin and loss expression of P16 are correlated closely with tumor invasion and metastasis.

Key Words: Gallbladder neoplasm; Survivin; P16; Retinoblastoma; Immunohistochemistry

Xu YH, Ou-Yang B, Yu GZ, Guo KJ. Correlations of Survivin, P16 and Retinoblastoma expression with the occurrence and progression of primary gallbladder carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1389-1392

摘要

目的: 探索Survivin、P16、RB表达与原发性胆囊癌发生和发展的关系。

方法: 选用46例原发性胆囊癌, 22例癌旁黏膜, 19例胆囊良性病变组织, 采用免疫组化SP法定位观察Survivin、P16、RB基因蛋白表达。

结果: Survivin、P16、RB在原发性胆囊癌中表达阳性率分别为69.6%(32/46), 47.8%(22/46), 71.7%(33/46), 与胆囊良性病变(0%, 73.7%, 94.7%)和癌旁黏膜(0%, 95.4%, 95.4%)相比有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Survivin与P16表达呈显著的负相关($r = -0.691$, $P < 0.01$)。P16与RB表达也呈显著的负相关($r = -0.6556$, $P < 0.01$)。P16/RB失活组Survivin阳性率为93.8%, 显著高于P16+/RB+组($\chi^2 = 9.228$, $P < 0.01$)。Survivin与胆囊癌的分化程度($P =$

■背景资料

Survivin、P16和RB作为细胞周期的调控因子, 在肿瘤发生、发展的过程中其相互作用的机制研究, 目前尚不十分清楚。本研究通过免疫组化的方法, 探讨Survivin、P16、RB在原发性胆囊癌中的表达, 来探讨三者在原发性胆囊癌的发生、转移和浸润中的作用及相互关系。

■同行评价

本文应用免疫组化方法检测原发性胆囊、癌旁黏膜及胆囊良性病变组织中Survivin、P16、RB基因表达。结果发现Survivin、P16、RB在原发性胆囊癌中表达与胆囊良性病变和癌旁黏膜相比有差异, Survivin与胆囊癌的分化程度、浸润和转移密切相关, P16表达缺失患者更容易发生淋巴结转移和周围脏器的浸润, 认为Survivin高表达, P16、RB表达缺失在原发性胆囊癌发生中起重要作用, Survivin高表达和P16表达缺失与胆囊癌的转移和浸润可能有密切关系。本研究依据尚充分研究方法, 实验结果准确, 有一定学术水平。

0.003)、浸润($P = 0.003$)和转移($P = 10^{-6}$)密切相关, P16表达缺失患者更易发生淋巴结转移和周围脏器的浸润($P = 0.04$ 或 $P = 0.001$)。

结论:Survivin高表达, P16、RB表达缺失在原发性胆囊癌发生中起重要的调节作用。P16/RB通路失活, 结合Survivin高表达可能是胆囊细胞癌变的重要通路之一。Survivin高表达和P16表达缺失与胆囊癌的转移和浸润可能有密切关系。

关键词: 胆囊肿瘤; Survivin; P16; RB基因

许元鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭克建. Survivin、P16及RB表达与原发性胆囊癌发生和发展的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1389-1392

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1389.asp>

0 引言

Survivin是凋亡抑制蛋白家族中的一个重要成员, 在正常组织中不表达, 而在多种恶性肿瘤中呈阳性表达^[1], 且与肿瘤病理分级与预后有明显的关系。P16、RB (Retinoblastoma)基因是调控肿瘤细胞永生化和癌变的重要基因, 与肿瘤细胞增殖失控、转移和浸润关系密切^[2-3]。我们应用免疫组化技术对原发性胆囊癌的Survivin、P16、RB进行检测, 探讨三者在原发性胆囊癌的发生、转移和浸润中的作用及相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学附属第一医院2001/2005手术切除并经病理证实的原发性胆囊癌标本46例。其中男19例、女27例, 发病年龄45-77(平均55)岁。病理学分级按照WHO分级标准: 高分化20例, 中分化10例、低分化(包括未分化癌)16例。浸润深度按照UICC和AJCC公布TNM分期标准: T1、T2期18例, T3、T4期28例。淋巴结转移阴性组24例、阳性组22例。22例胆囊癌旁黏膜, 19例胆囊良性病变(14例胆囊腺瘤、5例胆囊腺肌样增生症), 标本经40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片, 其中一片常规HE染色, 以复查病理诊断。兔抗人Survivin单克隆抗体(为即用型抗体)购自福州迈新生物技术有限公司, P16、RB多克隆抗体、生物素标记的二抗购自北京中山生物技术有限公司, SP试剂盒为ZYMED公司产品。

1.2 方法 采用免疫组化SP法染色。具体步骤按说明书进行。每批染色过程均设已知阳性明确

的乳癌组织作对照及PBS代替一抗的阴性对照。Survivin阳性物质定位于胞质或胞膜, P16定位于细胞核, RB定位于细胞核; 棕色至深棕色颗粒且其染色强度高于背景非特异染色为阳性细胞。实验组与对照组在10 \times 20倍显微镜下由两位富有经验的病理科医生在相同条件下观察左上、右上、左下、右下、中央5个视野计数, 共数500个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 以百分率计算。Survivin: 无阳性反应细胞, 阳性反应细胞表达率<10%为(-); 阳性细胞表达率大于或等于10%者为(+). P16、RB: 阳性细胞占肿瘤细胞 \geq 25%为阳性, <25%为阴性。

统计学处理 采用 χ^2 检验、Fisher's确切概率法和Spearman等级相关检验。

2 结果

2.1 Survivin、P16、RB在胆囊良、恶性及癌旁组织的表达 Survivin在原发性胆囊癌中表达阳性率为69.6%(图1A), 显著高于胆囊良性病变和癌旁黏膜($P < 0.01$)。P16、RB表达的阳性率显著低于胆囊良性病变和癌旁黏膜($P < 0.01$, $P < 0.05$, 表1, 图1B-C)。

2.2 Survivin、P16、RB表达与原发性胆囊癌分化浸润和转移的关系(表2) Survivin表达与原发性胆囊癌的分化程度、浸润深度和淋巴结转移显著相关($P < 0.01$), P16表达与浸润深度和淋巴结转移显著相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), RB表达与分化程度、浸润深度和淋巴结转移无显著相关($P > 0.05$)。

2.3 Survivin、P16、RB表达间的相互关系 Survivin⁺/P16⁺者8例, Survivin⁺/P16⁻者24例, Survivin⁻/P16⁺者14例, Survivin⁻/P16⁻者0例, Survivin、P16的表达呈显著负相关($r_s = -0.691$, $P < 0.01$)。Survivin⁺/RB⁺者25例, Survivin⁺/RB⁻者7例, Survivin⁻/RB⁺者8例, Survivin⁻/RB⁻者6例, Survivin和RB的表达无相关($r_s = -0.214$, $P = 0.152$)。P16⁺/RB⁺者9例, P16⁺/RB⁻者13例, P16⁻/RB⁺者24例, P16⁻/RB⁻者0例。P16和RB表达呈显著负相关($r_s = -0.6556$, $P < 0.01$)。P16/RB失活组(P16、RB表达其中之一为阴性或均为阴性)共计37例, 30例Survivin阳性, 占93.8%; P16⁺/RB⁺组共计9例, 2例Survivin阳性, 占22.2%, 二者差异有显著性($\chi^2 = 9.228$, $P < 0.01$)。

3 讨论

在Survivin是迄今发现的最强的细胞凋亡抑制因

表 1 Survivin、P16、RB在胆囊良、恶性及癌旁黏膜的表达

分组	n	Survivin		P16		RB	
		阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
原发性胆囊癌	46	32	69.6	22	47.8	33	71.7
胆囊良性病变	19	0	0	14	73.7	18	94.7
癌旁黏膜	22	0	0	21	95.4	20	95.4
χ^2 (P)		45.116 (0.000)		15.661 (0.000)		6.435 (0.04)	

子,可抑制多种凋亡刺激因子(如Caspase)引起的细胞凋亡. Caspase可被级联式激活并使蛋白质溶解,是细胞凋亡的核心机制. Survivin以周期调节的方式表达于细胞周期的G₂/M期,在G₂/M期, Survivin能对抗异常因素诱导的细胞凋亡. 而在肿瘤细胞中Survivin的过度表达,则可能使细胞克服这个凋亡的调控点而利于完成异常的有丝分裂^[1]. 研究表明, Survivin选择性表达于常见的恶性肿瘤如神经母细胞瘤、淋巴瘤、结肠癌和肝癌等肿瘤组织中,并与肿瘤的发生和发展、组织分化程度密切相关,是许多肿瘤的预后影响因素之一,而在癌旁正常组织和成人分化组织并不表达^[4-6]. 我们发现, Survivin在原发胆囊癌中有阳性表达,阳性表达率为69.6%,而在胆囊良性病变和癌旁黏膜中无表达,与Survivin在其他恶性肿瘤中的表达情况一致, Survivin表达上调与胆囊癌分化程度、转移和浸润密切相关,提示Survivin表达的增高与胆囊癌的发生、发展有关,随着胆囊癌恶性程度的增加, Survivin抑制肿瘤细胞凋亡,呈现明显的生长优势. 因此, Survivin抗原的检测,对临床评估病情、判断预后、选择合适的治疗方法有一定的指导意义.

P16蛋白是一种负性细胞周期的调控蛋白,抑制细胞增殖,使细胞停滞于G₁期,其于cyclin D1竞争结合CDK4.6,使CDK4.6失活,从而阻止RB蛋白的磷酸化,去磷酸化的RB以活性形式结合E₂F及ATF₂等转录因子,遏制细胞周期的进程. 从而阻止细胞从G₁期进入S期,抑制细胞增殖;相反P16的失活将导致细胞的过度增殖,使细胞呈失控性生长而形成肿瘤^[2-3]. 有研究表明他不但与多种恶性肿瘤的发生密切相关,而且可能与肿瘤的某些生物学行为及预后有关. 本研究显示, P16、RB基因表达蛋白阳性率显著低于胆囊良性病变和癌旁黏膜,提示P16、RB表达蛋白的缺失,在胆囊癌的发生中起重要作用,是良好的肿瘤标记物;且P16蛋白的失活与胆囊癌的转移和浸润密切相关,提示P16可作为判断胆囊癌恶性程度的辅助指标;相关分析证实P16与RB表

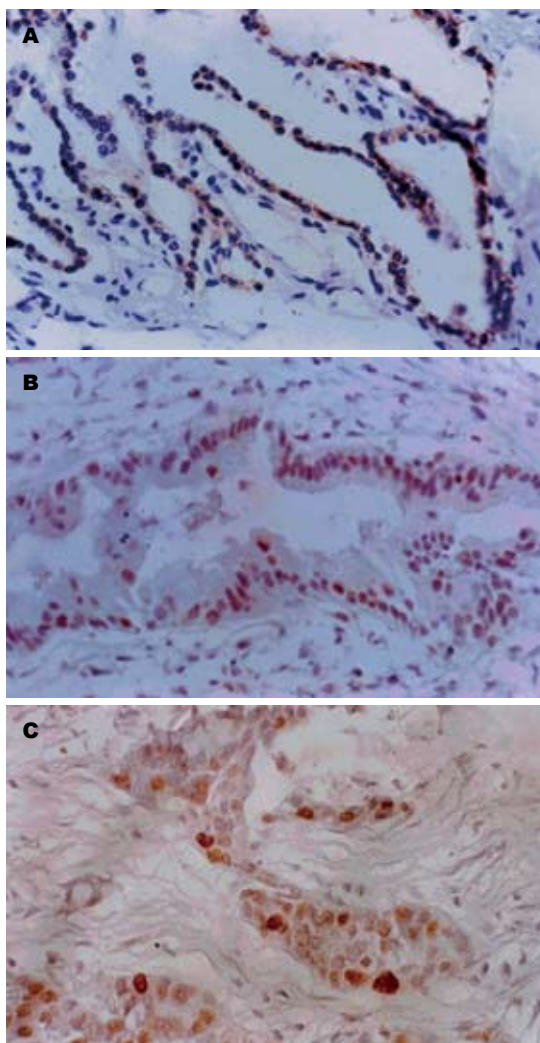


图 1 Survivin, P16和RB在原发胆囊癌中的阳性表达(SP × 200). A: Survivin; B: P16; C: RB.

达间存在显著负相关性. 这一结果证实P16、RB基因表达蛋白调控胆囊细胞癌变的机制是一个负反馈环路,在此反馈环内, P16、RB表达蛋白任何之一表达缺失,都将导致调节环路的中断,造成细胞的异常增殖,最终导致胆囊癌发生.

在细胞周期转换过程中,细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)起着重要作用. 研究证实 Survivin过度表达会导致细胞加快向S期转换,抑制G₁期静止,从而促进细胞增殖. 其机制可能

表 2 Survivin、P16、RB表达与胆囊癌分化、浸润、转移的关系

分组	n	Survivin			P16			RB		
		阳性	阳性率(%)	$\chi^2(P)$	阳性	阳性率(%)	$\chi^2(P)$	阳性	阳性率(%)	$\chi^2(P)$
分化程度										
高中分化	30	16	53.3	– (0.003)	15	50.0	0.163 (0.686)	21	70.0	0.000 (0.998)
低未分化	16	16	100		7	43.8		12	75.0	
浸润深度 ¹										
T1、T2	18	8	44.4	8.814 (0.003)	12	66.6	4.207 (0.04)	11	61.1	1.648 (0.199)
T3、T4	28	24	85.7		10	35.8		22	78.6	
淋巴转移										
阴性	24	10	41.7	– (10 ^{–6})	17	70.8	10.645 (0.001)	19	79.2	1.336 (0.243)
阳性	22	22	100		5	22.7		14	63.6	

¹ UICC、AJCC公布TNM分期标准.

是细胞生长信号诱导Survivin表达, Survivin竞争性地与CDK4/P16ink4a复合物结合, 把P16ink4a从复合体中游离出来, 形成Survivin/CDK4复合物, 从而直接或间接地激活CDK2/CyclinE复合物, 导致RB蛋白磷酸化, 以启动细胞有丝分裂^[7]. Survivin、P16和RB作为细胞周期的调控因子, 在肿瘤发生发展的过程中其相互作用的机制研究, 目前尚不十分清楚. 本研究显示, Survivin和P16蛋白表达呈显著的负相关, 提示Survivin和抑癌基因P16表达可能是负反馈调节. 在本组研究中还发现, P16/RB失活组37例, 30例Survivin表达阳性(93.8%); 而P16⁺/RB⁺组9例, 仅有2例Survivin表达阳性(22.2%). 说明P16/RB通路失活和Survivin表达上调是原发性胆囊癌发生中的重要分子事件, P16/RB通路失活和Survivin表达上调密切相关, 可能是胆囊细胞癌变的重要通路之一, 其机制尚待进一步研究.

4 参考文献

1 Kren L, Brazdil J, Hermanova M, Goncharuk VN, Kallakury BV, Kaur P, Ross JS. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin

and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 44-49

2 Baffa R, Letko J, McClung C, LeNoir J, Vecchione A, Gomella LG. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 145-160

3 Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW, Scolyer RA. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006; 38: 287-301

4 Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. TARGETING SURVIVIN IN CANCER THERAPY: FULFILLED PROMISES AND OPEN QUESTIONS. *Carcinogenesis* 2007

5 Osaka E, Suzuki T, Osaka S, Yoshida Y, Sugita H, Asami S, Tabata K, Hemmi A, Sugitani M, Nemoto N, Ryu J. Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39: 95-100

6 Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 2007; 109: 1106-1113

7 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-3234

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

Toll样受体及其基因多态性与感染性疾病关系的研究进展

田地, 曾争, 陆海英, 田国保, 崔建军

田地, 田国保, 崔建军, 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
收稿日期: 2007-01-17 接受日期: 2007-02-15

Advancement of the relationship between gene polymorphisms of Toll-like receptors and infectious diseases

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

Di Tian, Guo-Bao Tian, Jian-Jun Cui, 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 National Cancer Institute of United States, N01-CO-12400

Correspondence to: Dr. Zheng Zeng, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China. zeng@bjmu.edu.cn

Received: 2007-01-17 Accepted: 2007-02-15

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) were identified as transmembrane signal transduction proteins in recent years. As a group of pattern recognition receptors (PRRs), TLRs play important roles in the innate immunity by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs trigger TLR signaling cascades, leading to the release of proinflammatory cytokines, and play critical roles in infectious diseases. Genetic polymorphisms affect the susceptibility of individuals to infectious diseases, and single nucleotide polymorphisms of TLR genes are associated with the inflammatory responses and susceptibility to infectious diseases. Most studies have indicated that the Asp299Gly and Thr399Ile of TLR4 as well as the Arg753Gln and Arg667Trp of TLR2 had close correlations with

the pathogenesis of infectious diseases. Other genetic polymorphisms of TLRs have also been reported. In this review, we summarized and discussed the function of TLR family and the relationship between genetic polymorphisms of TLRs and infectious diseases.

Key Words: Toll-like receptor; Genetic polymorphism; Infectious disease

Tian D, Zeng Z, Lu HY, Tian GB, Cui JJ. Advancement of the relationship between gene polymorphisms of Toll-like receptors and infectious diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1393-1399

摘要

Toll样受体是近年来发现的跨膜信号传递受体, 他作为一种重要的模式识别受体(PRRs)在先天免疫中通过对病原体相关的分子模式(PAMPs)的识别发挥作用, 通过刺激信号的级联反应诱导炎症因子和细胞因子产生, 在抗感染中起重要作用. 基因多态性影响机体对疾病的遗传易感性, TLRs的位点多态性与炎性应答损伤和感染性疾病的遗传易感性相关. 目前多数研究表明TLR4的Asp299Gly和Thr399Ile, TLR2的Arg753Gln和Arg667Trp多态性与感染性疾病的发生相关, 其他TLRs的基因多态性也有研究. 本文就TLRs家族的功能及其基因多态性与感染性疾病的关系作一综述.

关键词: Toll样受体; 基因多态性; 感染性疾病

田地, 曾争, 陆海英, 田国保, 崔建军. Toll样受体及其基因多态性与感染性疾病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(12):1393-1399

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1393.asp>

0 引言

Toll蛋白最早在果蝇体内发现, 是参与果蝇胚胎时期腹背侧体轴形成的成分蛋白, 他介导天然免疫, 能感受入侵的病原体, 使果蝇分泌多种抗微生物感染的多肽以清除病原体. 1997年, Medzhitov *et al*^[1]首次在人体内发现与果蝇Toll蛋白同源的蛋白, 命名为Toll样受体, 即TLRs(Toll-

■背景资料

Toll样受体作为一种模式识别受体(PRRs)在先天免疫中通过对病原体相关的分子模式(PAMPs)的识别诱导炎症因子和细胞因子产生, 在抗感染中起重要作用. 基因多态性影响机体对疾病的遗传易感性, Toll样受体的位点多态性与炎性应答损伤和感染性疾病的遗传易感性相关.

■研究前沿

关于Toll样受体及其位点多态性与感染性疾病的关系一直是近年来研究的热点,其中研究的主要位点为TLR4的Asp299Gly和Thr399Ile,TLR2的Arg753Gln和Arg667Trp.

like receptors, TLRs). 目前已在哺乳动物发现13种不同的TLRs, TLRs1-9在人和小鼠体内都存在, TLR10只存在于人体内, 而TLRs11-13仅在小鼠体内发现. 人的TLR基因分别定位在4号染色体(TLR1, TLR2, TLR3, TLR6和TLR10)、9号染色体(TLR4)、1号染色体(TLR5)、3号染色体(TLR9)和X染色体(TLR7和TLR8). 比较分析人、果蝇、爬行动物、鸟类和其他哺乳动物的TLR基因发现, DNA序列差别不大, 进化相对保守^[2].

1 TLR的结构、分布、配体以及信号转导途径

TLR属于I型跨膜蛋白(type I transmembrane protein)受体, 由胞外区、跨膜区和胞内区组成. 胞外区均有19-25个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeat, LRR)XLXXLXLXX(X代表任何氨基酸, L为亮氨酸), 每个LRR由24-29个氨基酸组成, 为 β 折叠-环- α 螺旋的结构, 整个LRR结构域形成一个马蹄型的结构, 参与各种病原体的识别; 跨膜区是富含半胱氨酸的结构域; 胞内区约有200个氨基酸与白介素-1 I型受体(Interleukin-1R, IL-1R1)和白介素-18受体(Interleukin-18R, IL-18R)有高度同源性, 称为Toll/IL-1受体同源区(Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR), 是TLRs向下游进行信号传递的核心元件. TLRs家族成员的胞内区结构差别不大, 而胞外区之间存在较大差异, 这有助于不同配体激活不同的受体.

TLR家族成员分布在各类与免疫相关的细胞, 如中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞、皮肤内皮细胞和黏膜上皮细胞等. TLR2和TLR4也存在于B细胞和T细胞上, 参与固有免疫应答, 在肠上皮细胞的高尔基复合体内发现有TLR4, 而TLR3, TLR7和TLR9也存在于内涵体和内质网中.

天然免疫系统由能够识别病原相关的分子模式(pathogen-associated molecule pattern, PAMPs)的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)介导. TLRs是一种主要的PPRs, 通过识别病原微生物及其细胞壁具有的特脂特殊结构来介导宿主相关细胞因子的分泌和天然免疫应答的产生. 这些PAMPs包括革兰阴性细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)中的类脂A、革兰阳性细菌的肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acids)、脂阿拉伯甘露糖(lipoarabinomannans)、分枝杆菌和疏密螺旋体

的脂蛋白(lipoproteins)和脂肽(lipopeptides)、酵母菌和支原体的某些成分以及细菌DNA中非甲基化CpG基序(unmethylated CpG DNA motif)、细菌鞭毛蛋白(flagellin)等. 最近发现还存在TLRs的内源性配体, 如热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)^[3]、纤维结合素(fibronectin)特有的A结构域(extra domain A, EDA)^[4]等. TLRs的配体见图1. 在人已发现10种TLRs, 但TLR8和TLR10的功能还不清楚, TLR1和TLR6需要与TLR2形成二聚体发挥作用, TLR4与CD14和MD-2形成复合体发挥作用. 尚未发现TLR7的天然配体, 已发现的TLR7配体均为合成的免疫调节剂. 一种TLR可以识别多种配体, 这些配体往往属于不同的病原体(如TLR4识别病毒的某些成分, 也可识别革兰阴性细菌的脂多糖), 而同一种病原体可被多种TLRs识别(如革兰阴性细菌可被TLR2和TLR4识别), TLR3, TLR5和TLR9识别的配体较单一.

TLRs信号通路在免疫调节中发挥重要作用. 髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是TLRs信号通路中重要的衔接蛋白, MyD88有一个N端死亡结构域(death domain)和一个C端TIR结构域, TIR结构域与TLRs的TIR相结合, 而N端的死亡结构域可与白介素1受体相关激酶(IL-1R-associated kinase, IRAK)的死亡结构域相互作用, 募集IRAK到受体复合体. 多数TLRs均可通过MyD88激活IRAK和肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNFR-associated factor 6, TRAF6), TRAF6被磷酸纤维素化后, 诱导转化生长因子 β 活化激酶1(transforming growth factor- β activated kinase 1, TAK1)和丝裂原活化蛋白激酶的激酶(mitogen-activated protein kinase kinase 6, MKK6)激活下游的NF- κ B、JNK和丝裂原蛋白激酶P38信号通路, 诱导促炎细胞因子如IL-1, IL-6, IL-12和TNF α 等基因的表达^[5]. 研究发现^[6], 在MyD88缺失的树突状细胞, LPS刺激仍可通过TLR4诱导一系列基因表达, 说明存在不依赖MyD88的信号通路. 随后证实另一种MyD88同源蛋白, 即含TIR结构域的衔接蛋白(TIR domain-containing adapter protein, TIRAP), 又叫MyD88转接样蛋白(MyD88-adapter-like, Mal), 在TLR4介导的MyD88非依赖信号传导途径中发挥作用^[7-8]. MyD88非依赖信号传导途径可能主要调控TLR4介导的树突状细胞的成熟和获得性免疫正向调节分子如MHC、共刺激分子CD80和

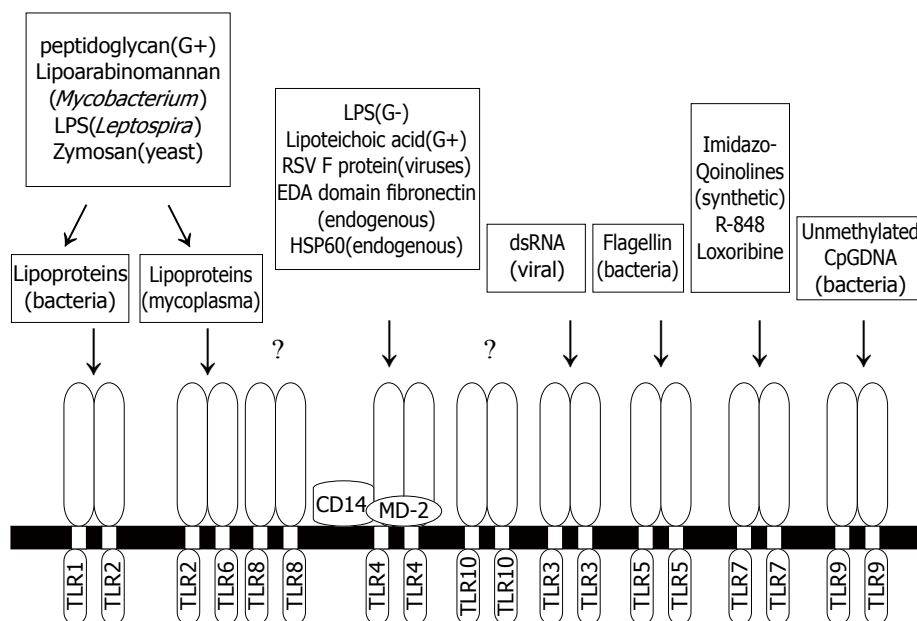


图 1 TLRs的配体.

■创新盘点

本文全面介绍了目前已经发现的Toll样受体家族在先天性免疫和抗感染中的作用,总结了TLR4的Asp299Gly和Thr399Ile, TLR2的Arg753Gln和Arg667Trp等报道较多的位点多态性与感染性疾病的相关性,可以使读者对此有总体了解.

CD86等的表达. 最近发现一种诱导IFN β 的含TIR结构域的衔接蛋白(TIR domain-containing adapter-inducing IFN β , TRIF, 也叫TICAM-1)^[9], 参与TLR3和TLR4介导的MyD88非依赖信号传导途径, TLR3通过TRIF激活干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3), 诱导IFN β 等基因表达, TLR4通过TRIF激活NF- κ B, 诱导炎症因子的分泌^[10]. TLR7, TLR8, TLR9还可通过MyD88-TRAF3通路激活干扰素调节因子7(interferon regulatory factor 7, IRF7)诱导I型干扰素的分泌^[11].

2 TLRs在感染性疾病中的研究进展

TLRs识别不同的PAMPs, 是机体抵抗感染的第一道屏障. TLRs识别PAMPs后, 通过一系列信号通路, 引起与免疫有关的细胞因子释放, 趋化单核/巨噬细胞、中性粒细胞、NK细胞等到炎症部位, 消灭病原体.

LPS是G⁻菌细胞外膜层的主要成分, TLR4是引起对LPS应答的主要受体, 敲除了TLR4基因的小鼠对LPS的刺激无应答^[12]. TLR4是TLRs家族成员中第一个被发现具有抗病毒作用的受体. 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的F蛋白通过TLR4和CD14分子刺激机体产生抗病毒的细胞因子, TLR4缺陷的小鼠肺部NK细胞、巨噬细胞和单核细胞数量减少, IL-12分泌下降, NK细胞介导的细胞毒效应受到破坏, 清除RSV的能力降低^[13]. TLR4缺陷可使鼠肺孢子虫(*pneumocystis murina*)引起的肺炎加重^[14]. TLR4也参与鼠乳头状瘤病毒(mouse mammary tumor

virus, MMTV)和柯萨奇病毒(coxsackie virus)感染, 不利于机体对病毒的清除.

麻疹病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白可通过TLR2刺激机体产生免疫应答. TLR2缺陷的小鼠感染单纯疱疹病毒-1(herpes simplex virus-1, HSV-1)后生存率较高, 这与TLR2缺陷导致中枢神经系统炎性细胞因子分泌减少有关. 最近报道^[15], 敲除了TLR2基因的小鼠, 脾脏和肝脏中鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)复制增加, NK细胞数量减少, IL-18和IFN- α/β 表达水平下降. 在e抗原阳性的慢性乙型肝炎患者中, 即使病毒的载量很低, 也能抑制外周血单个核细胞TLR2受体的表达^[16]. TLR2受体缺陷同样加重肺孢子虫引起的肺炎^[17].

dsRNA是很多病毒生活周期中的产物, 可通过TLR3激活NF- κ B通路和IRF3, 产生促炎因子和抗病毒的细胞因子. 最近发现人子宫内膜上皮细胞上表达TLR3, TLR3在dsRNA刺激下使子宫内膜产生不同的细胞因子环境抵抗细菌感染^[18]. TLR7可结合流感病毒和仙台病毒的ssRNA^[19], TLR7和TLR8也可识别咪唑并喹啉和洛索立宾, 这两种合成化合物都有抗病毒作用. 细菌DNA中非甲基化CpG基序通过TLR9引起免疫应答, 病毒中也存在该基序, 如HSV. HSV-1和HSV-2均可通过TLR9刺激浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)产生I型干扰素, 给TLR9基因缺陷的小鼠注射HSV-2则无INF α 产生^[20]. 缺乏TLR9或MyD88的小鼠感染MCMV后脾脏中病毒滴度明显升高^[21]. Carolina *et al*研究提示, 病毒可通过TLRs诱导树突状细胞

■应用要点

本文总结了近年报道的Toll样受体位点多态性与感染性疾病的相关性,由于研究的人群不同,其中一些位点与疾病是否相关仍有争议,供同行们在研究中参考。

的成熟^[22]。

3 TLRs基因多态性与感染性疾病关系

3.1 TLR4和TLR2基因多态性与感染性疾病的关系 Arbour *et al*^[23]发现,人TLR4基因的Asp299Gly和Thr399Ile多态性与吸入LPS后低应答相关,在这些人中,上皮细胞对LPS的刺激免疫应答能力减弱。进一步研究发现Asp299Gly比Thr399Ile更能影响TLR4的功能。有人研究了Asp299Gly和Thr399Ile位点多态性在G⁻细菌引起的中毒性休克中的作用,发现91例患者中4人存在TLR4基因Asp299Gly的位点突变,而没有Thr399Ile的位点突变^[24]。婴幼儿严重呼吸道合胞病毒支气管炎与这两种位点突变均显著相关^[25]。在哮喘患者中,TLR4基因的Asp299Gly和Thr399Ile多态性与疾病的发病率无相关性,但Asp299Gly与病情的严重程度有明显的相关性($P = 0.003$)^[26],而在类风湿关节炎患者中,Asp299Gly可降低发病率,但与病情和预后无关^[27]。有时TLR4基因多态性并不影响炎症性疾病的表现程度,一些研究中并未发现TLR4 299/399位点多态性与手术后感染和严重的急性全身反应综合征有相关性,也未发现Asp299Gly个体与对照患者在脑膜炎奈瑟球菌感染发病中有显著性差异^[28]。

Mockenhaupt *et al*^[29]研究了非洲儿童这两个位点多态性与重症疟疾的相关性,Asp299Gly在健康对照组为17.6%,而在疾病组出现的频率较高(24.1%, $P < 0.05$)。同样Thr399Ile在健康儿童中为2.4%,在病例组为6.2%($P = 0.02$)。Asp299Gly和Thr399Ile可使发病风险分别增加1.5倍和2.6倍,表明TLR4基因多态性与疟疾的严重程度相关。最近发现与健康对照组相比Crohn's病患者中Asp299Gly出现频率显著升高($OR\ 2.31$, $P = 0.004$),在溃疡性结肠炎患者中也较高($OR\ 2.45$, $P = 0.027$)^[30]。Montes首次发现了Asp299Gly位点多态性与骨髓炎的关系,Asp299Gly在病例组中的频率显著高于健康对照组(3.8% *vs* 0%, $P = 0.038$),提示携带一或两个G等位基因的人对血源性骨髓炎或慢性骨髓炎更易感^[31]。在牙龈炎患者中TLR4(Asp299Gly)杂合子的牙龈上皮细胞对卟啉单胞菌的反应降低^[32]。TLR4参与肾同种异体移植后的排斥反应,接受供体TLR4(Asp299Gly)和(Thr399Ile)等位基因杂合状态的受体,移植后急性排斥反应明显减轻^[33]。

TLR4还存在其他位点的变异,如在220例脑膜炎奈瑟球菌脑炎患者中14例检测到非同义

SNPs,而对照组283例仅检测到2例,两组中Asp299Gly和Thr399Ile无显著性差异。在前列腺癌患者,TLR4SNPs(11, 381位点)的检出频率较高,这些稀有位点的变异与感染性疾病或肿瘤易感性相关。

Lorzenz *et al*^[34]报道了人TLR2羧基端的保守序列存在Arg753Gln位点多态性^[35],表达该基因的HEK293细胞体外识别配体的能力减弱。Arg753Gln在结核患者中的频率较高,但与金黄色葡萄球菌感染的关系不大。携带Arg753Gln的过敏性皮炎患者症状一般较重。最近有报道,Arg753Gln位点多态性与儿童急性风湿热相关。TLR2羧基端还存在Arg667Trp位点多态性,在45例瘤型麻风患者中有10例检测到,而在结核型麻风患者中未检出,健康对照中也未发现^[36]。进一步研究发现,表达该基因的HEK293细胞活性减低,Arg667Trp位点突变的人群产生IL-12的能力下降。后来在突尼斯人中发现,Arg667Trp多态性与结核的易感性相关^[37]。由非分支杆菌引起的肺部疾病(notuberculous mycobacterial lung diseases, NTM)在并无吸烟史的中老年女性中发病率极高,但研究发现Arg667Trp与NTM的易感性无关^[38]。类风湿关节炎和SLE患者Arg753Gln和Arg667Trp与健康对照也无明显差别^[39]。Smirnova *et al*^[40]在脑膜炎患者中发现了TLR2基因的Pro631His多态性,TLR2启动子区基因多态性与儿童哮喘相关^[26],在一个大样本研究中发现,TLR2/-16934在哮喘儿童中存在多态性^[41]。

3.2 其他TLRs基因多态性与感染性疾病的关系 TLR5识别细菌的鞭毛蛋白, Hawn *et al*^[42]推测,鞭毛蛋白可能参与系统性红斑狼疮(SLE)的自身免疫反应,研究证实TLR5(C1174T)多态性与SLE病情进展有关,其突变在SLE中对机体是有利因素。TLR6基因编码796个氨基酸组成的多肽, Hoffjan *et al*^[43]分别研究了TLR6基因的Ser249Pro多态性在成年人哮喘、儿童期哮喘、过敏性皮炎(AD)和慢性阻塞性肺病(COPD)中的情况,发现Ser249Pro位点多态性与儿童期哮喘有微弱的相关性,而与成年人哮喘、AD和COPD无关。TLR10与TLR6高度同源,虽然TLR10的功能还不清楚,但其功能可能与TLR6相似,有报道TLR10基因多态性与哮喘有一定关系^[44]。最近发现,TLR6-TLR1-TLR10基因簇多态性是前列腺癌发病的危险因素^[45]。在鼠试验性结肠炎模型中,TLR9识别的信号通路与抗生素的抗炎效应

相关^[46], TLR9基因启动子的多态性与Crohn's病有关^[47], 该区的SNPs(-1237)与哮喘的发病相关($P = 0.042$).

参与调节TLRs信号通路的分子基因多态性与疾病的遗传易感性也有关系. TLR4和TLR2活化IRAK和TRAF6, 诱导炎症因子的产生, 而白介素1受体相关激酶-M(IL-1R-associated kinase-M, IRAK-M)可抑制TLRs信号通路, 调节TLRs信号传导和天然免疫的动态平衡^[48]. IRAK-M基因位于12q14.2, 该基因区域被认为与哮喘有关. 白介素1受体相关的单个免疫球蛋白的分子(single immunoglobulin IL-1R-related molecule, SIGIRR)也是TLR信号通路的负性调节分子, 在上皮细胞高表达, 对调节长期暴露在微生物环境细胞的免疫应答有重要作用, 如肺上皮细胞^[49]. Nakashima *et al*^[50]认为, IRAK-M和SIGIRR基因多态性可能与哮喘有关, 但结果显示, 日本人IRAK-M基因的Val147Ile和SIGIRR基因的Pro-147Arg多态性与哮喘发病并无相关性, 其多态性在感染性疾病中的作用需要更多的研究.

总之, Toll样受体作为一种重要的PRRs可识别多种PAMPs, 通过刺激信号的级联反应诱导炎症因子和细胞因子的产生, 在抗感染中起重要作用. TLRs参与多种感染性疾病, TLRs基因多态性影响疾病的发病和病情的进展. 但目前常见的感染性疾病与TLRs的关系还不是很清楚. TLR4Asp299Gly和Thr399Ile, TLR2 Arg753Gln和Arg667Trp的研究最为广泛, 已经发现疟疾、败血症休克、骨髓炎、哮喘等多种疾病与TLRs基因多态性相关. TLRs在感染性疾病中的作用提示以TLRs信号受体作为靶点对预防和防治某些疾病将由广阔的前景.

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.

4 参考文献

- 1 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397
- 2 Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 256-267
- 3 Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*

- 2000; 164: 558-561
- 4 Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 10229-10233
- 5 O'Neill LA. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 47-61
- 6 Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 5688-5694
- 7 Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835-841
- 8 Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78-83
- 9 Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4: 161-167
- 10 Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311: 1-16
- 11 Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006; 439: 204-207
- 12 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752
- 13 Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1: 398-401
- 14 Ding K, Shibui A, Wang Y, Takamoto M, Matsuguchi T, Sugane K. Impaired recognition by Toll-like receptor 4 is responsible for exacerbated murine *Pneumocystis pneumonia*. *Microbes Infect* 2005; 7: 195-203
- 15 Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus *in vivo*. *J Virol* 2006; 80: 4286-4291
- 16 Riordan SM, Skinner N, Kurtovic J, Locarnini S, Visvanathan K. Reduced expression of Toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. *Clin Vacc Immunol* 2006; 13: 972-974
- 17 Zhang C, Wang SH, Lasbury ME, Tschang D, Liao CP, Durant PJ, Lee CH. Toll-like receptor 2 mediates alveolar macrophage response to *Pneumocystis murina*. *Infect Immun* 2006; 74: 1857-1864
- 18 Jorgenson RL, Young SL, Lesmeister MJ, Lyddon TD, Misfeldt ML. Human endometrial epithelial cells cyclically express Toll-like receptor 3 (TLR3) and exhibit TLR3-dependent responses to dsRNA.

■同行评价

本文就TLRs家族的功能及其基因多态性与感染性疾病的关系进行了综述, 文章内容新颖, 层次分明, 语言流畅, 论述详实, 文献引用得当, 是一篇较好的综述性文章.

- Hum Immunol* 2005; 66: 469-482
- 19 Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531
 - 20 Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198: 513-520
 - 21 Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21: 107-119
 - 22 Lopez CB, Yount JS, Moran TM. Toll-like receptor-independent triggering of dendritic cell maturation by viruses. *J Virol* 2006; 80: 3128-3134
 - 23 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191
 - 24 Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002; 52: 373-376
 - 25 Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Hourli S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004; 189: 2057-2063
 - 26 Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 2004; 5: 41-45
 - 27 Radstake TR, Franke B, Hanssen S. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 999-1007
 - 28 Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG. A functional polymorphism of Toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184: 640-642
 - 29 Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schroder NW, Bienzle U, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 177-182
 - 30 Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992
 - 31 Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocana MG, Meana A, Carton JA, Paz J, Fierer J, Celada A. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 404-413
 - 32 Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, Zhao H, Lappin DF, Singh A, Eskan MA, Beckers S, Waigel S, Alpert B, Knudsen TB. Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hyporesponsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun* 2006; 7: 190-200
 - 33 Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2006; 20: 30-36
 - 34 Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000; 68: 6398-6401
 - 35 Berdeli A, Celik HA, Ozyurek R, Dogrusoz B, Aydin HH. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J Mol Med* 2005; 83: 535-541
 - 36 Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 53-58
 - 37 Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 625-626
 - 38 Ryu YJ, Kim EJ, Koh WJ, Kim H, Kwon OJ, Chang JH. Toll-like receptor 2 polymorphisms and nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 818-819
 - 39 Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004; 63: 54-57
 - 40 Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6075-6080
 - 41 Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 482-488
 - 42 Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, Aderem A. A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10593-10597
 - 43 Hoffjan S, Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Arinir U, Rohde G, Reinitz-Rademacher K, Schultze-Werninghaus G, Bufe A, Epplen JT. Evaluation of the toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism in patients with asthma, atopic dermatitis and chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med Genet* 2005; 6: 34
 - 44 Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, Klimecki WJ, Martinez FD, Weiss ST. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two

- independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 594-600
- 45 Sun J, Wiklund F, Zheng SL, Chang B, Balter K, Li L, Johansson JE, Li G, Adami HO, Liu W, Tolin A, Turner AR, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J, Gronberg H. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 525-532
- 46 Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 520-528
- 47 Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004; 127: 365-366
- 48 Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202
- 49 Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003; 4: 920-927
- 50 Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Jodo A, Kameda M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Kishi F, Yoshihara S, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. *J Hum Genet* 2006; 51: 284-291

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 •

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腺外科 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。

肠系膜血管缺血外科诊治进展

王晓东, 孙巍

■背景资料

肠系膜血管缺血性疾病是由各种原因引起肠系膜动脉或静脉的连续性受到破坏的疾病, 导致肠管供血不足, 出现缺血和梗死, 是腹部外科急腹症的一种。因为其发病率低, 临床并不常见, 但病情经过凶险, 预后差, 需要临床医生警惕。全面和深入地了解此病, 对急诊外科尤为重要。

王晓东, 孙巍, 沈阳市第四人民医院普外科 辽宁省沈阳市 110031

通讯作者: 王晓东, 110031, 辽宁省沈阳市皇姑区黄河南大街20号, 沈阳市第四人民医院普外科.

xiaodong_wang2001@yahoo.com

电话: 024-86208379

收稿日期: 2007-03-26 接受日期: 2007-04-13

Progress in the diagnosis and treatment of acute mesenteric ischemia

Xiao-Dong Wang, Wei Sun

Xiao-Dong Wang, Wei Sun, Department of General Surgery, Shenyang Fourth People's Hospital, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Dong Wang, Department of General Surgery, Shenyang Fourth People's Hospital, 20 Huanghe North Street, Huanggu District, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. xiaodong_wang2001@yahoo.com
Received: 2007-03-26 Accepted: 2007-04-13

Abstract

Acute mesenteric ischemia (AMI) is a life-threatening vascular emergency that requires early diagnosis and intervention to adequately restore mesenteric blood flow and prevent bowel necrosis and patient's death. The underlying cause of AMI is varied, and the prognosis depends on the precise pathologic findings. Despite the progress in understanding the pathogenesis of mesenteric ischemia and the development of modern treatment modalities, AMI remains a diagnostic challenge for clinicians, and the delay in diagnosis contributes to the continued high mortality rate. Early diagnosis and prompt effective treatment are essential to improve the clinical outcome.

Key Words: Mesenteric occlusion; Acute mesenteric ischemia; Surgery

Wang XD, Sun W. Progress in the diagnosis and treatment of acute mesenteric ischemia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(12):1400-1405

摘要

肠系膜血管缺血(acute mesenteric ischemia,

AMI)是潜在致命的血管性急腹症。死亡率很高, 且发病率不断上升。形成AMI的原因是多样的, 临床经过和预后取决于基础的病理状态。尽管对肠系膜缺血病理生理研究的深入和现代治疗方法上的改进, 存活率没有显著的提高。AMI仍然存在诊断上的挑战, 延误诊断会提高死亡率。临床表现在大多数病例没有特征性。当肠缺血迅速的发展为不可逆的肠坏死, 随后出现严重的代谢紊乱, 最后发展成为多器官功能不全以致死亡。及时地诊断和处理, 快速有效地恢复肠系膜血流是改善预后的关键。

关键词: 肠系膜血管闭塞; 肠系膜血管缺血; 外科

王晓东, 孙巍. 肠系膜血管缺血外科诊治进展. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1400-1405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1400.asp>

0 引言

肠系膜血管缺血(acute mesenteric ischemia, AMI)是潜在致命的血管性急腹症。总的死亡率在60%-80%^[1-6], 而且发病率不断上升。形成AMI的原因是多样的, 临床经过和预后取决于基础的病理状态^[7-9]。尽管对肠系膜缺血病理生理研究的深入和现代治疗方法上的改进, AMI仍然存在诊断上的挑战, 延误诊断会提高死亡率。在过去的70 a中, 存活率没有显著的提高。临床表现在大多数病例没有特征性。最初表现为严重的腹痛或轻微的临床体征。理学检查在肠缺血或者肠坏死之间没有确定性差异。当肠缺血迅速的发展为不可逆的肠坏死, 随后出现严重的代谢紊乱, 最后发展成为多器官功能不全以致死亡。及时地诊断和处理, 快速有效地恢复肠系膜血流是改善预后的关键^[6,10-11]。

1 病理生理过程

内脏血液循环接受25%的静息时和35%的餐后的心脏输出。70%的血流灌注在肠黏膜和黏膜下层, 肌层和浆膜层接收其余30%^[12-13]。内脏血流灌注的生理调节十分复杂, 尚没有被我们清楚

地认识. 多种机制相互作用调节肠系膜血流达到适宜的血流供给, 包括内源性的如代谢因素, 和外源性的如神经和体液等调节系统^[13-14]. 压力自调节机制被认为是内在的控制系统. 代谢方面, 氧供比血供更直接引起内脏血流相应的变化. 肾上腺素能神经的影响被认为占主要地位. 总之, 内脏血流受多种生理和药理因素调节. 源于肠系膜血流变化的组织损伤通常是由再灌注引起的细胞损伤^[15-17]. 短暂的肠系膜缺血引起微血管通透性增加, 而延长的缺血则引起肠黏膜屏障的破坏, 氧自由基的损伤作用可以由抗氧化剂, 黄化酶抑制剂, 氧自由基清除物的存在而减轻损伤得到证实^[18-21]. 肠会耐受到血流减少到何种程度而不引起再灌注损伤值得关注. 研究认为15%的肠系膜毛细血管开放和最大流量20%的氧耗能如果能够得到保障, 肠管将会耐受. 低于此极限, 氧耗作用会减少, 缺氧会随之发生.

2 病因分类

2.1 肠系膜动脉血栓(arterial embolism) 动脉血栓是AMI最常见的原因, 占AMI的40%-50%^[2-3]. 并且大多数由心脏原因引起. 心肌缺血或心梗、心内膜炎、心肌病、动脉瘤, 心瓣膜病均增加附壁血栓的危险性^[22]. 大多数的血栓栓子栓塞在肠系膜上动脉(SMA), 15%的栓子发生在SMA起始部, 50%存在于SMA的第一分支即结肠中动脉^[5]. 大约1/3的患者有血栓病家族史.

2.2 肠系膜动脉血栓形成(arterial thrombosis) 急性肠系膜血栓形成占全部肠系膜缺血的25%-30%, 几乎所有的病例都发生在严重的动脉粥样硬化症的患者. 常见的部位在SMA的起始部^[7]. 多数情况下, 因为动脉粥样硬化, 大血管慢性阻塞引起侧支循环的建立, 患者可以耐受. 而当维持血供的血管或重要的侧支循环阻塞后, 肠缺血随之发生. 血栓形成引起的肠缺血或梗死的范围会特征性的比血管栓塞大, 可以从十二指肠一直到横结肠. 围手术死亡率为70%-100%^[3-4,23].

2.3 非闭塞性肠系膜血管缺血(nonocclusive mesenteric ischemia, NOMI) 大约20%的患者并没有器质性的阻塞性疾病^[8,24-25]. 现在考虑与心排出量减少和广泛的肠系膜血管收缩有关. 内脏血流减少可以由以下因素引起: 低血容量、低心排出量、低血压. 而血管加压素造成的此类病例可以很好的解释此种缺血和其他原因AMI的不同. NOMI的危险因素包括: 年龄>50岁、心

梗病史、充血性心衰、肝肾疾病、腹部和心血管大手术. 一部分特殊类型的NOMI出现在一些接受外科和肿瘤治疗的患者中^[26], 一部分在ICU中接受重点治疗, 并且接受肠内营养. 研究表明ICU患者AMI的发病率在0.3%-8.5%.

2.4 肠系膜静脉血栓形成(mesenteric venous thrombosis, MVT) MVT是肠系膜缺血常见原因中相对少见的, 占总数的10%. 在过去, 未被足够重视, 并且被认为是继发于严重的腹腔内感染, 重症胰腺炎, 恶性肿瘤等, 或原因不明. 随着诊断技术的提高, 越来越多的病例被认为是原发凝血机制的异常引起的. 只有10%的病例被认为是特发的^[4,27-28]. 血栓通常发生在肠系膜上静脉(superior mesenteric vein, SMV)^[29], 肠系膜下静脉和大肠受累很少见. 比起动脉血管病变, MVT带来的病理变化是渐进的. 长期死亡率急性为60%-70%.

3 临床表现

AMI的症状和体征与其他腹腔内疾病相近, 如胰腺炎、急性憩室炎、肠梗阻、急性胆囊炎. 临床表现来源于深层次的病理异常. 通常SMA的栓塞和血栓形成起病急骤并迅速恶化. 而NOMI或MVT的发病和进展则是渐进的过程. 在SMA栓塞, 由于没有建立侧支循环, 患者症状剧烈. 出现剧烈、持续的腹痛, 恶心, 呕吐, 腹泻. 特征性的症状明显比体征重. 脱水、大量的体液丢失在第三间隙可以导致意识模糊, 心率快, 呼吸急促, 循环衰竭. 实验室检查出现代谢性酸中毒, 碱剩余和乳酸水平升高, 白细胞升高, 血液浓缩. SMA血栓形成患者通常会有餐后腹痛、呕吐和体质量下降的前驱症状, 就诊时间比血栓栓塞患者晚很多. NOMI多数发生在老年人, 危重患者, 这些患者存在严重的肠系膜血管动脉硬化症, 并且有严重的血流动力学异常. 除了一些暴发型病例, 典型的MVT患者会在发病1-2 wk后就诊, 自诉弥漫的、非特异性的腹痛, 伴有厌食或腹泻. 与动脉血栓相比, MVT患者很少有与进食相关的腹痛, 发热、腹胀、便潜血阳性是最多见的表现. 同时可能出现血性腹水和脱水.

各种类型的肠系膜血管缺血的最终结局为肠缺血坏死. 当肠坏死发生, 患者会出现腹膜炎体征; 血流动力学不稳定和脓毒症带来的多器官功能不全的临床表现.

4 诊断和治疗

4.1 诊断 AMI可能迅速的发展成致死的肠坏死,

■ 研发前沿

随着普通外科和血管外科的发展, 临床医师积累了一定的诊治经验, 但病死率仍然居高不下, 可疑的病例必须经过早期的明确诊断, 进而通过规范的治疗才能改善预后. 高度警惕的进行病史采集和体格检查被认为是早期诊断的基础. 如果患者被怀疑AMI, 临床医师应该迅速进行证实并进行适当的治疗. CT肠系膜血管成像和肠系膜血管造影被认为是最有价值的诊断方法, 而明确诊断后, 针对不同病因和病理状态采取手术或非手术的治疗方法, 具体处理尚没有明确的治疗指南. 现在普遍认为专业的血管外科医师的早期干预可以改善现状.

■创新盘点

本文系统全面的对肠系膜血管缺血性疾病进行综述,从病理生理、病因分类、临床诊断治疗和预后各方面阐述了该疾病的外科治疗现状和进展。

因此及时的诊断和处理极为重要。高度警惕的进行病史采集和体格检查被认为是早期诊断的基础。如果患者被怀疑AMI,临床医师应该迅速进行证实并进行适当的治疗。当以下危险因素出现,AMI需要被特别的进行鉴别诊断:患者年龄>60岁、房颤病史、近期心梗、充血性心衰、周围血管动脉栓塞、慢性餐后腹痛和体质量下降,尤其需要注意的是最初出现的剧烈腹痛且症状与体征不符。在发病后24 h之内诊断的患者的生存率为50%,而当诊断延迟会使生存率下降至30%或更低。

最常见的实验室检查异常发现为:血液浓缩、白细胞增多、代谢性酸中毒、阴离子间隙扩大和乳酸堆积。淀粉酶、转氨酶、乳酸脱氢酶、磷酸肌酶升高。但是,没有一项指标对诊断有很好的敏感性和特异性。高磷酸血症和高钾血症在肠坏死时才作为晚期的指标出现。

AMI的放射线检查也没有特异性^[30-33],在疾病早期,25%的腹平片正常,特征性的放射线影像异常:肠管的指纹征或增厚征只在不到40%的情况下出现。门静脉气体影是晚期的表现,那时的预后极差。同实验室检查一样,放射线影像检查的价值在于除外其他一些诊断如:肠梗阻、消化道穿孔等。在AMI病例,钡灌肠没有实际意义,并且有造成穿孔的危险,此外,钡剂会影响其后有可能进行的CT或血管造影。

近来的研究多集中在CT在AMI的诊断价值^[34-36],CT表现有:肠壁增厚、肠管扩张、肠系膜充血、肠系膜静脉或门静脉积气、内脏梗死征象、动静脉血栓征象。腹部CT对于AMI诊断缺乏敏感性和特异性。动态增强CT可以使敏感性提高到64%,特异性92%。多层CT扫描进行CT血管成像的价值正在被证实有决定意义^[34,37-38]。CT在MVT的诊断价值高于AMI的其他类型。

在没有明确的开腹探查指征之前,推荐肠系膜血管造影。早期进行血管造影可以提高生存率^[39-41]。而且,血管造影结合腹平片可以提示25%-40%非缺血的腹痛原因,栓塞通常发生在血管逐渐变细处,常在SMA第一大分支结肠中动脉后。相反的,血栓常发生在SMA起始部。血栓可以使SMA起始部显示充盈缺损,延迟造影则显示侧支血管。静脉血栓显示动脉血流减慢,同时伴有相应的肠系膜静脉和门静脉显影不清,与NOMI相比,后者的静脉回流显影正常。此外,NOMI显示SMA及其分支出现不规则的狭窄,出现腊肠征。在选择性SMA造影,静脉阻塞和

NOMI可以显示造影剂的反流。

还有一些方法被尝试进行AMI的诊断,但是由于较低的阴性预测值而受到局限。临床医师应该充分认识到,一些敏感性和特异性不佳的辅助检查会拖延治疗。多普勒超声可以在50%慢性肠系膜动脉阻塞的患者发现血管狭窄^[42-44]。但是在急性血管阻塞的时候作用尚不确定。MRI可以发现慢性缺血时肠系膜上血管的血流变化,但是可靠性尚未被证实^[45-46]。而急诊应用MRI的限制也是这种检查方法受到制约。

4.2 治疗 一旦AMI被诊断,治疗应该迅速展开。具体包括:控制血管痉挛、预防血管内凝血的进一步发展、最大限度减轻再灌注损伤。液体复苏包括晶体和胶体,用来纠正液体量不足和代谢紊乱。特殊重症患者,理想的处理是在血管造影前进行液体复苏,晶体输入量最多可以为100 mL/kg,超常的液体量也正在被尝试^[47-48]。尽早应用广谱抗生素。如果没有禁忌症,静脉应用肝素。

明确的腹膜炎体征提示存在肠坏死,需要急诊手术。即使没有出现肠管坏死,除了NOMI,也常常需要手术处理。术前的复苏有可能提供患者已经安全的假象,但如果不手术进行血管重建(栓子或血栓取出术、血管内膜剥脱术、血管搭桥术)和随后进行的坏死肠管部分切除,肠坏死,脓毒症,MODS将随之发生。在AMI栓塞患者,标准的栓子切除术推荐在靠近SMA处横行切开。如果阻塞原因不确定或为血栓形成,推荐使用纵形血管切开,这种方法在需要进行血管搭桥时存在优势。如果不需要搭桥,纵形切开需要用成型血管片修补以保证血管腔不出现狭窄。在AMI血栓形成患者,常常需要血管搭桥来解决动脉粥样硬化。搭桥部位常定位在肾下主动脉,为防止因穿孔和肠坏死可能造成感染的影响,建议应用自体静脉。在栓塞病例,建议首先进行血管再建术,随后切除没有生机的肠管。这样可以防止切除有可能恢复生机的肠管出现短肠综合征。如果判断肠管血运困难,可以行小肠造口。虽然缺乏特异性。动脉搏动、肠蠕动和肠管颜色仍然是常用的判断肠管生机的方法。

通过肠管外观的表现判断他的生机并不可靠,尤其在NOMI病例,浆肌层正常,黏膜层可能已经坏死。静脉应用荧光素检查的方法敏感性和特异性均很高,但是这种方法并没有被广泛接受^[49-50]。均匀的荧光提示肠管生机正常,而斑片状则提示生机异常。异常的肠管需要被定位

以备二次探查. 术中超声也可以应用, 但是研究表明与临床判断相比没有明显优势^[51].

在NOMI患者, 有效地处理取决于诱发因素的控制. 最初的治疗应该去除诱发因素和改善患者基本状态. 理论上, 任何缺血梗死肠管必须被切除. 血管扩张药、抗凝药需要应用. 一些情况, 血管造影导管注入罂粟碱可以在几分钟之内恢复血供. 然而, 大多情况下NOMI患者很少有其他的选择, 因为一些诱发因素对改善患者其他系统异常是必须的. 除非这种原发的副作用被控制, 否则, NOMI的病死率与其他类型的AMI没有区别.

在MVT患者, 治疗上存在一些争议, 没有出现肠坏死的患者即使没有外科手术干预也会自然康复. 很大一部分患者仅仅依靠抗凝治疗就会好转. 当出现腹膜炎体征时, 需要急诊手术开腹探查. 而手术后血栓的再发和继续形成是常见的. 肝素化治疗可以减少血栓再发从26%-14%, 病死率从59%-22%. 对于急性肠系膜上静脉主干或门静脉血栓形成来说, 血栓切除术或许是有益的, 血管内溶栓治疗成功的病例也被报道^[52-54]. 但是当怀疑有肠管坏死, 溶栓治疗是不恰当的. 即使最初的手术成功的改善了肠系膜血流灌注, 术中的肠管生机的判断也有可能不准确. 只有在术后一段时间才能发现可疑肠管是否出现真正的坏死, 所以, 经常需要在24或48 h后二次探查^[55]. 二次探查的理论基础一部分基于血管再建术后的血管痉挛, 而腹腔镜探查被提倡用以取代开腹探查, 但是可靠性尚未证实^[56-57].

在成功的进行血管再建术后, 治疗的重点应该在减轻再灌注损伤以防止进一步的肠系膜血管缺血坏死. 如果血流动力学稳定, 可以考虑应用血管扩张剂(静脉或动脉导管). 别嘌呤醇, 血管紧张素转移酶抑制剂, 和其他的氧自由基清除剂可以减轻再灌注损伤.

感染(脓毒症)和MODS在一部分AMI患者中发生^[58], 临床表现和处理原则与其他原因造成的此类并发症相似. 但是, 血管加压素的应用可以造成边缘动脉的血供下降而使病情恶化. 可以应用多巴胺或肾上腺素, 应该避免使用单纯的肾上腺素能受体激动剂.

4.3 预后 AMI的围手术死亡率在44%-95%^[59-60], 即使成功进行血管再建手术后, 长期生存的患者也很少. 概括来说, 结果并不像慢性肠系膜缺血那样令人欣慰. 复发是常见的, 这使得预后变

得更差. 一小部分患者在切除大部分小肠后生存只能依靠长期的完全胃肠外营养生存或者进行小肠移植.

总之, AMI是一种富有挑战性的临床急症. 他的病因不同, 并且经常导致延误的诊断和治疗. 如果临床高度怀疑AMI, 积极有效的检查和治疗应该迅速展开, 只有这样, 才能改善预后. 随着对AMI发病机制的深入研究, 检查诊断手段的进步, 介入技术的发展和药物辅助治疗的提高, 期望可以改善AMI的预后.

5 参考文献

- 1 Heys SD, Brittenden J, Crofts TJ. Acute mesenteric ischaemia: the continuing difficulty in early diagnosis. *Postgrad Med J* 1993; 69: 48-51
- 2 Lock G. Acute intestinal ischaemia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 83-98
- 3 Luther B, Moussazadeh K, Muller BT, Franke C, Harms JM, Ernst S, Sandmann W. The acute mesenteric ischemia - not understood or incurable? *Zentralbl Chir* 2002; 127: 674-684
- 4 Menon NJ, Amin AM, Mohammed A, Hamilton G. Acute mesenteric ischaemia. *Acta Chir Belg* 2005; 105: 344-354
- 5 Bradbury AW, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV. Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg* 1995; 82: 1446-1459
- 6 Stoney RJ, Cunningham CG. Acute mesenteric ischemia. *Surgery* 1993; 114: 489-490
- 7 Clark ET, Gewertz BL. Glucagon potentiates intestinal reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1990; 11: 270-277; discussion 278-279
- 8 Kozuch PL, Brandt LJ. Review article: diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 201-215
- 9 Wilcox MG, Howard TJ, Plaskon LA, Unthank JL, Madura JA. Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 709-716
- 10 Neri E, Sassi C, Massetti M, Roviello F, Giomarelli P, Bizzarri F, Scolletta S, Setacci C. Nonocclusive intestinal ischemia in patients with acute aortic dissection. *J Vasc Surg* 2002; 36: 738-745
- 11 Vicente DC, Kazmers A. Acute mesenteric ischemia. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 453-458
- 12 Liu CD, Rongione AJ, Shin MS, Ashley SW, McFadden DW. Epidermal growth factor improves intestinal adaptation during somatostatin administration in vivo. *J Surg Res* 1996; 63: 163-168
- 13 Tabarov MS, Kudryashov YA. Dilatory humoral adrenergic reactions of regional veins and arteries during systemic hypoxia and hypothermia. *Bull Exp Biol Med* 2002; 133: 35-37
- 14 Hansen MB, Dresner LS, Wait RB. Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res* 1998; 47: 307-327
- 15 Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Bromiker R, Eidelman AI, Gartner LM, Hochman A. Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. *J*

■应用要点

临床外科医师, 尤其是急诊外科医师应该在急腹症患者的诊断和处理过程中细致采集病史和查体, 分析病情要系统全面, 即便少见的肠系膜血管缺血性疾病也应警惕, 特别是在症状和体征不符的、具有高危因素的患者, 需要进一步完善检查来排除或明确诊断, 而在血管外科专业医师有效地干预下会改善预后.

■名词解释

非闭塞性肠系膜血管缺血(NOMI):指没有器质性阻塞的肠系膜缺血性疾病。与心排出量减少和广泛的肠系膜血管收缩有关。内脏血流减少可以由以下因素引起:低血容量、低心排出量、低血压。这种低灌注状态造成肠组织缺血坏死。

- 16 Ates B, Yilmaz I, Geckil H, Iraz M, Birincioglu M, Fiskin K. Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage. *J Pineal Res* 2004; 37: 149-152
- 17 Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386
- 18 Canas PE. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1999; 49: 13-20
- 19 Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, Bhurgri H, Khan A, Gowani SA, Waqar SN, Choudhary MI, Jalil S, Zaidi AH, Ara I. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005; 15: 507-514
- 20 Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 336-343
- 21 Koike K, Moore EE, Moore FA, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. *Crit Care Med* 1994; 22: 1438-1444
- 22 Char DJ, Cuadra SA, Hines GL, Purtill W. Surgical intervention for acute intestinal ischemia: experience in a community teaching hospital. *Vasc Endovascular Surg* 2003; 37: 245-252
- 23 Mansour MA. Management of acute mesenteric ischemia. *Arch Surg* 1999; 134: 328-330; discussion 331
- 24 John AS, Tuerff SD, Kerstein MD. Nonocclusive mesenteric infarction in hemodialysis patients. *J Am Coll Surg* 2000; 190: 84-88
- 25 Howard TJ, Plaskon LA, Wiebke EA, Wilcox MG, Madura JA. Nonocclusive mesenteric ischemia remains a diagnostic dilemma. *Am J Surg* 1996; 171: 405-408
- 26 Morasch MD, Ebaugh JL, Chiou AC, Matsumura JS, Pearce WH, Yao JS. Mesenteric venous thrombosis: a changing clinical entity. *J Vasc Surg* 2001; 34: 680-684
- 27 Brunaud L, Antunes L, Collinet-Adler S, Marchal F, Ayav A, Bresler L, Boissel P. Acute mesenteric venous thrombosis: case for nonoperative management. *J Vasc Surg* 2001; 34: 673-679
- 28 Rhee RY, Gloviczki P, Mendonca CT, Petterson TM, Serry RD, Sarr MG, Johnson CM, Bower TC, Hallett JW Jr, Cherry KJ Jr. Mesenteric venous thrombosis: still a lethal disease in the 1990s. *J Vasc Surg* 1994; 20: 688-697
- 29 Clark ET, Gewertz BL, Bassiouny HS, Zarins CK. Current results of elective aortic reconstruction for aneurysmal and occlusive disease. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1990; 31: 438-441
- 30 Balthazar EJ, Liebeskind ME, Macari M. Intestinal ischemia in patients in whom small bowel obstruction is suspected: evaluation of accuracy, limitations, and clinical implications of CT in diagnosis. *Radiology* 1997; 205: 519-522
- 31 Wiesner W, Morteale KJ, Glickman JN, Ji H, Ros PR. Pneumatosis intestinalis and portomesenteric venous gas in intestinal ischemia: correlation of CT findings with severity of ischemia and clinical outcome. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 177: 1319-1323
- 32 Schindera ST, Triller J, Vock P, Hoppe H. Detection of hepatic portal venous gas: its clinical impact and outcome. *Emerg Radiol* 2006; 12: 164-170
- 33 Smerud MJ, Johnson CD, Stephens DH. Diagnosis of bowel infarction: a comparison of plain films and CT scans in 23 cases. *AJR Am J Roentgenol* 1990; 154: 99-103
- 34 Laghi A, Iannaccone R, Catalano C, Passariello R. Multislice spiral computed tomography angiography of mesenteric arteries. *Lancet* 2001; 358: 638-639
- 35 Gellett LR, Harries SR, Roobottom CA. Urgent contrast enhanced computed tomography in the diagnosis of acute bowel infarction. *Emerg Med J* 2002; 19: 480-481
- 36 Fock CM, Kullnig P, Ranner G, Beaufort-Spontin F, Schmidt F. Mesenteric arterial embolism-the value of emergency CT in diagnostic procedure. *Eur J Radiol* 1994; 18: 12-14
- 37 Matsuki M, Tanikake M, Kani H, Tatsugami F, Kanazawa S, Kanamoto T, Inada Y, Yoshikawa S, Narabayashi I, Lee SW, Nomura E, Okuda J, Tanigawa N. Dual-phase 3D CT angiography during a single breath-hold using 16-MDCT: assessment of vascular anatomy before laparoscopic gastrectomy. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 1079-1085
- 38 Gellett LR, Harries SR, Roobottom CA. Urgent contrast enhanced computed tomography in the diagnosis of acute bowel infarction. *Emerg Med J* 2002; 19: 480-481
- 39 Betzler M. Surgical technical guidelines in intestinal ischemia. *Chirurg* 1998; 69: 1-7
- 40 Mimatsu K, Oida T, Kanou H, Miyake H, Amano S. Open abdomen management after massive bowel resection for superior mesenteric arterial occlusion. *Surg Today* 2006; 36: 241-244
- 41 Grace PA, Da Costa M, Qureshi A, Sheehan S, Burke P, Bouchier-Hayes D. An aggressive approach to acute superior mesenteric arterial ischemia. *Eur J Vasc Surg* 1993; 7: 731-732
- 42 Zwolak RM, Fillingner MF, Walsh DB, LaBombard FE, Musson A, Darling CE, Cronenwett JL. Mesenteric and celiac duplex scanning: a validation study. *J Vasc Surg* 1998; 27: 1078-1087; discussion 1088
- 43 Hansen KJ, Wilson DB, Craven TE, Pearce JD, English WP, Edwards MS, Ayerdi J, Burke GL. Mesenteric artery disease in the elderly. *J Vasc Surg* 2004; 40: 45-52
- 44 Danse EM, Van Beers BE, Goffette P, Dardenne AN, Laterre PF, Pringot J. Acute intestinal ischemia due to occlusion of the superior mesenteric artery: detection with Doppler sonography. *J Ultrasound Med* 1996; 15: 323-326
- 45 Ha HK, Rha SE, Kim AY, Auh YH. CT and MR diagnoses of intestinal ischemia. *Semin Ultrasound CT MR* 2000; 21: 40-55
- 46 Kim MY, Suh CH, Kim ST, Lee JH, Kong K, Lim TH, Suh JS. Magnetic resonance imaging of bowel ischemia induced by ligation of superior mesenteric artery and vein in a cat model. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 187-192
- 47 Maizes JS, Murtuza M, Kvetan V. Oxygen transport and utilization. *Respir Care Clin N Am* 2000; 6: 473-500
- 48 So CY, Gomersall CD, Chui PT, Chan MT. Performance of an oxygen delivery device for weaning potentially infectious critically ill patients.

- Anaesthesia* 2004; 59: 710-714
- 49 McGinty JJ Jr, Hogle N, Fowler DL. Laparoscopic evaluation of intestinal ischemia using fluorescein and ultraviolet light in a porcine model. *Surg Endosc* 2003; 17: 1140-1143
- 50 Galandiuk S, Fazio VW, Petras RE. Fluorescein endoscopy. A technique for noninvasive assessment of intestinal ischemia. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 848-853
- 51 Park WM, Gloviczki P, Cherry KJ Jr, Hallett JW Jr, Bower TC, Panneton JM, Schleck C, Ilstrup D, Harmsen WS, Noel AA. Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *J Vasc Surg* 2002; 35: 445-452
- 52 Train JS, Ross H, Weiss JD, Feingold ML, Khoury-Yacoub A, Khoury PT. Mesenteric venous thrombosis: successful treatment by intraarterial lytic therapy. *J Vasc Interv Radiol* 1998; 9: 461-464
- 53 Sehgal M, Haskal ZJ. Use of transjugular intrahepatic portosystemic shunts during lytic therapy of extensive portal splenic and mesenteric venous thrombosis: long-term follow-up. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11: 61-65
- 54 Rivitz SM, Geller SC, Hahn C, Waltman AC. Treatment of acute mesenteric venous thrombosis with transjugular intramesenteric urokinase infusion. *J Vasc Interv Radiol* 1995; 6: 219-223; discussion 224-228
- 55 Endean ED, Barnes SL, Kwolek CJ, Minion DJ, Schwarcz TH, Mentzer RM Jr. Surgical management of thrombotic acute intestinal ischemia. *Ann Surg* 2001; 233: 801-808
- 56 Anadol AZ, Ersoy E, Taneri F, Tekin EH. Laparoscopic "second-look" in the management of mesenteric ischemia. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2004; 14: 191-193
- 57 Seshadri PA, Poulin EC, Mamazza J, Schlachta CM. Simplified laparoscopic approach to "second-look" laparotomy: a review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 1999; 9: 286-289
- 58 Mamode N, Pickford I, Leiberman P. Failure to improve outcome in acute mesenteric ischaemia: seven-year review. *Eur J Surg* 1999; 165: 203-208
- 59 Christensen MG, Lorentzen JE, Schroeder TV. Revascularisation of atherosclerotic mesenteric arteries: experience in 90 consecutive patients. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8: 297-302
- 60 Cho JS, Carr JA, Jacobsen G, Shepard AD, Nypaver TJ, Reddy DJ. Long-term outcome after mesenteric artery reconstruction: a 37-year experience. *J Vasc Surg* 2002; 35: 453-460

■同行评价

本文综述了肠系膜血管缺血外科诊治进展, 从病理生理过程、病因分类、临床表现、诊断和治疗等方面进行阐述, 行文结构流畅, 重点突出, 内容详尽, 具有较高的学术价值。

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2007-04-28)

炎症性肠病与肠道细菌研究进展

张静, 韩英, 王继恒

■背景资料

炎症性肠病的发病机制目前仍不清楚,他是遗传、免疫感染及环境因素等多方面作用的结果。现在肠道细菌被认为可能是参与IBD的始动和持续因素。IBD的发生可能是肠道细菌及其代谢产物作用于基因易感性宿主,使之产生免疫应答,三者在炎症的开始和持续发展起到了重要的协同作用。

张静, 中国人民解放军总医院军医进修学院 北京市 100853
韩英, 王继恒, 北京军区总医院消化内科 北京市 100700
通讯作者: 张静, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院军医进修学院. xinzhongdeyu@163.com
收稿日期: 2007-02-26 接受日期: 2007-03-31

Advance on the relationship between inflammatory bowel disease and intestinal bacteria

Jing Zhang, Ying Han, Ji-Heng Wang

Jing Zhang, Chinese PLA Postgraduate Medical School, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Ying Han, Ji-Heng Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China

Correspondence to: Jing Zhang, Chinese PLA Postgraduate Medical School, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. xinzhongdeyu@163.com

Received: 2007-02-26 Accepted: 2007-03-31

Abstract

The pathogenesis of inflammatory bowel disease, including ulcerative colitis and Crohn's disease, is still not entirely understood today. The possible etiology includes host genetic susceptibility, mucosal immunity and intestinal microecology as well as their interactions. With the development of microecology in recent years, there were increasing interests in the correlation between intestinal bacteria and pathogenesis of IBD. Many studies reported the pathogenesis of enteropathogenic microorganism and a series of immunological, microecological and pathophysiological changes in IBD. At the same time, many animal experiments and clinical applications have proved the predominance of microecological preparation on intestinal tract immunoregulation, controlling of inflammatory reaction and so on. Probiotics which is one of the microecological preparation has been generally used. This article reviewed the advances on the relationship between inflammatory bowel disease and intestinal bacteria and the use of probiotics in the treatment of IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Intestinal bacterium; Ulcerative colitis; Crohn's disease

Zhang J, Han Y, Wang JH. Advance on the relationship between inflammatory bowel disease and intestinal bacteria. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(12):1406-1410

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 其发病机制至今仍不清楚,可能的病因包括由基因决定的宿主易感性、黏膜免疫和肠道微生态环境三者的相互作用。近年来随着微生物生态学的发展,肠道菌群与IBD发病的关系日益受到关注。关于肠道病原微生物在IBD发病机制及其引起的一系列免疫学、微生物学、病理生理等方面的变化出现了研究和报道,同时微生态制剂在肠道免疫调节、控制炎症反应等方面的优点已有许多动物实验及临床应用证明,其中微生态制剂之一益生菌在IBD应用较普遍,本文就IBD与肠道菌群研究进展及益生菌制剂治疗IBD作一综述。

关键词: 炎症性肠病; 肠道细菌; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病

张静, 韩英, 王继恒. 炎症性肠病与肠道细菌研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1406-1410

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1406.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),其发病机制至今仍不清楚,目前遗传易感性、黏膜免疫和肠道微生态环境三者的相互作用被认为可能参予IBD的发病。近年来随着微生物生态学的发展,肠道菌群与IBD发病的关系日益受到关注。现在流行的学说解释IBD的发生机制是由于基因易感宿主对肠道共栖菌的免疫反应增强引起的。许多研究都表明肠道细菌在IBD的发病机制中起了重要的作用。基于此理论,微生态制剂在治疗IBD中得到广泛

地应用,但其具体作用机制仍未明确,有待进一步探讨。

1 正常人肠道微生态

正常生理状态下,肠道内含有近500种细菌。成人肠道菌群主要集中在结肠和末端小肠,有多达 10^{13} 个不同类型、不同含量的细菌,约是人体内真核细胞的10倍^[1],相当于消化系最大脏器肝脏的重量^[2]。在上段小肠中,需氧菌及G⁺细菌占绝大多数。回盲部细菌密集,厌氧菌占优势,如类杆菌、双歧杆菌、真菌、乳酸菌及梭状芽孢杆菌。结肠中厌氧菌的数量更多,约 10^{11} - 10^{12} CFU/g,优势菌为类杆菌、双歧杆菌和真菌。另外,G⁺球菌、梭状芽孢杆菌、肠球菌、肠杆菌等也常见于结肠中^[3]。盲肠腔内的细菌约25%为兼性厌氧菌,尤其是肠杆菌属,这种细菌在粪便中约占1%^[4]。人体肠道中有些细菌是潜在有害的,可产生毒素,侵犯黏膜,激活致癌原及引起炎症反应。而另一类有益于健康的肠道微生物是人体内正常菌群的成员,或是能调节体内菌群平衡而对人体无毒无害的一些外来细菌。在诸多细菌共存情况下,不同菌种之间的拮抗作用,宿主与细菌之间借助对营养物质的吸收和利用,在消化道中形成相互作用的关系,维系着消化道微生物生态系统的平衡。肠道细菌的组成目前尚未明确,主要原因是取样和培养比较困难。目前只有10%-40%肠道细菌可用培养的方法被鉴别出来。

2 IBD患者与正常人肠道细菌的差异

肠道微生态学家对肠道细菌的研究集中于几种优势细菌,健康成人粪便中大约80%的细菌构成6种优势菌,分别是类杆菌属、双歧杆菌属、乳酸杆菌属、*C.leptum*菌属、*C.coccoides*菌属和肠杆菌属^[5]。而肠道细菌主要由粪便细菌与肠道黏膜细菌构成。一系列的临床和动物实验已使用多种方法发现IBD患者和健康对照者肠道细菌存在不同。在对UC的动物模型临床研究中发现,UC发作期与健康对照组粪便菌群比较,肠杆菌和肠球菌呈有意义增加,尤以肠链球菌数增加显著,而酵母菌变化不显著,乳酸杆菌也略有减少。主要原籍菌双歧杆菌、真杆菌、类杆菌和消化链球菌都呈有意义减少,双歧杆菌检出率尤其低^[6]。Linskens *et al*^[7]也发现在CD患者的粪便菌中,真杆菌和消化球菌是增高的,而双歧杆菌的数量是减少的。而且在UC患者中,兼

性厌氧菌数目增加。Seksik *et al*^[8]使用定量斑点吸印杂交和温度梯度凝胶电泳技术,比较了活动期CD、静止期CD和健康对照者的粪便细菌,发现CD活动期和静止期肠道杆菌属有显著升高,而且发现超过30%的优势菌属于未确定菌属。Dickinson *et al*^[9]报道在UC患者的粪便标本中存在具有黏附和侵袭特性的大肠杆菌。此类大肠杆菌菌株致病因子包括黏附素、溶血素和致死毒素。此后有人应用分子评估方法鉴定了4例CD患者的粪便优势菌,结果如下:(1)大量的优势菌克隆属于不常见的种类(梳状菌属,梭菌属,*Sutterella*, *Verrucomicrobium*等);(2)普通类杆菌属是唯一存在于所有患者的细菌^[10]。而普通类杆菌在人白细胞抗原HLA-B27转基因小鼠的自发性结肠炎中起关键作用^[11]。许多实验都证实与对照组相比,IBD患者肠道黏膜有大量细菌。Swidsinski *et al*^[12]用细菌培养以及16S RNA为引物的定量PCR检测自限性结肠炎、不确定性结肠炎、IBD和健康对照者的肠道黏膜细菌,结果发现IBD患者黏膜细菌浓度显著高于对照组,以CD患者最高。后来有研究^[13]应用原位荧光杂交技术分析IBD、IBS和健康对照者的肠道黏膜细菌,IBD中细菌浓度较IBS和健康对照者都高,并且这些细菌大多具有黏附性。Schultsz *et al*^[14]证实IBD患者较对照者直肠标本中包含更多的细菌,而且,这些细菌定居在黏膜层,但是不黏附于肠上皮细胞,在肠腔中也未发现。Kleessen *et al*^[15]使用荧光原位杂交技术(fluorescent in-site hybridisation, FISH)证实IBD患者切除标本中黏膜表层组织所含细菌多于无IBD的对照组。而且,在UC的83%结肠标本中,CD的56%回肠、25%结肠标本中,细菌侵袭黏膜的现象是非常明显的。但在对照组的组织中未发现。国内崔海宏 *et al*^[16]采用梯度稀释法行肠黏膜菌群分析,结果发现急性期UC患者菌群中肠杆菌、肠球菌及小梭菌的数量显著增加,而双歧杆菌和乳杆菌的数量明显下降,而缓解期与对照组相比无明显差异。拟杆菌及双歧杆菌较急性期明显上升,小梭菌明显下降。急性期CD患者的菌群中肠杆菌和酵母菌明显增加,而双歧杆菌和乳杆菌明显下降。缓解期较正常菌群相比肠杆菌仍很高,而双歧杆菌有回升但仍明显低于正常。缓解期与急性期相比双歧杆菌的数量有明显差异。

3 肠道细菌在IBD中的作用

至今尚未发现特异的细菌与IBD的发病相关,也

■ 研发前沿

IBD的病因和发病机制尚不明确,但肠道菌群对IBD发病的触发作用日益为人所接受,肠道菌群与IBD的关系成为目前研究的热点。

■创新盘点

以前许多IBD的研究都侧重于异常免疫应答、炎症因子等免疫发病机制为主的方面,本文介绍了IBD患者与正常对照者肠道菌群的差异,并详细介绍了肠道细菌参与IBD发病可能的机制及益生菌制剂的应用。

未发现特征性的肠道菌群的变化。随着现代微生物学的发展以及对肠道细菌与IBD研究的进展,现在肠道细菌被认为可能是参与IBD的始动和持续因素。肠道细菌及其产物能刺激肠黏膜免疫系统,诱发这些具有IBD遗传易感性人群肠黏膜免疫系统功能紊乱,产生异常的免疫反应,导致IBD发病^[17]。病原微生物抗原经抗原递呈细胞的作用而激活T淋巴细胞,再经T细胞产生的具有不同激活效应的细胞因子而激发不同特征的免疫病理损伤。现在流行的学说解释IBD的发生机制是由于基因易感宿主对肠道共栖菌的免疫反应增强引起的。这种假说有以下几种证据支持:大多数炎症发生在肠腔细菌浓度最高的区域,广谱抗生素能改善慢性肠道炎症,对粪流(fecal stream)进行外科转移手术能预防Crohn's病的复发。最重要的是,虽然肠道慢性炎症发病机制各不相同,但许多IBD动物模型[例如白介素(IL)-10基因敲除小鼠和HLAB27转基因大鼠]都有一个共同特点:这些动物模型在无菌条件下喂养不会形成肠道炎症^[18]。

最近关于IBD与健康对照者肠道细菌的大量研究表明,在IBD患者中存在肠道菌群失调。肠道菌群失调是IBD发病的触发点。肠道菌群失调时,条件致病菌数量增多,并产生一些能诱导肠道炎症的物质,例如细菌脂多糖(LPS)、肽聚糖(peptidoglycan)、脂蛋白(liproteins)等,这些物质能激活肠黏膜免疫系统,从而诱发具有IBD遗传易感性个体的肠道产生异常免疫反应,导致IBD发病。细菌过度生长和菌群失调也与慢性贮袋炎的发生、发展有关,UC患者结肠切除术后再进行回肠-肛门吻合术后在回肠贮袋中可发生炎症反应^[19]。正常肠黏膜免疫系统对肠道内正常菌群处于免疫耐受状态,肠道菌群失调时,肠道免疫系统对肠道内已发生变化的菌群不能耐受。Duchmann *et al*^[20]研究发现,从正常小鼠脾脏、小肠和大肠提取的单个核细胞与自体肠菌的裂解液共育时,不会发生增殖反应,但与异体肠菌的裂解液共育时,发生强烈的增殖反应;说明TNBS结肠炎小鼠肠黏膜局部和机体系统免疫对肠道细菌的免疫耐受被打破。Duchmann *et al*^[21]进一步研究发现,将活动性IBD患者炎症肠黏膜固有层单个核细胞(LPMC)在体外与自身肠道内细菌裂解液共育后,LPMC发生强烈的增殖反应,伴有大量的细胞因子如IL-12, IFN- γ , IL-10等分泌,而正常人LPMC对自身肠菌裂解液不发生增殖反应,说明正常人对自身的肠菌存在耐

受,IBD患者的这种耐受被打破。最近研究发现,细菌DNA的CpG基序能刺激一些免疫细胞产生TH1型为主的免疫反应。DSS动物结肠炎发生后,用细菌CpGs处理动物会加重动物急性慢性结肠炎的病情;而在诱导结肠炎开始前,用细菌CpGs处理动物可能会诱导免疫耐受,并明显减轻结肠炎病情^[22]。肠道菌群失调,IBD患者肠道正常细菌的种类、数量和功能发生了改变。丁酸盐和其他短链脂肪酸(SCFA)是厌氧菌在肠道内发酵难于被消化吸收的食物成分,如碳水化合物和蛋白质等所产生,具有一定的抗炎特性。由于肠道细菌的种类和功能发生了改变,IBD患者肠腔内丁酸盐的浓度和SCFA的量明显减少^[23]。最近Luhers *et al*^[24]观察了丁酸盐灌肠的临床效果,实验中11例UC患者分别接受丁酸盐或安慰剂灌肠,治疗4-8 wk后丁酸盐治疗组患者临床症状明显缓解,炎症肠道中NF- κ B激活的单核细胞数量明显减少,而对照组患者的临床症状没有明显改善,说明丁酸盐对UC具有一定的临床治疗效果。总之,目前大量的实验和临床资料显示,肠道菌群参与了IBD的发病。某些具有遗传易感性的人群肠道菌群失调,细菌及产物等抗原可能诱导肠黏膜免疫功能失衡,使肠黏膜免疫系统对肠腔内抗原失去耐受,引发了肠道炎症。

4 益生菌与IBD

由于近来的研究显示IBD中存在菌群失调,益生菌制剂在IBD中的作用日益受到人们的重视。益生菌是对健康有益的活菌或活菌性膳食补充剂。目前,临床常用的益生菌制剂主要有:双歧杆菌活菌制剂(丽珠肠乐、回春生),双歧杆菌三联活菌制剂(培菲康、金双歧、贝飞达),蜡芽芽孢杆菌活菌制剂(促菌生),地衣芽孢杆菌活菌制剂(整肠生),枯草杆菌和粪球菌二联活菌制剂(美常安)等。关于益生菌在IBD中可能的作用机制包括与肠黏膜上皮细胞紧密结合,提高黏膜防御屏障,阻止致病菌的定植和入侵;提高抗炎细胞因子水平;与病原菌竞争性黏附于上皮细胞,促进上皮细胞分泌黏液使其在黏膜和微生物之间形成保护层,防止栖生菌易位;增强巨噬细胞对病原菌的吞噬以及非T细胞依赖性IgA的分泌^[25]。但最近的研究表明益生菌在IBD发病中还可能存在其他机制包括:(1)通过阻止细菌黏附、易位或产生抗菌物质来抑制病原体;(2)阻断促炎细胞因子的分泌;(3)调节肠道菌群,并且产生对肠道功能有重要作用的营养物质^[26]。虽然

设计周密、双盲的临床对照试验为数不多,但近年来人们应用益生菌治疗IBD实验动物已经取得了令人鼓舞的结果。目前有关益生菌在IBD治疗中的效果最有力的证据是在贮袋炎中的治疗^[27-28]。Kruis *et al*^[29]最近的研究与他以前的研究结果一致,他们通过1 a的观察研究发现,大肠埃希杆菌Nissle1917与小剂量的美沙拉嗪(1.5 g/d)在维持缓解UC的发病中疗效相似。Kato *et al*^[30]应用柳氮磺吡啶或5-ASA治疗的轻至中度小部分UC患者口服包含双歧杆菌的或安慰剂的发酵乳,经短期随访(12 wk)后,口服包含双歧杆菌发酵乳的患者40%病情缓解,安慰剂组只有33%缓解。其他短期无安慰剂对照的实验表明治疗活动性UC时小剂量美沙拉嗪加入益生菌制剂VSL#3的治疗效果较单用柳氮磺吡啶或5-ASA好。Borody *et al*^[31]将益生菌注入6个溃疡性结肠炎患者肠腔并保留5 d以图恢复正常菌群,而无其他合并治疗,结果发现在4 mo内一直处于症状完全缓解期。以上研究结果表明益生菌不但可以治疗UC,而且能预防其复发。目前缺乏足够的证据支持益生菌制剂在CD中治疗有效(可能在儿童CD中例外)。且最近的安慰剂对照实验并不能证明LGG在诱导和维持小部分CD患者缓解期中的效果。

总之,目前有关IBD与肠道细菌关系的研究表明IBD患者肠道菌群不正常,与健康对照者有很大区别,肠道细菌在IBD发病机制中发挥了重要的作用,但究竟是肠道菌群失调诱发IBD还是IBD继发肠道菌群改变目前还不清楚,其具体机制有待进一步研究。虽然肠道菌群分析不能对IBD的诊断起决定性作用,但可为菌群与IBD的关系提供线索并可指导临床治疗。基于这一点,益生菌制剂作为一种安全有效无副作用的治疗方法,应用于临床治疗IBD的前景充满希望,但同时也存在着许多亟待解决的问题。例如益生菌可被用于治疗IBD的最佳剂量、疗程及安全性等都是目前尚不清楚而又具有探讨价值的热点问题。

5 参考文献

- 1 Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004; 9: 180-197
- 2 熊德鑫. 肠道微生态与疾病. 现代消化及介入诊疗 2005; 10: 60
- 3 Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 333-346
- 4 Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C,

Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4939-4942

- 5 Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2263-2266
- 6 熊德鑫. 现代微生态学. 北京: 中国科学技术出版社, 2000: 252-255
- 7 Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; 29-40
- 8 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-242
- 9 Dickinson RJ, Varian SA, Axon AT, Cooke EM. Increased incidence of faecal coliforms with in vitro adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1980; 21: 787-792
- 10 Mangin I, Bonnet R, Seksik Ph. Molecular Inventory of Faecal Microbiota in Patient with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 4
- 11 Rath HC, Ikeda JS, Linde HJ, Scholmerich J, Wilson KH, Sartor RB. Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 1999; 116: 310-319
- 12 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 44-54
- 13 Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380-3389
- 14 Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999; 117: 1089-1097
- 15 Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1034-1041
- 16 崔海宏, 陈村龙, 孙勇, 王亚东, 张耀东, 杨玉捷, 王群英, 潘令嘉. 炎症性肠病患者肠黏膜菌群改变及抗体反应. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 276-278
- 17 白爱平. 炎症性肠病发病机制的微生物因素. 世界华人消化杂志 2006; 14: 645-649
- 18 Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 895-904
- 19 Ruseler-van Embden JG, Schouten WR, van Lieshout LM. Pouchitis: result of microbial imbalance? *Gut* 1994; 35: 658-664
- 20 Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with

■名词解释

- 1 肠道菌群失调: 指人体肠道内致病菌与正常菌群比例失调, 致病菌、条件致病菌的数量增多, 而双歧杆菌、乳酸杆菌等对人体有益的正常细菌数量减少。
- 2 益生菌: 是指对健康有益的活菌或活菌性膳食补充剂。

■同行评价

本文就IBD与肠道菌群研究进展及益生菌制剂治疗IBD作了综述,其中就正常人肠道微生态、IBD患者与正常人肠道细菌的差异、肠道细菌在IBD中的作用、益生菌与IBD以及目前存在的问题与展望一一详细说明,条理清晰,有较高学术价值。

- interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996; 26: 934-938
- 21 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455
- 22 Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005; 129: 913-927
- 23 Ross AS, Cohen RD. Medical therapy for ulcerative colitis: the state of the art and beyond. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 488-495
- 24 Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466
- 25 Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633
- 26 Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 426-430
- 27 Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53: 108-114
- 28 Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209
- 29 Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623
- 30 Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1133-1141
- 31 Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 42-47

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2007-04-28)

NF- κ B与细胞凋亡

苏剑东, 吴灵飞

苏剑东, 吴灵飞, 汕头大学医学院第二附属医院消化内科 广东省汕头市 515041
通讯作者: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路, 汕头大学医学院第二附属医院消化内科. lingfeiwu@21cn.com
电话: 0754-8915810 传真: 0754-8346543
收稿日期: 2007-01-16 接受日期: 2007-03-28

Relationship between nuclear factor-kappa B and cell apoptosis

Jian-Dong Su, Ling-Fei Wu

Jian-Dong Su, Ling-Fei Wu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ling-Fei Wu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Dongxia North Road, Shantou 515041, Guangdong Province, China. lingfeiwu@21cn.com
Received: 2007-01-16 Accepted: 2007-03-28

Abstract

The roles of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) family and its signaling transduction pathway in apoptosis has been the focus of intense investigation all over the world. Researches show that NF- κ B signaling pathway exerts anti-apoptotic function via many other proteins, including IAPs, Bcl-2, TRAF, JNK, FLIP, A20, Gadd45 β , MnSOD and so on, but the exact mechanism remains unclear. Inhibition of NF- κ B activation can promote the process of programmed cell death, and may become new avenues for therapeutic intervention in immune diseases, chronic inflammatory diseases and certain cancers. Furthermore, recent studies reveal that NF- κ B can promote apoptosis, and the types and quantity of NF- κ B subunits play a key role in apoptosis. In this review, we presented an overview of the progress in the relationship between NF- κ B and apoptosis.

Key Words: Nuclear factor-kappa B; Cell apoptosis; Signaling transduction pathway

Su JD, Wu LF. Relationship between nuclear factor-kappa B and cell apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1411-1416

摘要

NF- κ B家族及其介导的细胞信号转导通路在细胞凋亡中的作用是国内外研究的热点. 研究发现, NF- κ B信号转导途径可以通过多种途径抑制细胞凋亡, 与IAPs家族、Bcl-2家族、TRAF家族、JNK、FLIP、A20、Gadd45 β 、MnSOD等有很大关系, 但其具体机制尚未完全清楚. 通过抑制NF- κ B信号转导途径的激活, 促进细胞凋亡, 可能成为治疗免疫、炎症、肿瘤等疾病的新途径. 此外, 近年的研究证明NF- κ B尚具有促细胞凋亡的作用, 并发现NF- κ B亚单位的种类及数量在细胞凋亡中起着决定性的作用, 为疾病的治疗提供了新的策略. 本文就NF- κ B与细胞凋亡关系的研究进展作一综述.

关键词: NF- κ B; 细胞凋亡; 信号转导通路

苏剑东, 吴灵飞. NF- κ B与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1411-1416

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1411.asp>

0 引言

细胞死亡的方式有凋亡和坏死两种. 凋亡是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程, 又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 形态上以胞膜及细胞器相对完整, 细胞皱缩、核固缩为特征, 与坏死时细胞结构全面溶解、破坏完全不同^[1]. 目前的研究揭示引起凋亡主要有两条途径: 细胞外的死亡受体途径及细胞内的线粒体途径^[2]. 前者主要是刺激因素激活细胞内P53, Fas, Bcl-2, NF- κ B等基因, 由肿瘤坏死因子(TNF)受体家族介导, 使Caspase-8激活^[3-4]; 后者是通过刺激因素影响细胞内线粒体的膜电位, 导致线粒体内细胞色素C释放, 胞内Ca⁺⁺浓度升高, pH值下降, 使Caspase-9激活. 两个途径最后都导致效应性Caspase-3活化, 效应性Caspase-3、-6、-7激活内切核酸酶, 使DNA链断裂, 最终细胞结构的全面解体^[5-7].

NF- κ B是一类具有多向转录调节作用的核

■背景资料

NF- κ B信号转导途径具有抑制细胞凋亡和促细胞凋亡的双向作用. NF- κ B抑制细胞凋亡的作用与IAP家族, Bcl-2家族, TRAF家族, JNK, FLIP, A20, Gadd45 β , MnSOD等有关, 但其具体机制未完全清楚. 抑制NF- κ B的激活, 可能成为治疗免疫、炎症、肿瘤等疾病的新途径.

■研发前沿

NF- κ B抑制细胞凋亡的具体机制是多年来研究的重点,如何抑制NF- κ B的激活和开发特异性高的抑制剂则是近年研究的热点。

蛋白因子,广泛存在于多种组织细胞中,激活后参与许多基因的转录调控,在免疫、炎症、氧化应激、细胞增殖、细胞凋亡等生理病理过程中发挥作用。近年的研究表明,NF- κ B与细胞凋亡的关系密切,其参与多种凋亡相关基因的转录调控,具有抑制细胞凋亡作用及促细胞凋亡的双向作用^[8]。但具体机制还不十分清楚。本文就NF- κ B信号转导途径与细胞凋亡关系的研究作一综述。

1 NF- κ B信号转导通路概述

1.1 NF- κ B、I κ B和IKK家族的生物学特性 NF- κ B是属于Rel家族的转录因子。目前,人们已发现哺乳动物细胞内NF- κ B家族包括5个成员,分别是p65(RelA), RelB, c-Rel, p50/p105(NF- κ B1)和p52/p100(NF- κ B2)。结构上他们的N端都具有一个由300个氨基酸组成的Rel同源区(Rel homology domain, RHD)。该区域含有二聚体化区、DNA结合区和核定位信号区(NLS),分别具有与同源或异源亚基形成二聚体、与DNA上的 κ B序列结合、与I κ B家族成员相互结合等功能。此外, p65、RelB和c-Rel的C端含有转录激活域(transactivation domain),其中富集丝氨酸、酸性氨基酸和疏水性氨基酸,能直接作用于转录元件而激活转录过程,而p50和p52则无此结构。静息状态下,他们以同源或异源二聚体的形式与I κ B家族蛋白结合并存在于细胞质内。其中以p50/p65二聚体(即通常所指的NF- κ B)最普遍,几乎存在于所有细胞中^[9-10]。

NF- κ B的内源性抑制因子主要是I κ B抑制蛋白家族,后者有7个成员,包括I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl3, p105和p100。他们均有一个保守的结构域,在该结构域内有5-7个与NF- κ B蛋白相互作用的锚蛋白(ANK)重复序列和与降解有关的C端PEST序列。不同的I κ B抑制NF- κ B/Rel二聚体的能力不同,他们与NF- κ B二聚体上RHD的氨基酸残基发生作用,掩盖NF- κ B的NLS,使之停留在胞质而抑制NF- κ B核易位^[11-12]。

IKK激酶(IKK)由一个大的蛋白激酶复合体组成,大小700-900 kDa,包括3个亚单位,即具有催化活性的IKK α (IKK1)、IKK β (IKK2)和一个有调节功能的IKK γ (NEMO, IKKAP)。IKK α 和IKK β 均具有3个相同的结构,分别是N端丝/苏氨酸蛋白激酶催化结构域、C端螺旋-环-螺旋(HLH)结构域及中间的锌指结构域。他们都能催化I κ B,但磷酸化位点有所不同,IKK α 可以使

I κ B α 上Ser32和Ser36磷酸化,而IKK β 不仅可以使I κ B α 上Ser32和Ser36磷酸化,还能使I κ B β 上的Ser19、Ser23磷酸化。具有调节功能的IKK γ 具有两个伸展的 α -螺旋区域和一个锌指结构域。他虽然没有催化活性,但IKK的活性依赖于IKK γ 亚单位的完整性^[13-16]。

1.2 NF- κ B信号转导途径的激活及调节功能 大量的实验证明,许多因素可以引起NF- κ B信号转导途径的激活。目前公认的主要包括两个途径:经典途径及旁路途径^[17-18]。细胞在静息状态下,细胞质中的p50/p65与I κ B结合成三聚体,使p50/p65不能核易位。在经典途径中,当细胞受到如细胞因子、有丝分裂原、内毒素、病毒蛋白、过氧化物、蛋白激酶C、钙离子载体、蛋白合成抑制剂及X射线等细胞外信号刺激时,IKK的IKK β 亚单位被磷酸化激活,继而引起I κ B α 的Ser32和Ser36位点被磷酸化。磷酸化的I κ B α 再被泛素化后在26S蛋白水解酶复合体作用下降解。而被释放的p50/p65则进行核易位,与基因上的 κ B位点发生特异性结合,从而发挥调节细胞功能的作用^[19]。与经典途径不同,旁路途径主要是指含有p100或p105的二聚体的NF- κ B的激活。在特定细胞类型中,细胞外信号刺激细胞后,在NF- κ B诱导激酶(NIK)的作用下引起IKK α 磷酸化活化,从而进一步活化p100,导致p100发生磷酸化依赖性剪切,生成有活性的p52: RelB复合物并进入细胞核与靶基因结合,调节基因的表达^[20]。除此之外,近年的研究发现,紫外线激活NF- κ B的机制与以上途径不同。紫外线通过激活酪蛋白激酶2(CK2)引起I κ B α 的C端磷酸化,从而引起I κ B α 泛素化后降解。CK2的激活不依赖IKK而是通过p38丝裂原活化蛋白激酶,因此p38-CK2-I κ B α 也是激活NF- κ B的途径之一^[21-22]。

NF- κ B激活的调节包括正反馈调节和负反馈调节^[23]。细胞外信号刺激引起NF- κ B的激活可以增加细胞内的激活因子的表达增加,如细胞因子TNF和IL-1等的表达增加,这些因子的表达增加又反过来激活NF- κ B^[24]。NF- κ B的负反馈调节主要通过p105及I κ B α 来执行。p105及I κ B α 的基因均有NF- κ B的结合位点。核易位的NF- κ B与这些位点结合后增加p105及I κ B α 的表达。p105的增加导致p50二聚体也增加,由于p50缺乏反式转录激活域,与DNA结合可以抑制转录,所以p50二聚体可以通过竞争DNA结合位点降低NF- κ B介导的效应。另一方面,由于NF- κ B与I κ B α 亲和力大于其与DNA的亲和力,新合成的I κ B α 进

■相关报道

Calzado最近报道,通过抑制NF- κ B的激活治疗炎症性疾病和肿瘤的药物研究取得很大进展,部分NF- κ B抑制剂已经进入临床II期试验。

入核内与NF- κ B结合, 使其从DNA上解离下来, 然后在I κ B α 分子中的核输出序列(NES)作用下促使NF- κ B重新回到细胞质中^[25].

2 NF- κ B抑制细胞凋亡的作用

首先证实NF- κ B具有抑制细胞凋亡作用是在对RelA^{-/-}小鼠模型的研究中被发现. 实验中发现剔除RelA基因的胎鼠发育到妊娠中期时死于大片肝细胞的凋亡^[26], 其机制是通过肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)介导^[27]. 进一步的研究发现, NF- κ B的激活对成年鼠肝细胞损伤也具有保护作用^[28]. 目前的许多研究提示NF- κ B的激活对细胞的生存具有重要意义. NF- κ B抗细胞凋亡是一个涉及多个信号通路的复杂过程, 但其主要方式是通过诱导或上调抗凋亡基因的表达实现的. 这些基因调节位点上有NF- κ B的结合位点, 他们的表达产物通过抑制细胞凋亡的死亡受体途径或线粒体途径发挥作用. 到目前为止, 研究发现细胞凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)、Bcl-2家族、TNFR-associated factor (TRAF1, TRAF-2)、JNK、c-FLIP、IEX-1L等都参与NF- κ B激活后的抗细胞凋亡过程^[29].

2.1 IAPs家族与NF- κ B 大量研究表明, 细胞凋亡抑制蛋白(IAPs)家族通过结合Caspase3, Caspase7, 阻止Caspase9的活化起到抗细胞凋亡的作用. IAPs家族中与NF- κ B抗细胞凋亡作用密切相关的是c-IAP1、c-IAP2和XIAP^[30-31]. Chu *et al*^[32]研究发现, TNF- α 通过刺激NF- κ B诱导c-IAP2表达, 而c-IAP2大量表达降解I κ B导致NF- κ B活化, 从而抑制细胞凋亡. Wang *et al*^[33]也报道, NF- κ B通过诱导c-IAP1, c-IAP2及TRAF1, TRAF-2的表达, 抑制Caspase8而起到抗细胞凋亡的作用. 近几年的研究发现, XIAP除了具有抑制Caspase3, Caspase7作用外, 还有阻止JNK激活的作用^[34].

2.2 Bcl-2家族与NF- κ B Bcl-2家族包括抗细胞凋亡的Bcl-2, Bcl-Xl, BHRF1, Ced-9和促细胞凋亡的Bax, Bcl-Xs, Bad, Bak及参与细胞存活调节的A1, Mcl-1等. 研究发现, Bcl-2, Bcl-Xl基因上有 κ B位点, 而Bax、Bad则无 κ B位点. NF- κ B激活可引起Bcl-2家族中抗细胞凋亡的基因表达增加, 尤其是Bcl-Xl及A1, 进而发挥此类因子降低线粒体膜的通透性、抑制线粒体去极化及细胞色素C释放的抗凋亡作用^[35-37].

2.3 TRAF家族与NF- κ B TRAF家族是一种重要的接头分子, 在目前发现的6种人类TRAF分子

中, 以TRAF2研究较广泛. TRAF2分子在NF- κ B激活的信号传导过程中扮演重要的角色^[38-39]. 在TNF诱导细胞凋亡过程中, TNF与TNFR1结合并使TNFR1胞内三聚化, 后者与TRADD (TNF-receptor-associated death domain)连接. TRADD与RIP(Receptor-interacting protein)及TRAF2连接形成的信号复合物进一步募集含有TRAF的蛋白分子或其他一些具有酶活性的效应分子, 形成一个大的信号传导复合物, 此复合物中含有NIK(NF- κ B诱导激酶), NIK活化后可磷酸化IKK α 并使之激活, 后者反过来又磷酸化I κ B, 使之泛素化、降解. NF- κ B随之活化并可转位至核内与DNA相应部位特异结合^[40]. 另外, Chandel *et al*^[41]发现TRAF分子可通过改变ROS(活性氧)水平增强NF- κ B活化而不依赖于NIK.

2.4 JNK与NF- κ B c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路是丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导通路之一^[42]. 研究表明, JNK通路的激活与促凋亡作用有关^[43-45]. 在基因敲除实验中, jnk1, jnk2或jnk3基因单突变失活小鼠和jnk1/jnk3或jnk2/jnk3基因双突变失活小鼠均正常存活, 而jnk1/jnk2基因的双突变失活导致胚胎死亡, 出现严重的脑细胞凋亡调节障碍, 表明jnk1和jnk2基因在脑发育早期的细胞生理性凋亡中有重要调节作用^[46]. 许多研究表明, NF- κ B可以抑制JNK介导的细胞凋亡^[47-51]. 例如, 在TNF- α 诱导的细胞凋亡的过程中, 应用抑制剂抑制NF- κ B活化, 可以引起JNK的持续活化, 最终引起细胞凋亡^[34,52]. 动物实验证明, LPS或ConA引起的肝细胞毒性是通过TNFR诱导, 在此过程中NF- κ B可被激活而起到保护肝细胞的作用. 当剔除IKK β 后, 可引起JNK表达明显而增加促进肝细胞损伤. 而在剔除JNK1或JNK2抑制JNK的表达后, 减轻了TNFR介导的肝细胞损伤^[53-54]. 上述研究表明, NF- κ B可通过抑制JNK激活而起到抗细胞凋亡的作用.

2.5 FLIP与NF- κ B Fas相关死亡区域蛋白样白介素-1 β 转化酶抑制蛋白(FLIP)是一种阻遏蛋白, 他主要通过抑制Fas/FasL-FADD-Caspase-8通路活化而发挥抗凋亡作用. FLIP基因编码序列中存在 κ B位点, NF- κ B蛋白可以上调FLIP的转录表达而使细胞免于Fas介导的细胞凋亡^[55]. 研究发现FLIP除了阻断上述通路外, 还可抑制肿瘤坏死因子凋亡诱导配体(TRAIL)介导的促凋亡通路, 在这过程中FLIP通过竞争结合FADD而

■创新盘点

本文系统地回顾了NF- κ B家族的生物学特性及其在细胞凋亡中的双向作用, 详细总结了NF- κ B抑制细胞凋亡的机制及NF- κ B亚单位的种类及数量在细胞凋亡中的作用.

■应用要点

NF- κ B在炎症疾病、肿瘤形成、肿瘤细胞对化疗药物的耐药等过程中起着重要的作用。对NF- κ B如何抑制细胞凋亡及促细胞凋亡的研究,将有助于开发新的治疗途径及药物。

发挥作用^[56]。有许多文献报道抑制肿瘤细胞的NF- κ B活性,可提高TRAIL的促凋亡作用并伴随FLIP表达下降^[57-58],提示NF- κ B通路可能通过FLIP来抑制TRAIL的促凋亡作用。

2.6 其他 随着研究的深入,发现越来越多的信号通路与NF- κ B抗细胞凋亡的机制有关。A20是一种锌指蛋白,过去的研究发现A20蛋白在终止NF- κ B的激活中起着重要的作用^[59]。最近的研究发现,NF- κ B可通过调控A20蛋白的表达影响TNF诱导的细胞凋亡过程^[60]。Gadd45 β 是Gadd45家族中的一员,属于核蛋白。研究发现,NF- κ B是Gadd45 β 的上游调节因子,可调节Gadd45 β 的表达,后者则可通过调控JNK来抑制细胞凋亡的过程^[61]。Hirose *et al*^[62]研究发现超氧化物歧化酶(MnSOD)的过量表达可抑制TNF- α 的毒性作用,可能的机制是TNF- α 引起NF- κ B激活,从而使MnSOD的表达增加,MnSOD可通过清除ROS而起到抑制细胞凋亡的作用^[63]。

3 NF- κ B促细胞凋亡的作用

随着NF- κ B抑制细胞凋亡作用机制的研究深入,并应用于炎症、肿瘤等疾病的治疗,人们发现NF- κ B在不同的刺激因素及特定的细胞类型中还有促进细胞凋亡的作用^[64-67]。Ivanov *et al*^[68]在UV诱导人类黑色素瘤细胞凋亡过程中发现下调NF- κ B的表达同时伴有细胞凋亡的减少。Campbell *et al*^[66]研究则发现NF- κ B可通过抑制抗凋亡基因的表达而使细胞发生凋亡。在肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)信号途径的研究中,Chen *et al*^[69]研究发现,NF- κ B亚单位的种类及数量在细胞凋亡中起着决定性的作用,当p65(RelA)过表达时,发生凋亡抑制;当c-Rel表达增加时,则促进凋亡的发生。这些研究结果表明,NF- κ B在细胞凋亡中是起抑制凋亡还是促进凋亡作用取决于不同的刺激因素及细胞类型,并与激活的NF- κ B亚单位的种类及数量有关,其具体机制有待进一步的研究。

总之,在细胞凋亡过程中,许多蛋白因子参与了其信号转导。在免疫、炎症、肿瘤的形成、肿瘤细胞对化疗药物的耐药性等病理生理过程中NF- κ B起着抑制细胞凋亡的作用。然而,在特定的刺激及细胞类型中NF- κ B也有促细胞凋亡的作用,尤其是NF- κ B亚单位的种类及数量在细胞凋亡中起着决定性的作用提示我们,对NF- κ B及相关信号转导通路具体机制的研究,将有助于加深对不同疾病发生的分子机制的认识,

也可为治疗这些疾病开拓新的途径^[70-72]。

4 参考文献

- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219
- Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26-35
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114: 181-190
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589-598
- Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003; 4: 416-423
- Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 2006; 25: 6800-6816
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260
- Huxford T, Malek S, Ghosh G. Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64: 533-540
- Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, McKeithan TW, Scheidereit C. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2489-2493
- Malek S, Huang DB, Huxford T, Ghosh S, Ghosh G. X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 23094-23100
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81-96
- Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999; 1999: RE1
- May MJ, Marienfeld RB, Ghosh S. Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. *J Biol Chem* 2002; 277: 45992-46000
- Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 2000; 12: 85-98
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-288
- Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005; 115: 2625-2632
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerincck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 1999; 189: 1839-1845
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary

- conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495-1499
- 21 Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell* 2003; 12: 829-839
 - 22 Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19: 154-161
 - 23 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; 18: 2195-2224
 - 24 Kulms D, Schwarz T. NF-kappaB and cytokines. *Vitam Horm* 2006; 74: 283-300
 - 25 Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006; 6: 111-130
 - 26 Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995; 376: 167-170
 - 27 Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, Obata Y. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2994-2999
 - 28 Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 2002; 110: 193-202
 - 29 Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 8961-8982
 - 30 Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13: 852-860
 - 31 Varfolomeev E, Wayson SM, Dixit VM, Fairbrother WJ, Vucic D. The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *J Biol Chem* 2006; 281: 29022-29029
 - 32 Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10057-10062
 - 33 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683
 - 34 Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* 2004; 117: 5197-5208
 - 35 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
 - 36 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490
 - 37 Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501
 - 38 Xia ZP, Chen ZJ. TRAF2: a double-edged sword? *Sci STKE* 2005; 2005: pe7
 - 39 Wajant H, Scheurich P. Analogies between Drosophila and mammalian TRAF pathways. *Prog Mol Subcell Biol* 2004; 34: 47-72
 - 40 Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 19-32
 - 41 Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2001; 276: 42728-42736
 - 42 Chen YR, Tan TH. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol* 2000; 16: 651-662
 - 43 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912
 - 44 Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 2003; 25: 17-24
 - 45 Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15: 36-42
 - 46 Behrens A, Jochum W, Sibilila M, Wagner EF. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 2000; 19: 2657-2663
 - 47 Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001; 414: 313-317
 - 48 Tang F, Tang G, Xiang J, Dai Q, Rosner MR, Lin A. The absence of NF-kappaB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8571-8579
 - 49 De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 2001; 414: 308-313
 - 50 Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* 2004; 3: 1524-1529
 - 51 Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003; 22: 3898-3909
 - 52 Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-227
 - 53 Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity* 2003; 19: 725-737
 - 54 Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2003; 37: 824-832
 - 55 Pajak B, Orzechowski A. FLIP-an enemy which might lose the battle against the specific inhibitors of translation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59: 140-149
 - 56 MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 2003; 139: 89-97
 - 57 Tschoopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 552-558

■名词解释

核易位: 存在于细胞浆中的蛋白被激活后, 通过核膜进入细胞核内发挥生物活性的过程。

■同行评价

本文综述了NF- κ B与细胞凋亡的关系, 文章文字简洁, 层次清楚, 引用的文献较新, 有较高的学术价值.

- 58 Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999; 59: 734-741
- 59 Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1143-1151
- 60 Malewicz M, Zeller N, Yilmaz ZB, Weih F. NF kappa B controls the balance between Fas and tumor necrosis factor cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20. *J Biol Chem* 2003; 278: 32825-32833
- 61 Zazzeroni F, Papa S, Algeciras-Schimnich A, Alvarez K, Melis T, Bubici C, Majewski N, Hay N, De Smaele E, Peter ME, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. *Blood* 2003; 102: 3270-3279
- 62 Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J* 1993; 7: 361-368
- 63 Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C, Machii T, Pestell RG, Kanakura Y. E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* 2002; 9: 1017-1029
- 64 Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, Porter AG, Castle VP, Oipari AW Jr. NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 48921-48929
- 65 Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM. An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 1999; 189: 145-158
- 66 Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell* 2004; 13: 853-865
- 67 Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin YW, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1883-1889
- 68 Ivanov VN, Ronai Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene* 2000; 19: 3003-3012
- 69 Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res* 2003; 63: 1059-1066
- 70 Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem* 2007; 14: 367-376
- 71 Camandola S, Mattson MP. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 123-132
- 72 O'Sullivan B, Thompson A, Thomas R. NF-kappa B as a therapeutic target in autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 111-122

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)

表达胃癌相关基因GCRG213小干扰RNA腺相关病毒载体的构建和高滴度病毒制备

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 蒋立新, 王卫华, 尤纬缔

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔,
解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
蒋立新, 北京本元正阳基因技术有限公司 北京市 100176
国家自然科学基金资助项目, No. 30370635
通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市复兴路28号, 解放军总医院
南楼消化科. benyanwu@vip.sina.com
电话: 010-66939443
收稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-03-19

Construction of recombinant adeno-associated virus vector expressing GCRG213 short interference RNA and preparation of high-titer virus

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Li-Xin Jiang, Wei-Hua Wang, Wei-Di You

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Wei-Hua Wang, Wei-Di You, Department
of Gastroenterology, South Building, General Hospital of
Chinese PLA, Beijing 100853, China
Li-Xin Jiang, Beijing AGTC Gene Technology Company
LTD, Beijing 100176, China
Supported by National Natural Science Foundation of
China, No. 30370635
Correspondence to: Dr. Ben-Yan Wu, Department of Gas-
troenterology, South Building, General Hospital of Chinese
PLA, Beijing 100853, China. benyanwu@vip.sina.com
Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-03-19

Abstract

AIM: To construct the recombinant adeno-associated virus vector expressing gastric cancer related gene GCRG213 short interference RNA (rAAV-GCRG213-siRNA) and use it for the preparation of high-titer virus.

METHODS: IMG800-GCRG213-siRNA plasmid, which was constructed with GCRG213 siRNA, was digested with *Bam*H I and *Bgl* II. A 410-bp fragment, which contained U6 promoter and GCRG213 siRNA, was obtained and inserted into the adeno-associated virus vector plasmid pSNAV2.0 that was digested with *Bam*H I. The positive vectors were analyzed through enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant plasmid was transfected into BHK cells

using LipofecLamine™2000. The G418-resistant cells were obtained and infected with HSV1-rc/ Δ UL2, which had the function of packaging rAAV. After purification, the target vector and virus were collected.

RESULTS: The target vector, rAAV-GCRG213-siRNA, was successfully constructed, and the rAAV with a titer of 5×10^{12} vg/L (vg: vector genome) was obtained.

CONCLUSION: Recombinant rAAV vector may be used for further investigation of GCRG213 function *in vivo* and gene therapy.

Key Words: Gastric cancer; GCRG213 gene; Adeno-associated virus; Short interference RNA; Gene transfection

Xu SP, Wu BY, Wang MW, Gao LL, Wu YQ, Jiang LX, Wang WH, You WD. Construction of recombinant adeno-associated virus vector expressing GCRG213 short interference RNA and preparation of high-titer virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1417-1420

摘要

目的: 构建一个表达胃癌相关基因GCRG213小干扰RNA的重组腺相关病毒载体, 制备能靶向性抑制GCRG213表达的重组腺相关病毒。

方法: 将构建好并经验证的包含胃癌相关基因GCRG213特异性小干扰RNA片段GCRG213-RNAi-2的IMG800-GCRG213i-2质粒用*Bam*H I +*Bgl* II 双酶切, 回收410 bp左右目的片段, 将pSNAV2.0质粒用*Bam*H I 单酶切后同目的片段连接, 经酶切和测序鉴定后, 用新建质粒脂质体转染BHK-21细胞, G418筛选后大规模培养, 再用辅助病毒HSV1-rc/ Δ UL2感染, 获取病毒。

结果: 成功构建包含U6启动子和胃癌相关基因GCRG213特异性RNA干扰片段的重组腺相关病毒载体, 并制备出滴度为 5×10^{12} vector genome/L高滴度腺相关病毒。

■背景资料

在我国胃癌仍是威胁人们健康的重要疾病, 探索发病机制、寻找更有效的治疗手段仍是我们努力的方向。胃癌相关基因GCRG213是本文作者所在实验室筛选出的一条在肠型胃癌、癌旁和正常组织间差异表达的新基因, 生物信息学分析发现, GCRG213与日本学者Tashiro *et al*发现的人类基因AK131313有90%以上的核苷酸序列相同, 与人体内无嘌呤无嘧啶核酸内切酶(APE/Ref-1)序列有61%同源性并且含有其保守的功能位点, 初步研究也证实GCRG213是一种胃癌促进因子。为了进一步研究其功能, 本课题组包装了含GCRG213正、反义克隆和特异性RNAi片段的腺相关病毒, 同时也为胃癌基因治疗奠定基础。

■同行评价

本文在筛选出胃癌相关基因GCRG213的基础上,旨在构建一个表达胃癌相关基因GCRG213小干扰RNA的重组腺相关病毒载体,制备能靶向性抑制GCRG213表达的重组腺相关病毒,为后续工作奠定研究基础。文章具有一定的科学性、创新性,有较好的理论和应用价值。

结论: 载体的构建为进一步研究GCRG213的体内功能打下了基础,也将为更多的基因干预和基因的功能研究提供有效的工具。

关键词: 胃癌; GCRG213基因; 腺相关病毒; siRNA; 基因转染

徐世平, 吴本严, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 蒋立新, 王卫华, 尤纬缔. 表达胃癌相关基因GCRG213小干扰RNA腺相关病毒载体的构建和高滴度病毒制备. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1417-1420

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1417.asp>

0 引言

胃癌相关基因GCRG213是我们实验室筛选出的一条在肠型胃癌组织和癌旁组织高表达而在正常组织低表达的新基因^[1]。初步研究表明(待发表资料), 用其特异性小干扰RNA片段转染人胃癌细胞系MKN45细胞后, 能明显抑制GCRG213 mRNA和蛋白表达, 同时减弱细胞的生长速度和成瘤性。为了进一步研究GCRG213的体内功能和对其他相关基因的影响, 同时也为胃癌的基因治疗提供实验基础和理论依据, 我们设计构建了含GCRG213特异性RNAi片段腺相关病毒(AAV)载体, 并制备了高滴度腺相关病毒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 感受态大肠杆菌DH-5 α 购自北京天根科技公司; IMG800-GCRG213i-2质粒为本实验室构建并保存, 是将我们设计的GCRG213特异性RNAi片段插入IMG-800载体而成。DMEM培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清购自北京鼎国生物工程公司; 通用型AAV载体pSNAV2.0质粒、金黄地鼠肾BHK-21细胞、具有AAV复制和包装功能的重组I型单纯疱疹病毒HSV1-rc/ Δ UL2均由北京本原正阳基因有限公司提供。

1.1.2 工具酶及其他试剂 限制性内切酶(*Bam*H I, *Bgl* II)、T4 DNA Ligase、Marker-DL15000、Marker-DL2000均为TaKaRa公司产品, 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、高纯度质粒小量提取试剂盒购自北京天根科技公司。

1.2 方法

1.2.1 目的片段和酶切位点的选择 根据我们既往的实验结果, 选用本实验室验证的干扰效率相对较高的GCRG213-RNAi-2片段作为包装对

象, 片段核苷酸序列为: P1 5'TCGACGCACTCCTCACCAAATGTAGAGTACTGTACATTGTTGAGGAGTGCTTTTTT3', P2 5'CTAGAAAAAGCACTCCTCACCAAATGTACAGTACTCTACATTTGGTGAGGAGTGC3', 由上海博亚生物工程公司合成。用pSNAV2.0质粒作为载体, 但由于pSNAV2.0质粒不含U6启动子, 因此拟将构建好的IMG800-GCRG213i-2质粒中GCRG213-RNAi-2片段连同U6启动子一同切下, 插入pSNAV2.0质粒中。IMG800-GCRG213i-2质粒经分析得知U6及shRNA完整结构位于8-386位置, 在其上游4的位置具有一个*Bam*H I位点, 在其下游413的位置具有一个*Bgl* II位点, 这两种限制酶是同尾酶。pSNAV2.0质粒经分析得知其多克隆位点中具有一个*Bgl* II位点, 在多克隆位点上游927的位置具有一个*Bam*H I位点。因此, 可分别将IMG800-GCRG213i-2质粒经*Bam*H I + *Bgl* II双酶切、pSNAV2.0质粒经*Bam*H I单酶切, 回收目的片段后进行连接。两种质粒酶切位点见图1。

1.2.2 IMG800-GCRG213i-2质粒的扩增和酶切 取保存的含IMG800-GCRG213i-2质粒的菌液20 μ L接种入5 mL LB培养基, 37 $^{\circ}$ C振荡培养18 h, 取3 mL菌液按质粒小提试剂盒说明方法提取质粒, 提取质粒后用*Bam*H I + *Bgl* II进行双酶切, 回收410 bp左右片段。

1.2.3 pSNAV2.0质粒酶切 按前述方法将pSNAV2.0质粒扩增提取后用*Bam*H I单酶切, 回收7.1 kb左右片段。

1.2.4 目的片段和载体连接 将上述两种回收片段按目的片段和载体3:1的浓度比例混合后, 加入T4 DNA连接酶, 16 $^{\circ}$ C水浴连接过夜。连接产物转化DH-5 α , 涂布具有氨苄青霉素(100 mg/L)的LB琼脂平板, 于37 $^{\circ}$ C培养过夜。次日挑取单克隆培养, 提取质粒DNA后行进一步鉴定。

1.2.5 重组质粒的鉴定 利用*Bam*H I + *Bgl* II双酶切对提取的质粒进行筛选和方向鉴定, 如pSNAV2.0质粒中未连入目的片段或者连入目的片段但方向相反, 均应得到240 bp左右片段, 如pSNAV2.0质粒中连入目的片段且方向正确, 则应得到650 bp左右片段; 重组正确质粒使用pSNAV2.0-CMV-f测序引物测序鉴定, 测序结果与标准序列用BLAST分析比对。重组质粒命名为pSNAV2.0-U6-shRNA。

1.2.6 病毒的制备 按LipofecLamineTM 2000产品说明提供的方法, 用脂质体将pSNAV2.0-U6-

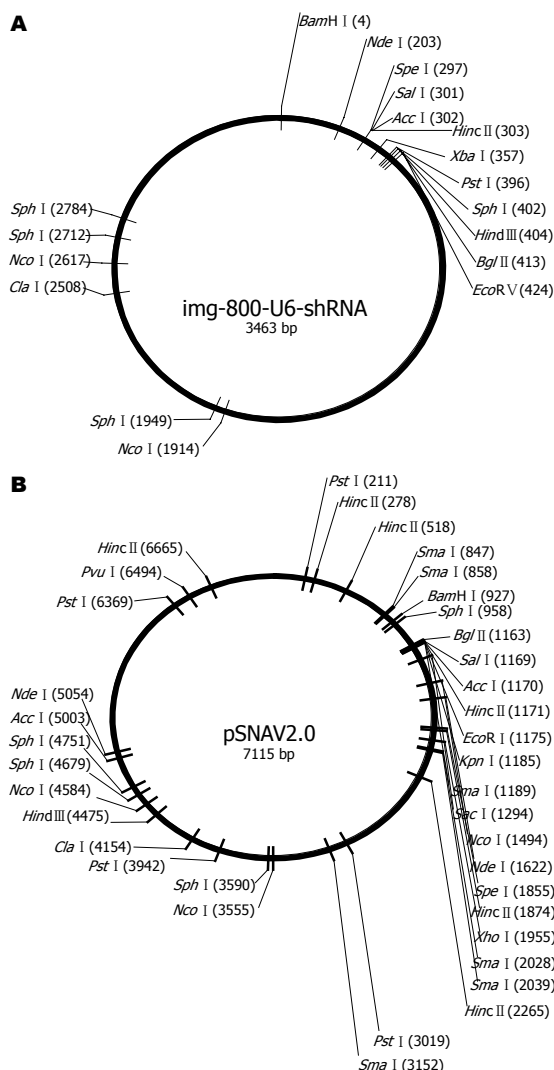


图1 两种质粒的酶切位点图谱. A: IMG800-GCRG213i-2质粒酶切位点; B: pSNAV2.0质粒酶切位点.

shRNA转染金黄地鼠肾BHK-21细胞, 转染24 h后加入G418至终浓度800 $\mu\text{g/L}$ 选择培养, 培养直至细胞长满后用0.25 g/L的胰蛋白酶消化传代, 用转瓶大规模培养, 细胞长满后, 用辅助病毒HSV1-rc/ Δ UL2感染, 待细胞完全病变, 裂解细胞, 得到粗制品. 用柱层析法分离纯化病毒, 纯度测定采用SDS-PAGE方法, 滴度测定采用real-time PCR方法进行测定.

2 结果

2.1 IMG800-GCRG213i-2质粒酶切结果 IMG800-GCRG213i-2质粒经BamHI + BglII双酶切酶切后, 得到预期的3 kb左右和410 bp左右两条带, 实验结果与预期相符(图2).

2.2 pSNAV2.0质粒酶切结果 pSNAV2.0质粒用BamHI酶切后, 得到7.1 kb左右片段, 回收该片段.

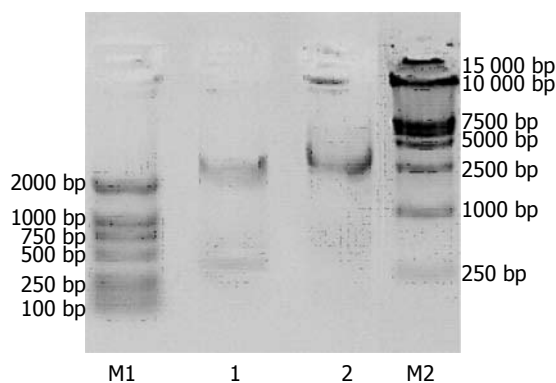


图2 IMG800-GCRG213i-2质粒酶切电泳图. M1: DL2000; M2: DL15000; 1: BamHI + BglII双酶切IMG800-GCRG213i-2质粒; 2: IMG800-GCRG213i-2质粒.

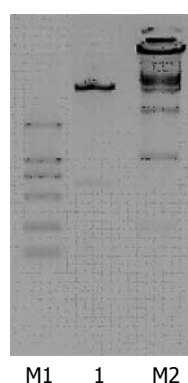


图3 pSNAV2.0-U6-shRNA质粒酶切电泳图. M1: DL2000; M2: DL15000; 1: BamHI + BglII双酶切pSNAV2.0-U6-shRNA质粒.

2.3 目的片段与载体的连接及病毒制备 目的片段插入载体后形成新的质粒pSNAV2.0-U6-shRNA, 该质粒经BamHI + BglII双酶切后得到预期6.9 kb左右和650 bp左右两条带. 实验结果与预期相符(图3). 使用pSNAV2.0-CMV-f测序引物, 对pSNAV2.0-U6-shRNA质粒测序后, 将测序所得结果与原序列BLAST比对, 序列100%吻合, 表明质粒构建正确. pSNAV2.0-U6-shRNA转染BHK-21细胞后, 经G418筛选约10 d至细胞长满, 用辅助病毒HSV1-rc/ Δ UL2感染细胞后48 h细胞完全病变, 反复冻融细胞3次, 使之裂解, 释放出病毒, 新病毒命名为rAAV-U6-shRNA, 分离纯化后测定病毒滴度为 5×10^{15} v.g./L(v.g.为病毒基因组数量vector genome).

3 讨论

我们既往的研究表明: 转染GCRG213正向克隆的MKN45细胞在裸鼠体内成瘤性增加, 而转染GCRG213反向克隆的MKN45细胞及转染siRNA的MKN45细胞在裸鼠体内成瘤性降低, 由此可以推断GCRG213可能是一种新发现的恶性肿瘤形成促进因子^[2-3]. 由于既往的实验主要是体外

实验, 为了进一步研究GCRG213在体内表达水平的变化对肿瘤的影响, 我们选用腺相关病毒载体进行了GCRG213特异性RNAi片段包装。

随着生物技术的发展, AAV载体成为目前载体工具研究的热点。在用于人类基因治疗常用病毒载体中, AAV载体是目前唯一没有引起人类宿任何病理反应的载体^[4]。作为体内实验一种理想的基因治疗的病毒载体, AAV具有如下优点: (1)使用安全: AAV不致病, 对机体无明显的免疫反应^[5]; (2)AAV可以定点整合到第19号染色体上^[6], 既避免了随机插入宿主基因诱发癌变的危险性, 又为外源基因的表达提供了较固定的染色体环境, 是唯一一种以位点特异性方式整合在人19号染色体上的真核病毒^[7]; (3)AAV可以感染分裂和非分裂细胞^[8]; (4)AAV宿主范围广, 可以感染现已建立的所有的人类细胞系; (5)携带的外源基因可长期存在, 稳定表达^[9]。因此, AAV有望成为人体基因治疗和基因功能研究最理想的载体工具。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由与靶序列同源的双链RNA所诱导的特异性的转录后基因沉默现象, 它具有高效性、特异性的特点。随着RNAi现象的研究深入, RNAi已成为基因治疗和基因功能研究领域新的热点。典型的转染外源合成的siRNA在转染7 d以后或者10次细胞分裂后会从mRNA抑制中恢复^[10]。然而用shRNA载体转染的细胞将经历长期稳定的mRNA抑制作用。从而提供了比转染化学合成的siRNA更经济有效的方法。如果能用病毒包装含目的基因特异性的shRNA进行体内感染并有效表达, 无疑是基因治疗的一种理想的方法。由于RNAi的高效表达需要有特异性的U6启动子^[11-12], 而一般病毒为CMV启动子, 因此到近两年仅有不多的以腺相关病毒为载体介导RNAi文献报道。我们根据IMG-800质粒含有U6启动子特点, 利用已构建好的质粒把目的基因连同U6启动子一起切下, 插入腺相关病毒载体, 成功构建了含GCRG213特异RNA干扰片段的腺相关病

毒载体, 并包装出了高滴度AAV, 为进一步研究GCRG213的体内功能打下了基础。构建好的载体也将为更多的基因干预和基因的功能研究提供有效的工具。

4 参考文献

- 1 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Liu XB, You WD, Yang XY. A gene encoding an apurinic/aprimidinic endonuclease-like protein is up-regulated in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1196-1201
- 2 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213正义真核表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1453-1457
- 3 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 王珊, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213真核表达载体的构建及其对胃癌细胞生长特性的影响. *解放军医学杂志* 2006; 31: 881-884
- 4 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-810
- 5 Rabinowitz JE, Samulski RJ. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 2000; 278: 301-308
- 6 Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991; 10: 3941-3950
- 7 Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 1995; 17: 237-245
- 8 Xu R, Sun X, Tse LY, Li H, Chan PC, Xu S, Xiao W, Kung HF, Krissansen GW, Fan ST. Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice. *Hepatology* 2003; 37: 1451-1460
- 9 Wang H, Shayakhmetov DM, Leege T, Harkey M, Li Q, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified helper-dependent adenovirus vector containing the beta-globin locus control region displays a nonrandom integration pattern and allows stable, erythroid-specific gene expression. *J Virol* 2005; 79: 10999-11013
- 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 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 12 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052

电编 何基才 编辑 王晓瑜

应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA

刘蓉, 李明远, 张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 陈清英, 卢军, 夏军

刘蓉, 李明远, 四川大学华西基础医学与法医学院微生物学教研室 四川省成都市 610041

张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 四川大学华西分子遗传实验室 四川省成都市 610041

陈清英, 卢军, 夏军, 重庆市涪陵区生殖健康保健中心 重庆市 40800

国家自然科学基金资助课题, No. 39880025

通讯作者: 夏庆杰, 610041, 四川省成都市高新区科园四路1号, 四川大学华西医院分子遗传实验室. xiaqj2005@126.com

电话: 028-81812855 传真: 028-85164005

收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-08

Detection of hepatitis B virus DNA by competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction

Rong Liu, Ming-Yuan Li, Fa-Qiang Zhang, Zeng-Liang Xia, Nai-Hong Yan, Ling Wang, Yi-Lu Lu, Qing-Jie Xia, Qing-Ying Chen, Jun Lu, Jun Xia

Rong Liu, Ming-Yuan Li, Department of Microbiology, West China College of Basic Medical Science and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Fa-Qiang Zhang, Zeng-Liang Xia, Nai-Hong Yan, Ling Wang, Yi-Lu Lu, Qing-Jie Xia, Laboratory of Molecular Genetics, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Qing-Ying Chen, Jun Lu, Jun Xia, Reproductive Health Care Center of Fuling District, Chongqing 40800, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39880025

Correspondence to: Qing-Jie Xia, Laboratory of Molecular Genetics, West China Hospital of Sichuan University, 1 Keyuan Fourth Road, High-Tech Development Zone, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. xiaqj2005@126.com

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To set up a competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction (CFQ-PCR) for decreasing the false negative ratio in HBV DNA detection.

METHODS: According to HBV adr subtype gene, a pair of HBV-specific primer as well as a specific TaqMan probe was synthesized. Based on the above primer sequences, a constructed inner control DNA and an inner TaqMan probe was constructed. Right amount of inner control DNA was added into the HBV FQ-PCR system

for co-amplification with the target HBV DNAs.

RESULTS: In a 30-μL CFQ-PCR system, about 20 copies of inner control DNA produced a stable amplification curve. Electrophoresis showed co-amplification products bands as about 100 to 500 copies of inner control DNA were used. In 8 of 210 (4.3%) cases with HBsAg positive in serum, both the inner control DNA and HBV DNA were not amplified, while in 2 of 60 (3.3%) samples with HBsAg negative in serum, the inner control DNA was not amplified. But after purification, all the above cases that failed in amplification succeeded in the inner DNA amplification, of which 7 HBsAg-positive cases succeeded in HBV DNA amplification.

CONCLUSION: CFQ-PCR has a big advantage in telling out the false negative result in the HBV DNA PCR assay.

Key Words: Hepatitis B virus; Competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction; False negative

Liu R, Li MY, Zhang FQ, Xia ZL, Yan NH, Wang L, Lu YL, Xia QJ, Chen QY, Lu J, Xia J. Detection of hepatitis B virus DNA by competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1421-1424

摘要

目的: 建立竞争性荧光定量聚合酶链反应(CFQ-PCR), 并探讨CFQ-PCR在乙型肝炎病毒(HBV)临床检测中的意义。

方法: 根据HBV病毒adr亚型基因组序列合成一对HBV特异的引物, 和一条特异的TaqMan探针; 根据上述引物序列, 采用分子克隆技术制备内对照DNA; 再根据内对照序列合成一条内对照DNA特异的与上述TaqMan探针不同标记的TaqMan探针; 将适量的内对照DNA加入到PCR反应体系中, 使其与HBV靶序列共扩增。

结果: 在30 μL CFQ-PCR反应体系中, 加入约20拷贝内对照DNA能够稳定地获得共扩增曲线; 经琼脂糖凝胶电泳分析, 加入约100-500拷

■背景资料

建立一种能够精确定量分析, 同时又解决好假阳性问题和假阴性问题, 提高检测的准确性和精确度是当前HBV临床基因检测研究的热点和重点。实时荧光定量PCR能克服常规PCR不能定量的缺点, 也使PCR检测的假阳性问题基本解决, 而竞争PCR使假阴性问题也得到部分解决。

■创新盘点

建立了乙型肝炎病毒DNA检测的竞争性荧光定量聚合酶链反应,既能够精确定量分析乙型肝炎病毒DNA拷贝数,同时又解决好假阳性和假阴性问题,并在实际临床检测中发挥了预期的效果是本研究的特色。

贝内对照DNA能够有效地获得共扩增产物条带信号;在210个临床HBsAg阳性血清标本的CFQ-PCR扩增中识别出8个未能有效扩增的标本,60份HBsAg阴性血清标本中识别出2个内对照未能有效扩增的标本,后经DNA纯化处理,上述全部标本的内对照均获得阳性扩增结果,其中有7个HBsAg阳性血清标本获得HBV DNA扩增阳性结果。

结论: CFQ-PCR能够有效地提示临床标本HBV DNA体外扩增时由于扩增失败导致的假阴性,适合临床推广应用。

关键词: 乙型肝炎病毒; 竞争性荧光定量聚合酶链反应; 假阴性

刘蓉, 李明远, 张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 陈清英, 卢军, 夏军. 应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1421-1424 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1421.asp>

0 引言

聚合酶链反应(PCR)技术已被广泛用于核酸分析,但普通PCR还存在下面一些缺点:(1)只能给出定性结果,无法给出临床需要的定量结果;(2)由于采用电泳检测PCR扩增产物,易引起PCR产物的交叉污染,增加了假阳性结果的可能性,同时增加了操作的工作程序和时间;(3)采用的染色剂溴乙锭是致癌物,可能危害操作人员及污染环境。而实时荧光定量PCR方法(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR),由于采用荧光技术和闭管检测,以及能够精确定量待测靶序列的起始拷贝数,克服了前述常规PCR方法的主要缺点,并且随着基因扩增实验室及实验操作的规范化以及检测试剂质量的不断提高,使PCR检测的假阳性问题、定量问题及时效性问题已经基本解决,从而使由于病毒变异、标本质量不一或试剂的使用不当造成的假阴性问题成为提高临床HBV DNA检测准确性所要解决的最重要问题^[1-3]。为此,我们建立了竞争性荧光定量聚合酶链反应(competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction, CFQ-PCR),并初步验证了其在临床检测HBV血清时指示扩增时产生的假阴性的有效性。

1 材料和方法

1.1 材料 210份HBsAg阳性临床血清和60份HBsAg阴性血清。所用辛酸钠为国产分析纯,PCR试剂购自大连宝生物公司,荧光定量PCR仪

表 1 各种稀释度的内对照DNA的PCR扩增的Ct值

Ct值	内参照DNA拷贝数						阴性对照
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	20	5	
1	24.5	28.0	31.0	35.0	37.0	39.5	-
2	24.0	28.0	31.5	35.0	36.5	39.0	-
3	24.0	27.5	31.5	35.5	37.5	-	-
4	24.0	28.0	31.0	35.5	37.0	40.0	-
5	24.5	28.0	31.5	35.0	37.0	38.5	-
6	24.5	27.5	32.0	35.0	37.5	39.0	-
平均数	24.2	27.8	31.4	35.2	37.1	39.2	

为上海枫岭生物科技有限公司FTC2000型。

1.2 方法 (1)样本处理. 辛酸钠法: 90 mmol/L辛酸钠水溶液50 μ L, 加入血清50 μ L, 充分混匀, 99 $^{\circ}$ C 15 min, 13 000 g离心15 min, 取上清用于扩增;(2)引物. 扩增靶DNA为前C与C区的保守区, 上游引物为P1: 5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGT-3', 下游引物P2: 5'-GTACAGACTTGGCCCCAATAC-3', 产物322 bp, TaqMan探针PR: 5'-FAM-GTTCGTAGGGCTTTCCCCAC-TAMRA-3'; 内对照TaqMan探针: 5'-TEX-CTCCTACCGAGCCTCACGAC-TAMRA-3', 由上海生工生物工程公司合成;(3)制备内对照DNA. 人工合成两条5'端分别与P1、P2相同, 3'端互补的寡核苷酸, 其序列分别为PI1: 5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGTATTGGACTCCTACCGAGCCTCACGAC-3'; PI2: 5'-GAAAGCCCTACGAACCACTGAA ATGTCGTGAGGCTCGGTAGGA-3', 于50 μ L PCR反应液中[终浓度为250 μ mol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 g/L明胶, 两引物各0.3 μ mol/L, 1 U Taq酶(PROMEGA公司)]通过PCR(在PE9600上94 $^{\circ}$ C变性2 min后, 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 60 s、72 $^{\circ}$ C 60 s循环5次, 72 $^{\circ}$ C 5 min)聚合成二聚体, 产物序列为5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGTATTGGACTCCTACCGAGCCTCACGACATTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTC-3', 长度75 bp. 溴乙锭30 g/L琼脂糖凝胶电泳观察结果并与相对分子质量标准对照回收75 bp条带, 克隆, 大量制备, 紫外分光光度计测定其DNA浓度, 将DNA含量换算成拷贝/ μ L, 并用TE缓冲液进行稀释成5 \times 10⁴拷贝/ μ L, 5 \times 10³拷贝/ μ L, 5 \times 10²拷贝/ μ L, 50拷贝/ μ L, 10拷贝/ μ L, 2.5拷贝/ μ L等6个浓度梯度;(4)内对照DNA的PCR扩增及扩增体系灵敏度测

表 2 CFQ-PCR对HBV DNA的检测结果与ELISA检测结果的比较

标本	n	内对照阳性数(%)	HBV阳性数(%)	CFQ-PCR检测内对照和HBV同时阴性		
				n(%)	DNA重提后CFQ-PCR结果	
					HBV阳性数(%)	内对照阳性数(%)
HBsAg阳性	210	199 (94.8)	202 (96.2)	8 (3.8)	7 (87.5)	8 (100)
HBsAg阴性对照	60	58 (96.7)	0 (0)	2 (3.3)	0 (0)	2 (100)
合计	270	257 (95.2)	202 (74.8)	10 (3.7)	7 (87.5)	10 (100)

■应用要点

所报道的CFQ-PCR, 能够为乙肝诊断与治疗效果评价和用药指导的临床工作提供更精确可靠的检测结果, 具有较好的推广应用前景。

试. 分别取上述各个稀释度的内对照DNA 2 μ L, 加入28 μ L PCR反应液, 各成分的终浓度分别为250 μ mol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 g/L明胶, P1、P2各0.3 μ mol/L, 1 U Taq酶(PROMEGA公司). 在FTC2000上94℃变性2 min后, 94℃ 20 s、58℃ 30 s、60℃ 60 s, 于60℃时收集荧光, 循环40次, 72℃ 5 min. 观察分析扩增曲线, 读出每一扩增的Ct值。

HBV及内对照的扩增方法: 2 μ L样本裂解上清液, 2 μ L内对照(5 \times 10拷贝/ μ L), 加入16 μ L PCR反应液, 各成分的终浓度为: 内对照5拷贝/ μ L, 其余成分同1.5, 于FTC2000(上海枫岭公司)上94℃变性2 min后, 94℃ 20 s、58℃ 30 s、60℃ 60 s循环45次, 最后72℃ 5 min. 溴乙锭琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果

2.1 在PCR反应体系内只加入不同量的内对照而不加HBV DNA时, 6次重复实验结果显示能够获得稳定的阳性扩增结果的最小内对照拷贝数约为20拷贝(表1)。

2.2 在HBV-PCR扩增体系中加入内对照能够获得共扩增结果, 加入100拷贝内对照对HBV特异性扩增强度无显著影响。

2.3 在60例临床HBsAg阴性血清的CFQ-PCR检测中, 有58例获得了内对照扩增阳性结果, 而HBV全部为阴性; 在210例临床HBsAg阳性血清的CFQ-PCR检测中, 有199例内对照扩增阳性, 202例HBV扩增阳性; 其中有3例HBV扩增阳性而内对照扩增阴性, 且他们HBV扩增的Ct值均小于16; 共有8例内对照和HBV扩增同时阴性。经过对这10例内对照和HBV扩增同时阴性的标本(HBsAg阴性血清2例, HBsAg阳性血清8例)重新提取纯化血清中DNA, 和重新进行CFQ-PCR检测, 则有7例获得HBV扩增阳性, 同时内对照全部为阳性。

3 讨论

PCR技术在正常情况下具有极高的灵敏度. 在其应用于临床标本的基因检测的初期, 由于实验室不规范和操作人员技术缺陷等条件的限制, 很容易出现因PCR产物的污染或标本的交叉污染导致的假阳性, 因而人们对PCR检测的假阳性问题非常重视, 并通过建立标准PCR实验室使空气单向流动和操作人员规范的技术培训等进行了有效的控制. FQ-PCR方法的出现更是由于采用完全闭管检测, 不需PCR后处理, 极大的避免了交叉污染和假阳性, 并能够获得精确的定量结果, 对临床诊断和治疗具有了更大的意义. 然而PCR结果假阴性的问题一直未引起人们足够的重视. 部分被检测的临床标本由于含有Taq DNA聚合酶抑制剂或PCR试剂在存放和运输过程活性降低以及DNA扩增仪故障和扩增程序有误等, 都可引起假阴性结果, 但常规PCR和FQ-PCR无法对每一扩增管逐一指示上述环节是否正确. 因为PCR一般是用来做排除性检验, 即若获得PCR结果阴性即认为标本中不含有该种病原体的DNA, 因此, 一旦出现假阴性结果往往导致较严重后果. 最近我们建立了竞争PCR(C-PCR)^[4], 能够逐个检测并指示是否出现了可疑的假阴性结果, 但不能很好的定量靶DNA的拷贝数, 以及存在PCR产物后处理时造成污染的可能性, 因而也不能很好的满足临床检测的需要. 本研究建立的竞争性荧光定量聚合酶链反应结合了C-PCR和FQ-PCR的优点, 既解决了检测过程中产生的检测结果的假阴性指示问题, 又能够有效避免PCR产物污染造成的假阳性结果, 还能够定量待测靶DNA的拷贝数, 为临床工作提供更精确可靠的检测结果, 具有较好的推广应用前景。

4 参考文献

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity

■同行评价

本文应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA,方法先进,结果可靠,具有实用性。

- of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276-7280
- 2 黄呈辉. HBV DNA定量检测及临床应用的研究进展. 国外医学·流行病学·传染病学分册 1996; 23: 154-157
- 3 张复春, 吴婉芬, 董惠卿, 蔡晓莉, 魏绍静, 洗超. 定量

聚合酶链反应检测血清中HBV DNA及其临床应用. 中华传染病杂志 1997; 15: 24-27

4 王玲, 杨朋, 李双庆, 许淑惠, 曹桂群, 张发强, 张美霞, 陈清英, 夏庆杰, 刘凯, 唐方, 张远征. 应用竞争聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 858-859

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

黎沾良(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.

吉西他滨对人胰腺癌Patu-8988细胞株APE/Ref-1的诱导作用

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周 璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
上海市领先学科建设项目, No. Y0205
上海交通大学医学院博士点基金项目, No. BXJ0617
通讯作者: 吴叔明, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所.
wusm2002@hotmail.com
电话: 021-53882027
收稿日期: 2007-01-24 接受日期: 2007-02-08

Expression of APE/Ref-1 in human pancreatic cancer cell line Patu-8988 induced by gemcitabine

Guang-Su Xiong, Shu-Ming Wu, Xiao-Jing Xu, Jun Zhou, Hong-Yin Zhu, En-Ling Li, Jian-Zhong Mo

Guang-Su Xiong, Shu-Ming Wu, Xiao-Jing Xu, Jun Zhou, Hong-Yin Zhu, En-Ling Li, Jian-Zhong Mo, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 20001, China

Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0205, and the Foundation of the Authorization Spot for Doctor's Degree of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, No. BXJ0617

Correspondence to: Shu-Ming Wu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 145 Shandong Middle Road, Shanghai 20001, China. wusm2002@hotmail.com

Received: 2007-01-24 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the changes of APE/Ref-1 expression in human pancreatic cancer cells after induction of gemcitabine.

METHODS: Human pancreatic cancer cell line Patu-8988 was incubated with 0, 10, 20, 40 and 60 $\mu\text{mol/L}$ gemcitabine for 24 hours. The mRNA and protein levels of APE/Ref-1 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Twenty-four hours after treatment with gemcitabine, the expression of APE/Ref-1 were elevated significantly both at mRNA and

protein level, and was positively correlated with the concentrations of gemcitabine (RT-PCR: $r = 0.645$, $P = 0.012$; Western blot: $r = 0.598$, $P = 0.020$).

CONCLUSION: Up-regulated APE/Ref-1 expression may be an adaptive response contributing to the overall chemoresistance in pancreatic carcinomas, which implies the potential therapeutic effect targeting on APE/Ref-1.

Key Words: Pancreatic neoplasm; APE/Ref-1; Gemcitabine; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Xiong GS, Wu SM, Xu XJ, Zhou J, Zhu HY, Li EL, Mo JZ. Expression of APE/Ref-1 in human pancreatic cancer cell line Patu-8988 induced by gemcitabine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1425-1428

摘要

目的: 研究人胰腺癌细胞株在吉西他滨化疗时APE/Ref-1基因表达的变化, 并试图揭示其在胰腺癌化疗耐药中所起的作用。

方法: 不同浓度吉西他滨0、10、20、40及60 $\mu\text{mol/L}$ 作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h, 分别以RT-PCR及Western blot方法测定作用后APE/Ref-1的mRNA及蛋白表达情况。

结果: 吉西他滨作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h后, APE/Ref-1的mRNA及蛋白表达水平明显上升, 并与吉西他滨的浓度呈正相关 (RT-PCR: $r = 0.645$, $P = 0.012$; Western blot: $r = 0.598$, $P = 0.020$)。

结论: APE/Ref-1在胰腺癌化疗时表达明显增强, 可能与化疗耐药性的产生有关, 并提示针对APE/Ref-1的靶向干预可能有助于提高胰腺癌的化疗敏感性。

关键词: 胰腺肿瘤; 无嘌呤嘧啶核酸内切酶; 吉西他滨; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠. 吉西他

■背景资料

胰腺癌是一种常见而又恶性程度很高的消化系统肿瘤, 近年来其发病率在国内外都呈上升趋势, 国内上海地区的发病率最高。目前, 唯一显示有一定疗效的药物是吉西他滨, 但效果也不理想。无嘌呤嘧啶核酸内切酶(APE)是DNA修复酶家族中的一员, 同时还有氧化还原功能, 也通常被称为氧化还原因子-1(Ref-1)。文献报道多种肿瘤中APE/Ref-1的表达升高, 并有可能参与了肿瘤对放、化疗抵抗的产生。

■研发前沿

胰腺癌化疗的耐药性是胰腺癌预后不佳的重要原因。由于其基因治疗也取得了很大的发展, 故联合基因治疗和化疗将是胰腺癌治疗的一个重要方向。

■创新盘点

本研究发现,胰腺癌细胞在以吉西他滨作用时,APE/Ref-1的表达反应性升高,结合国外相关文献,提出APE/Ref-1可能参与了胰腺癌对吉西他滨化疗耐药性的产生,国内尚未见相关报道。

滨对人胰腺癌Patu-8988细胞株APE/Ref-1的诱导作用. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1425-1428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1425.asp>

0 引言

胰腺癌是一种常见而又恶性程度很高的消化系统肿瘤,近年来其发病率在国内外都呈上升趋势,国内上海地区的发病率最高^[1-2]。目前,唯一显示有一定疗效的药物是吉西他滨,但效果也不理想。无嘌呤嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, APE)是DNA修复酶家族中的一员,APE同时还有氧化还原功能,也通常被称为氧化还原因子-1(redox effector factor-1, Ref-1)^[3]。文献报道多种肿瘤中APE/Ref-1的表达升高,并有可能参与了肿瘤对放、化疗抵抗的产生。本研究通过吉西他滨干预胰腺癌细胞株,观察APE/Ref-1表达情况,旨在探讨其在胰腺癌对化疗耐药中起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株Patu-8988由上海交通大学医学院附属瑞金医院内科实验室惠赠。吉西他滨(泽菲)购自江苏豪森药业公司。DMEM培养基干粉购自Gibco公司。多克隆兔抗人APE抗体购自美国Novus公司。多克隆兔抗人 β -actin抗体购自上海康成公司。M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司。

1.2 方法 人胰腺癌细胞株在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液、37℃ 50 mL/L CO₂孵箱中培养。分别以不同浓度吉西他滨(0, 10, 20, 40, 60 μ mol/L)作用Patu-8988细胞株24 h。收集细胞。

1.2.1 RT-PCR半定量测定APE/Ref-1 mRNA表达情况 总RNA抽提采用TRIzol按照说明书操作步骤进行。取10 μ g逆转录合成cDNA。PCR扩增引物由上海基康生物技术公司合成, APE/Ref-1上游引物: 5'-ACTTCAGGAGCTGCCTGGACT-3', 下游引物: 5'-AATGCAGGTAACAGAGAGTGGGA-3', 扩增长度564 bp, 退火温度56℃, 35个循环。内参照 β -actin: 上游引物: 5'-CACCCACACTGTGCCCATC-3', 下游引物: 5'-CCACAGGACTCCATGCCC-3', 扩增长度342 bp, 退火温度55℃, 28个循环。5 μ L PCR产物15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 通过SmartView凝胶成像扫描仪观察。

1.2.2 Western blotting检测蛋白表达 以细胞裂解液冰浴裂解收集的细胞, BCA法测定蛋白浓度。取50 μ g蛋白进行不连续SDS-PAGE电泳, 泳毕电转移至硝酸纤维素膜。50 g/L BSA溶液室温孵

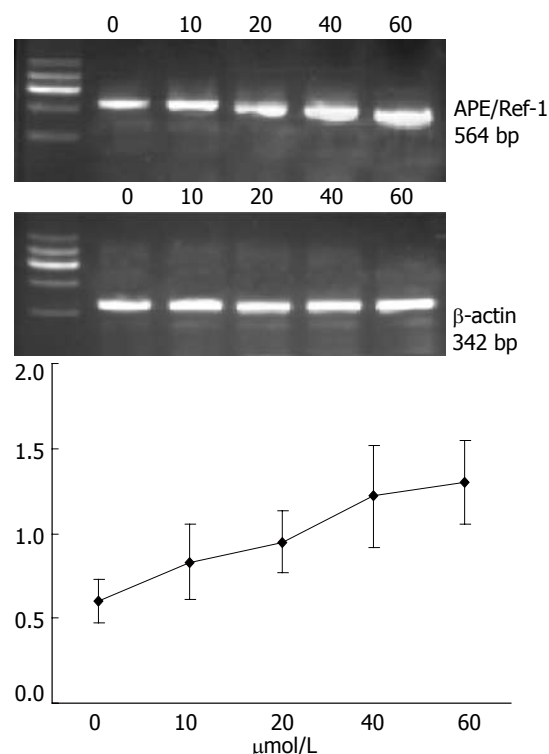


图1 APE/Ref-1 RT-PCR结果。

育1 h封闭非特异性结合, 加入多克隆兔抗人抗体室温孵育1.5 h后, 加入HRP标记的二级抗体以结合一级抗体及HRP标记的抗生物素抗体以结合分子量标准, 室温孵育膜1 h。KCTM显色发光, 暗室胶片曝光, 采用 β -actin作为内参照, 通过SmartView软件分析。

统计学处理 统计采用SAS6.12软件包。计量资料用mean \pm SD表示, 组间有无显著性差异用one-way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为有显著性。

2 结果

2.1 APE/Ref-1 mRNA表达情况 吉西他滨作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h后, APE/Ref-1的mRNA表达明显上升, 与浓度呈正相关($r = 0.645$, $P = 0.012$) (图1)。

2.2 APE/Ref-1蛋白表达情况 吉西他滨作用24 h后, APE/Ref-1蛋白表达明显上升, 与浓度呈正相关($r = 0.598$, $P = 0.020$) (图2)。

3 讨论

每个细胞每天在生理条件下大约可自发产生100多个无嘌呤嘧啶(apurinic/aprimidinic, AP)位点。但由于离子辐射、DNA损伤药物、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生等因素, 细胞实际每天可产生超过20 000个AP位点, 是

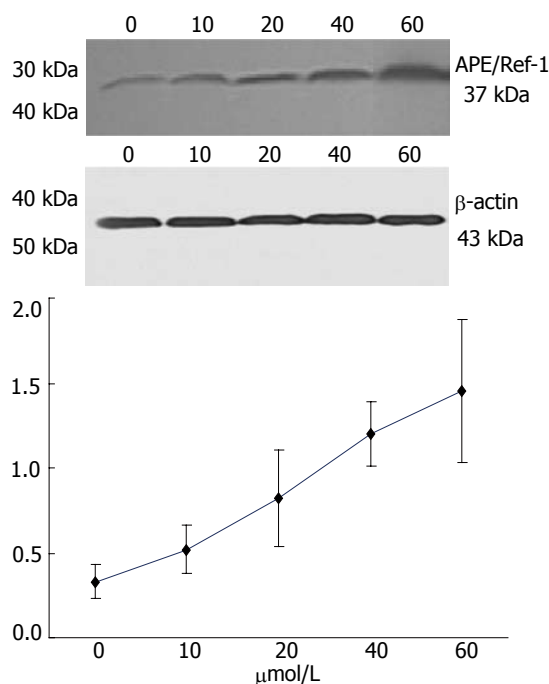


图2 APE/Ref-1 Western blot结果。

最常见的DNA损伤形式之一^[3-4]。持续存在的AP位点如得不到修复则会导致DNA复制停止、突变以及基因稳定性丢失。DNA的碱基切除修复(base excision repair, BER)途径通过切除和替换AP位点从而维持DNA完整性,是DNA修复系统中最重要的一种修复途径。APE是DNA修复酶家族中的一员,主要通过BER方式修复AP位点。一旦确定DNA的一处碱基损伤,则通过转葡萄糖苷酶切除该碱基,留下一处AP位点,然后APE通过Mg²⁺依赖的核酸内切酶作用,水解AP位点5'端,形成3'-OH和5'-脱氧核苷。脱氧核糖磷酸酶切除AP位点, DNA聚合酶β以及DNA连接酶I或DNA连接酶III/XRCCI替换核苷酸,并关闭新合成核苷酸和DNA股之间的裂隙。此外, APE还有氧化还原功能,他通过转录因子来激活多种肿瘤基因产物的活性,如c-Jun, c-Fos, c-Myb, NF-κB以及p53。已发现APE/Ref-1在多种肿瘤组织中表达升高,如: 宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、儿童横纹肌肉瘤、骨肉瘤、胚胎瘤、肝癌等^[5-9], 以及胰腺癌^[10]。研究表明,使哺乳动物细胞中的APE/Ref-1蛋白降低可增加细胞对甲磺酸甲酯、过氧化氢的敏感性^[11];在APE/Ref-1的降低时宫颈癌的抗辐射性也降低^[12]。暴露于离子辐射及氧应激时肿瘤细胞APE/Ref-1蛋白升高^[6,13-14],同时,睾丸癌中APE/Ref-1的升高也可导致博来霉素敏感性降低^[8]。胰腺导管腺癌是一种预后很差的恶性肿瘤,位居北

美第4大肿瘤死亡原因^[2]。1990年代上海市区全人群男女性胰腺癌5 a观察生存率仅为5.8%和4.3%, 5 a相对生存率为6.9%和5.1%^[1]。上海市区2000年男女胰腺癌标化发病率分别为7.7/10万和5.8/10万,分别居男女恶性肿瘤发病率的第9位和第7位^[15],已属较高水平。胰腺癌对化、放疗均不敏感,致使其死亡率几乎达100%^[16]。目前唯一显示有一定效果的药物为吉西他滨(2, 2-二氟脱氧胞嘧啶核苷),为脱氧胞苷酸2'位碳原子被氟原子所代替,通过抑制DNA连结而抑制肿瘤的复制,并通过掩盖肽链的末端阻断DNA修复;另外他还能增强自我抗细胞毒素的能力。他优于其他抗代谢药物(如阿糖胞苷)的主要特点在于其半衰期更长,从而加强了其抑制拓扑异构酶-I的活性等细胞毒性作用^[17-18]。

我们推测, APE/Ref-1可能在吉西他滨作用肿瘤细胞时,其表达会反应性增高,从而参与了胰腺癌对化疗耐药的产生。我们的研究证实以不同浓度的吉西他滨干预胰腺癌细胞株Patu-8988, APE/Ref-1的表达随着吉西他滨的浓度升高而升高,呈正相关,和国外有关研究结果相似^[19],表明APE/Ref-1可能在胰腺癌对化疗耐药产生中起着重要作用,并提示针对APE/Ref-1的靶向干预可能有助于提高胰腺癌的化疗敏感性。

4 参考文献

- 1 高玉堂. 胰腺癌流行病学研究进展. 实用肿瘤杂志 2003; 18: 347-349
- 2 Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
- 3 Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000; 461: 83-108
- 4 Kelley MR, Parsons SH. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 671-683
- 5 Xu Y, Moore DH, Broshears J, Liu L, Wilson TM, Kelley MR. The apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme is elevated in premalignant and malignant cervical cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 3713-3719
- 6 Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 824-830
- 7 Moore DH, Michael H, Tritt R, Parsons SH, Kelley MR. Alterations in the expression of the DNA repair/redox enzyme APE/ref-1 in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 602-609
- 8 Robertson KA, Bullock HA, Xu Y, Tritt R, Zimmerman E, Ulbright TM, Foster RS, Einhorn LH, Kelley MR. Altered expression of Ape1/ref-1

■应用要点

本研究为下一步通过基因敲除抑制其表达以提高胰腺癌化疗敏感性的研究提供了方向。

■同行评价

本文通过检测在不同浓度的吉西他滨作用下,人胰腺癌细胞株 APE/Ref-1 表达的变化,研究其在胰腺癌化疗耐药中的作用,具有实用意义。

- in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer Res* 2001; 61: 2220-2225
- 9 张沁宏, 肖华亮, 李增鹏, 仲召阳, 何怡, 卿毅, 王东. 肝细胞癌组织中DNA损伤修复基因APE1表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 508-511
- 10 高扬, 李兆申, 高军, 屠振兴, 龚燕芳, 王洋. 无嘌呤嘧啶核酸内切酶在胰腺癌组织的表达及其临床意义. *胰腺病学* 2006; 6: 74-77
- 11 Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4884-4889
- 12 Herring CJ, West CM, Wilks DP, Davidson SE, Hunter RD, Berry P, Forster G, MacKinnon J, Rafferty JA, Elder RH, Hendry JH, Margison GP. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *Br J Cancer* 1998; 78: 1128-1133
- 13 Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5061-5066
- 14 Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, Kolstoe DD. The apurinic/aprimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3008-3018
- 15 上海市肿瘤研究所流行病学研究室. 2000年上海市恶性肿瘤发病率. *肿瘤* 2003; 23: 532-532
- 16 Magee CJ, Greenhalf W, Howes N, Ghaneh P, Neoptolemos JP. Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical implications. *Surg Oncol* 2001; 10: 1-23
- 17 Moore MJ, Feld R, Hedley D, Oza A, Siu LL. A phase II study of temozolomide in advanced untreated pancreatic cancer. *Invest New Drugs* 1998; 16: 77-79
- 18 Pourquier P, Giffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y. Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2499-2504
- 19 Lau JP, Weatherdon KL, Skalski V, Hedley DW. Effects of gemcitabine on APE/ref-1 endonuclease activity in pancreatic cancer cells, and the therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *Br J Cancer* 2004; 91: 1166-1173

电编 郭海丽 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 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

抗幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白的单克隆抗体的制备和鉴定

龙敏, 李妍, 罗军, 李明

龙敏, 罗军, 南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物系 广东省广州市 510515
李妍, 李明, 南方医科大学生物技术学院 广东省广州市 510515
广东省自然科学基金资助项目, No. 5004750
通讯作者: 李明, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学生物技术学院. limin@fimmu.com
电话: 020-61648550
收稿日期: 2007-01-22 接受日期: 2007-03-06

Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* neutrophils activating protein

Min Long, Yan Li, Jun Luo, Min Li

Min Long, Jun Luo, Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Yan Li, Min Li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 5004750

Correspondence to: Min Li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. limin@fimmu.com

Received: 2007-01-22 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To screen and identify the monoclonal antibodies (mAbs) against *H pylori* neutrophils activating protein (NAP).

METHODS: *H pylori* DY01 and DY04 strains were clinically isolated. After BALB/c mice were immunized, the mAbs against *H pylori* were obtained by hybridoma technique. Then, the mAbs against *H pylori*-NAP were screened using recombinant *H pylori*-NAP. The obtained mAbs were evaluated for subtype and titer, and their specificities were identified by Western blot and immunohistochemical techniques.

RESULTS: Three strains of mAbs against *H pylori*-NAP were obtained. All of the mAbs against *H pylori*-NAP were identified as immu-

noglobulin G1 (IgG1) with κ light chain. The titer of mAbs in the culture supernatant was 1/16 to 1/32, and that in the ascites were 1/32000 to 1/64000. Western blotting showed that the mAbs had specific reaction with the recombinant *H pylori*-NAP. Clinical *H pylori* strains were stained brown with the mAbs against *H pylori*-NAP by immunohistochemical techniques.

CONCLUSION: Three strains of mAbs against *H pylori*-NAP are obtained, which are helpful in the diagnosis and prognosis of *H pylori* infection as well as vaccine research.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Neutrophils activating protein; Monoclonal antibody; Western blot; Immunohistochemistry

Long M, Li Y, Luo J, Li M. Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* neutrophils activating protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(12): 1429-1432

摘要

目的: 从抗幽门螺杆菌(*H pylori*)全菌蛋白的单克隆抗体(mAb)中, 应用重组中性粒细胞激活蛋白(NAP), 筛选出抗NAP单抗并进行鉴定。

方法: 临床分离*H pylori* DY01, DY04株. 免疫BALB/c小鼠后, 应用杂交瘤技术制备mAb. 再用ELISA方法以重组表达的NAP蛋白筛选相应的单抗, 对NAP单抗进行亚类鉴定和效价检测, 并用Western blot和免疫组化方法鉴定其特异性。

结果: 获得3株针对*H pylori*-NAP蛋白的特异性mAb, 抗体亚类为IgG1, 轻链为 κ 型. 单抗细胞培养液的抗体效价为1/16-1/32, 腹水的抗体效价是1/32000-1/64000. Western blot鉴定表明, 抗NAP mAb针对NAP蛋白产生特异性条带, 具有高度的特异性; 免疫组化分析显示: 3株NAP mAb能与*H pylori*临床菌株发生特异性结合反应, 菌体染成深棕色。

结论: 获得抗*H pylori*-NAP蛋白的特异性mAb,

■背景资料

幽门螺杆菌是慢性胃炎和消化性溃疡的重要致病因子, 并与胃腺癌和胃B细胞淋巴瘤的发生密切相关. *H pylori*在世界人口中的感染率高达50%, 发展中国家感染率更高. 怎样有效控制*H pylori*感染, 是国内外学者关注的一大难题. 目前广泛应用的抗生素疗法存在患者耐受性差、抗生素耐药性和感染复发率高等问题, 迫切需要寻找新的方法有效控制*H pylori*感染. 公认疫苗是有效预防甚至治疗*H pylori*感染的最佳途径, 但至今尚无成功的疫苗应用于临床。

■相关报道

近年来,一些学者对*H pylori*-NAP的免疫保护作用 and 机制进行了深入的研究。例如:Satin *et al*发现*H pylori*-NAP是保护性抗原;Vagdy *et al*研究发现,以*H pylori*-NAP和CagA作为抗原,采用肌注联合口服或滴鼻途径免疫小鼠,可明显增强局部黏膜免疫和全身免疫反应;Amedei *et al*报道,*H pylori*-NAP通过诱导中性粒细胞和单核细胞IL-12、IL-23的表达,促进Th1免疫反应。

为幽门螺杆菌感染的诊断、预后判断及表位疫苗的研究提供基础。

关键词: 幽门螺杆菌; 中性粒细胞激活蛋白; 单克隆抗体; Western blot; 免疫组化

龙敏, 李妍, 罗军, 李明. 抗幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白的单克隆抗体的制备和鉴定. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1429-1432

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1429.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染世界人口的50%,是慢性胃炎、消化性溃疡的主要致病因子,并与胃癌密切相关。幽门螺杆菌的定植,伴随着胃黏膜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的浸润,中性粒细胞浸润程度与黏膜损伤程度密切相关^[1-5]。

中性粒细胞激活蛋白(neutrophils activating protein, NAP)是幽门螺杆菌的重要毒力因子,他由napA基因编码,分子质量150 kDa,位于*H pylori*菌体内,通过自溶释放后,募集中性粒细胞,并与中性粒细胞和单核细胞的外膜相结合,促进中性粒细胞与胃上皮细胞的黏附,激活中性粒细胞造成黏膜的炎性反应^[2-4],并能激活粒细胞产生活性氧中间产物(reactive oxygen intermediates, ROI)及趋化因子^[6]。大部分*H pylori*感染患者产生NAP抗体,而且,用*H pylori*-NAP免疫小鼠能保护机体抵抗*H pylori*的感染,表明*H pylori*-NAP可作为*H pylori*疫苗的候选抗原^[7-9]。本研究以*H pylori*全菌作为抗原,应用杂交瘤技术制备抗*H pylori*mAb^[10];构建*H pylori*-NAP原核表达系统,体外重组表达NAP蛋白^[11],并用表达的NAP蛋白对抗体进行鉴定,获得3株针对*H pylori*-NAP的mAb。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*标准株NCTC11639由微生物系保存,*H pylori*临床分离株DY01, DY04由微生物系从患者胃黏膜活检标本中分离。其他肠道常见细菌如痢疾志贺菌、福氏志贺菌、宋氏志贺菌、变形杆菌和弯曲杆菌由微生物系保存。小鼠骨髓瘤细胞SP2/0由本校生物技术学院保存,弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG)1450, HAT, HT以及辣根过氧化物酶标记(HRP)的羊抗小鼠IgG、四甲基联苯胺(TBM)购自Sigma公司;鼠mAb亚类检测试剂盒购自HyCult公司, RPMI1640培养基为Gibaco-BRL产品,新生牛血清购于杭州

四季青生物工程有限公司,硝酸纤维素膜购自Milipore公司。6周龄♀BALB/c小鼠,购自广州中医药大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 重组*H pylori*-NAP蛋白 应用PCR技术从*H pylori*标准株NCTC11639 DNA染色体中扩增napA编码基因片段, T-A克隆后测序,扩增的napA基因全长435 bp,测序后登录在GenBank中(No.DQ341279)。然后,酶切目的基因片段,与表达载体连接转化宿主细胞,构建napA基因原核表达系统pGEX-4T-1-napA-*E.coli* Top10,采用SDS-PAGE电泳鉴定表达产物, IPTG诱导表达, GST亲和层析纯化收集rNAP, Western blot法鉴定rNAP的免疫原性,获得重组*H pylori*-NAP蛋白。

1.2.2 幽门螺杆菌全菌抗原的制备 将菌株接种于含100 mL/L羊血的空弯培养基平板上, 37℃微需氧环境(850 mL/L, 100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂)培养3 d,菌苔小心刮入PBS液中,超声破菌后超速离心,分别收集上清和沉淀作为免疫和筛选抗原。

1.2.3 动物免疫 首次用弗氏完全佐剂与抗原乳化皮下多点注射, 50 μg/只,共5只,再每隔2 wk后用弗氏不完全佐剂与抗原乳化皮下多点注射, 50 μg/只,至尾静脉采血测定抗体效价达到1:16 000以上。融合前3 d腹腔注射50 μg/只进行加强免疫。

1.2.4 杂交瘤细胞的制备和筛选 末次加强免疫后3 d取小鼠脾细胞(1×10^8)与骨髓瘤细胞SP2/0(1×10^7),在0.5 g/L PEG₁₄₅₀作用下进行融合。融合细胞先用HAT培养基选择培养, 10 d后改用含200 mL/L小牛血清的RPMI1640培养基培养。取培养上清用间接荧光法筛选阳性克隆:以*H pylori*超声破菌后的上清和沉淀作为包被抗原, HRP标记的羊抗鼠IgG为二抗,并以免疫小鼠血清为阳性对照。采用有限稀释法对鉴定出来的阳性克隆细胞连续亚克隆,至每株细胞亚克隆阳性率达到100%,将细胞扩大培养后液氮冷冻。

1.2.5 腹水和mAb的制备 使用石蜡油预处理BALB/C小鼠,每只小鼠腹腔注射0.5 mL石蜡油。1 wk后,给预处理小鼠腹腔注射已建株的杂交瘤细胞约 2×10^6 - 3×10^7 个, 7-10 d后采集腹水离心去除细胞沉淀, 11 800 g, 10 min。上清用0.22 μm滤膜过滤。

1.2.6 针对*H pylori*-NAP的mAb的筛选 重组*H*

pylori-NAP蛋白与29株mAb的反应: 采用间接ELISA法, 以本室制备的重组表达的*H pylori*-NAP蛋白为包被抗原(5 μ g/孔), 50 g/L脱脂牛奶封闭2 h后, 加*H pylori* mAb(5 μ g/孔), 37°C作用1 h, 再加入HRP-标记的羊抗鼠IgG(1:1000), 作用0.5-1 h后, DAB显色. 酶标仪读数.

mAb亚类鉴定和效价检测: mAb亚类鉴定采用Hycult公司的鼠mAb亚类检测试剂盒, 按说明书操作. 抗体效价的测定采用间接ELISA法, 每株mAb的细胞培养上清按2倍比稀释, 腹水按200倍比稀释.

ELISA鉴定单抗与其他肠道细菌的交叉反应: 采用间接ELISA法, 以培养的痢疾志贺菌、福氏志贺菌、宋氏志贺菌、伤寒沙门氏菌、变形杆菌和弯曲杆菌超声破菌后的上清和沉淀分别为包被抗原检测单抗.

免疫印迹(Western blot)鉴定mAb特异性: 将重组的*H pylori*-NAP蛋白进行SDS-PAGE蛋白电泳, 转印至硝酸纤维素膜, 100 g/L脱脂牛奶4°C封闭过夜, 以1:100稀释的mAb作为一抗, HRP-标记的羊抗鼠IgG为二抗, 反应后洗膜, 用化学发光显色.

免疫组化鉴定mAb特异性: 以培养的*H pylori*临床株作为抗原涂片, 丙酮固定60 min, 加入1:100稀释的单抗, 再滴加HRP-标记羊抗鼠IgG(1:250), 室温作用1 h, DAB显色, 显微镜观察.

2 结果

2.1 抗*H pylori*杂交瘤细胞建株及单抗制备 融合细胞2次, 融合率平均约为90%. 以间接ELISA法筛选阳性克隆细胞, 每株阳性克隆细胞连续亚克隆3-4次, 共获得29株抗*H pylori*杂交瘤细胞株. 杂交瘤细胞经过多次传代、冻存和复苏后, 生长良好, 并持续稳定的分泌抗体.

2.2 抗*H pylori*-NAP的mAb的筛选 应用间接ELISA法, 以重组NAP蛋白作为包被抗原, 与29株单抗反应后, 筛选出3株与NAP蛋白反应的单抗, 编号分别为E006, E019, E023.

2.3 mAb亚类和效价测定 应用鼠mAb亚类检测试剂盒, 对3株抗NAP蛋白单抗的细胞上清进行检测, 结果表明抗体亚类为IgG1, 轻链为 κ 型. mAb细胞培养液的抗体效价为1:16-1:32, 腹水的抗体效价是1:32 000-1:64 000(图1).

2.4 mAb与其他肠道细菌的交叉反应 间接ELISA法分析表明, 3株mAb与其他肠道细菌无交叉

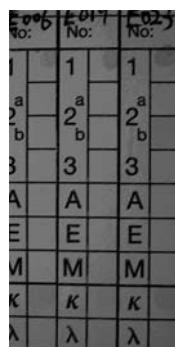


图1 3株mAb亚类测定(从左到右, 依次为E006, E019, E023).

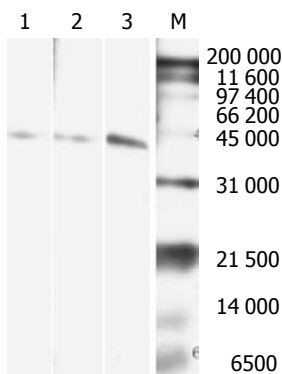


图2 重组NAP蛋白与相应抗体的Western blot分析. 1: E006; 2: E019; 3: E023; M: Marker.

反应.

2.5 重组NAP蛋白与相应mAb的Western blot分析 将重组NAP蛋白作SDS-PAGE电泳, 转印PVDF膜, 以3株mAb为一抗, HRP-标记的羊抗鼠IgG为二抗, 化学发光显色后, 在分子质量约44 kDa处出现一条阳性条带, 表明抗NAP单抗仅针对NAP蛋白, 具有高度的特异性(图2).

2.6 免疫组化鉴定 3株NAP mAb能与*H pylori*临床菌株发生反应, 菌体呈深棕色(图3).

3 讨论

本研究应用*H pylori*全菌蛋白作为抗原制备mAb, 并用重组NAP蛋白筛选抗NAP的mAb, 从29株mAb中, 得到3株抗NAP蛋白的mAb, 在Western blot实验中, 能与相应的重组蛋白发生反应. 抗NAP mAb与其他肠道杆菌无交叉反应. 免疫组化鉴定发现, 3株NAP mAb能与*H pylori*临床菌株发生反应, 将菌体染为深棕色. 实验表明: 已获得3株特异性针对NAP蛋白的mAb.

幽门螺杆菌NAP蛋白是一重要的毒力因子, 能诱导中性粒细胞在胃黏膜中的浸润, 造成胃黏膜的损伤和炎症; 由于*H pylori*-NAP能激活中性粒细胞产生活性氧中间产物ROI, ROI能直接攻击DNA而具致突变作用, 提示ROI可能是致

■创新盘点

本研究以天然的*H pylori*全菌蛋白作为抗原, 应用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 再用表达的重组蛋白筛选相应的单抗, 省去了每一种重组蛋白分别免疫小鼠制备单抗的繁琐步骤, 而且获得的抗体是针对天然菌体蛋白的.

■应用要点

该研究建立的鉴定单抗与*H pylori*临床株特异性结合反应的免疫组化方法,可进一步用于临床胃黏膜标本的检测。

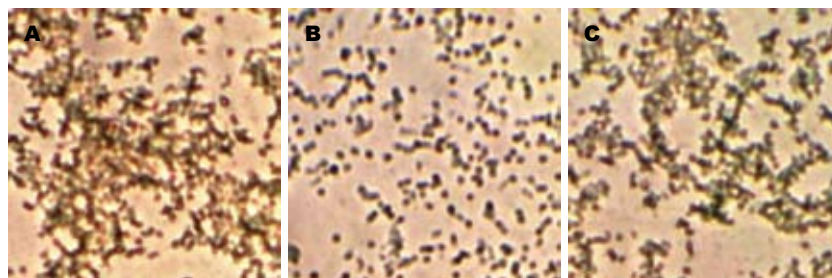


图3 免疫组化检测单抗与*H pylori*临床菌株的反应。A: E006; B: E019; C: E023。

突变因子,与*H pylori*相关性胃癌的发生有关^[2,9]。因此,我们希望通过制备NAP单抗,建立更加特异和简便的诊断方法,用于*H pylori*感染的诊断和预后的判断。

疫苗接种是预防甚至治疗*H pylori*感染的理想方法。但目前尚无有效的疫苗用于*H pylori*感染的控制。*H pylori*抗原成分很多,但单一抗原的保护率低,联合应用多种抗原将极大提高保护效果^[12-15]。*H pylori*-NAP抗原性强,大部分*H pylori*感染患者产生NAP抗体,用*H pylori*-NAP免疫小鼠能保护机体抵抗*H pylori*的感染,保护率80%,表明*H pylori*-NAP可作为*H pylori*疫苗的候选抗原^[8-9,16]。我们正在应用鉴定出的NAPmAb作为靶分子,利用噬菌体肽库技术筛选NAP具有免疫原性的抗原表位,用于*H pylori*多表位疫苗的研制。

4 参考文献

- Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elia MM, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest* 2006; 116: 1092-1101
- Brisslert M, Enarsson K, Lundin S, Karlsson A, Kusters JG, Svennerholm AM, Backert S, Quiding-Jarbrink M. *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 95-103
- Montecucco C, de Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin(VacA)and neutrophil-activating protein (HP-NAP)virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* 2003; 5: 715-721
- Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Del Giudice G, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP)activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2003; 33: 840-849
- Allen LA. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 273-277
- Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Fukuda Y, Sugawara K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J Clin Pathol* 2003; 56: 348-351
- Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P, Del GG, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2002; 291: 545-550
- Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein(HP-NAP)of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000; 191: 1467-1476
- 周永宁, 徐采朴. 幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白的研究进展. *免疫学杂志* 2001; 17: 53-55
- 李妍, 宁云山, 洪燕华, 刘宜楚, 罗军, 龙敏, 董文其, 李明. 抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备和鉴定. *南方医科大学学报* 2006; 26: 425-427
- Kang QZ, Duan GC, Fan QT, Xi YL. Fusion expression of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein in E.coli. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 454-456
- Vajdy M, Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Soenawan E, Cuadra L, Kazzaz J, Ruggiero P, Peppoloni S, Norelli F, del Giudice G, O'Hagan D. Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology* 2003; 110: 86-94
- Rossi G, Ruggiero P, Peppoloni S, Pancotto L, Fortuna D, Lauretti L, Volpini G, Mancianti S, Corazza M, Taccini E, Di Pisa F, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun* 2004; 72: 3252-3259
- 王媛, 严杰, 毛亚飞. 幽门螺杆菌napA基因原核表达系统构建及其表达产物的免疫性和致炎作用. *中华微生物学和免疫学杂志* 2005; 25: 98-102
- Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 523-563
- Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein: From gene to drug candidate. *Pharmacol Ther* 2007; 114: 146-154

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

幽门螺杆菌NCTC 11637 *cagT*基因的克隆及序列分析

崔蕾蕾, 邵世和

崔蕾蕾, 邵世和, 江苏大学医学技术学院病原学及病原学检验系 江苏省镇江市 212013
江苏省科技厅项目: No. BS2004021
江苏大学高级人才项目: No. JDG2004008
通讯作者: 邵世和, 212013, 江苏省镇江市学府路301号, 江苏大学医学技术学院病原学及病原学检验系.
shaoshihe2006@163.com
电话: 0511-5038375-326 传真: 0511-5038449
收稿日期: 2007-01-17 接受日期: 2007-02-12

Cloning and sequence analysis of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 *cagT* gene

Lei-Lei Cui, Shi-He Shao

Lei-Lei Cui, Shi-He Shao, Department of Etiology and Etiology Inspection, School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China
Supported by the Science and Technology Office Program of Jiangsu Province, No. BS2004021 and the High-Grade Talented Individuals Program of Jiangsu University, No. JDG2004008
Correspondence to: Shi-He Shao, Department of Etiology and Etiology Inspection, School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China. shaoshihe2006@163.com
Received: 2007-01-17 Accepted: 2007-02-12

Abstract

AIM: To clone and analyze *H pylori cagT* gene.

METHODS: *H pylori cagT* gene was amplified from the genome DNA by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was inserted into pGEM-T vector and then transformed into *E.coli* DH5 α . The positive recombinant clone was analyzed by digestion of restriction endonuclease. Next, the *cagT* gene fragment was inserted directionally into vector pQE30 to construct recombinant clone of *cagT*, which was sequenced finally.

RESULTS: A *cagT* gene consisting of 843 base pairs, which encoded a product of 280 amino acids, was obtained using PCR method and was cloned into pGEM-T vector successfully. Its GenBank accession number was EF114758. Sequence analysis showed that *cagT* gene had shared 97%-99% homology with other strains in GenBank.

CONCLUSION: The correct *cagT* gene is successfully cloned, which established a basis for further investigation of its biological function.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *cagT*; gene clone; sequence

Cui LL, Shao SH. Cloning and sequence analysis of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 *cagT* gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1433-1436

摘要

目的: 克隆幽门螺杆菌(*H pylori*) NCTC 11637 *cagT*(HP0532)的编码基因, 并分析其核苷酸序列。

方法: 应用PCR技术从*H pylori*基因组DNA中扩增*cagT*编码基因片段, 克隆至pGEM-T载体后, 再将其定向插入pQE30载体中, 双酶切鉴定筛选阳性克隆, 并进行序列分析。

结果: NCTC 11637 *cagT*基因全长843 bp(GenBank登录号为EF114758), 编码280个氨基酸, 与GenBank公布的其他*H pylori*菌株基因序列的核苷酸同源性为97%-99%。

结论: 成功克隆了*cagT*基因, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

关键词: 幽门螺杆菌; *cagT*; 克隆; 测序

崔蕾蕾, 邵世和. 幽门螺杆菌NCTC 11637 *cagT*基因的克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1433-1436
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1433.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染在世界范围内广泛流行. 已证实*H pylori*感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 与胃癌和胃黏膜相关性淋巴样组织(MALT)恶性淋巴瘤的发病也有密切关系^[1-2]. *H pylori*的*cagT*/*H pylori* 0532由*cag*致病岛编码, Rohde *et al*^[3]用激光共聚焦扫描电镜和免疫场致发射扫描电镜技术发现, *H pylori*的*cagT*定位于

■背景资料

*H pylori*已被证实是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 且与胃癌和胃黏膜相关性淋巴瘤的发病也有密切关系, 已被IARC/WHO定为I类致癌原. 导致严重胃部疾病的*H pylori*菌株中含有一个*cag*致病岛, 基因呈高密度分布并编码一个分泌转运系统(type IV secretion system, TFSS), 通过转运细胞相关毒素CagA而参与*H pylori*诱导上皮细胞内的酪氨酸磷酸化、细胞骨架重排、基垫结构形成、活化核转录因子NF- κ B、诱导促炎细胞因子白细胞介素-8的表达等, 在*H pylori*致病中起着关键作用。

■应用要点

本文通过对*cagT*基因的克隆及其序列的核苷酸同源性分析,发现NCTC 11637 *cagT*基因与GenBank公布的其他*H. pylori*菌株基因序列的核苷酸同源性为97%-99%,为进一步研究其生物学功能及其在致病中的作用奠定基础。

*H. pylori*的外膜上,分布在细菌表面纤毛样结构的基底部,推测其可能是分泌素或是与分泌素相关的脂蛋白(引导蛋白),允许*H. pylori* 0527和针样纤毛结构通过,并起着稳固其他蛋白的作用。我们通过克隆*H. pylori cagT*基因,构建原核表达载体,并对其序列进行分析,旨在为进一步研究*cagT*基因在*H. pylori*致病中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* NCTC11637购自中国预防科学院流行病学研究所,大肠埃希菌DH5 α 为江苏大学医学技术学院中心实验室保存。哥伦比亚培养基、厌氧袋购自OXOID公司; Ex Taq DNA聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶*Bam*H I 及*Hind* III、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0、T₄DNA连接酶(快速连接试剂盒)、DL2000 DNA Marker购自TaKaRa公司; 1 kb DNA Ladder购自TOYOBO; pGEM-T载体购自Promega公司; pQE30载体由江苏大学医学技术学院中心实验室保存; PCR基因扩增仪(Mastercycler Gradient, Eppendorf公司)、自动凝胶成像系统(美国UVP公司),其他常规试剂按照《分子克隆实验指南》要求配制。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增及纯化DNA 用常规酚、氯仿抽提法获得, -20℃保存备用。根据GenBank中已报道的*H. pylori* 26695 NC_000915的HP0532基因(*cagT*基因)序列,利用软件Primer Premier5.0设计PCR引物: P1: 5'-TCCGGATCCATGAAAGTGAGAGCAAGTGT-3'(29 bp); P2: 5'-GCCAAGCTTTCACCTACCACTGAGCAAAC-3'(29 bp)。在上游引物P1 5'端加*Bam*H I 酶切位点; 在下游引物P2 5'端加*Hind* III酶切位点。预期的PCR产物长度为843 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。用Ex Taq DNA聚合酶进行PCR扩增(在25 μ L反应体系中,分别加入dNTP 2 μ L、Mg²⁺ 1.5 μ L、10 \times Buffer(Mg²⁺阴性)2.5 μ L、DNA模板1 μ L、浓度为20 μ mol/L的P₁和P₂引物各0.7 μ L、Ex Taq DNA聚合酶0.2 μ L,按照PCR条件扩增),其扩增参数为: 94℃预变性5 min后,按94℃ 30 s、55.4℃ 30 s、72℃ 1 min, 30个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色, Genius凝胶电泳图像分析系统分析鉴定。

1.2.2 TA克隆及鉴定 胶回收试剂盒回收目的片



图1 *cagT*基因PCR产物。
1: DNA marker DL2000; 2: *cagT* PCR product; 3: negative control.

段,胶回收PCR产物与pGEM-T载体(摩尔比8:1),加1 μ L T₄DNA连接酶, 4℃连接过夜。连接产物转化DH5 α 感受态细胞。转化后的细菌涂布于含50 mg/L氨苄青霉素的LB平板上, 37℃培养16 h。挑取菌落转种于含氨苄青霉素50 mg/L的LB液体培养基, 37℃振荡12 h,用碱裂解法进行质粒小量提取,并进行*Bam*H I、*Hind* III双酶切鉴定和质粒PCR鉴定。

1.2.3 重组质粒的构建 将质粒pQE30和TA克隆鉴定阳性的质粒经*Bam*H I 和*Hind* III双酶切,回收酶切片段, T₄连接酶试剂盒作用下16℃连接过夜,转化宿主菌DH5 α ,双酶切鉴定筛选出阳性克隆。

1.2.4 DNA序列测定与分析 将经过鉴定的阳性重组质粒寄至上海生工生物技术有限公司测序。测序结果通过GenBank进行同源性比较分析。

2 结果

2.1 *cagT*基因PCR扩增结果 PCR结果发现在843 bp左右有一条带,与预计大小一致,无非特异性条带(图1)。

2.2 TA克隆重组质粒的筛选与鉴定 将PCR产物与pGEM-T载体连接产物转化至DH5 α ,随机挑取菌落,抽提质粒,双酶切产物电泳后,阳性克隆出现的两条带分别位于3003 bp和843 bp处(图2)。

2.3 重组表达质粒的酶切鉴定 重组质粒pQE30-*cagT*经*Bam*H I 和*Hind* III双酶切鉴定结果(图3)。

2.4 *cagT*基因片段的测序结果及序列分析 将经鉴定后的重组质粒送往上海生工生物技术有限公司进行核苷酸序列测定, DNA测序结果表明,构建的重组质粒上的*cagT*长度为843 bp,与设计序列大小完全一致, GenBank登录号为EF114758,将其测序结果通过GenBank与已知的两种国际标准菌株*H. pylori* 26695和J99的

HP0532基因的核苷酸序列进行比对, 与26695菌株的HP0532比较, 同源率为97%(822/843), 与J99菌株的*cagT*比较, 同源率为97%(826/843), 碱基总数相同. 而与Censini *et al*^[4]报道(GenBank登录号: AF282852)的几乎一致, 同源率高达99%(841/843).

3 讨论

*H. pylori*是定植于人胃部特定的病原菌, 感染呈全球分布, 感染率高达50%以上. 现已证实他是轻度胃炎, 消化性溃疡及胃癌的主要病因. 导致严重胃部疾病的*H. pylori*菌株中含有一个*cag*致病岛(cytotoxin associated gene pathogenicity island, *cag* PAI). *cag*致病岛是一个约40 kb的特殊基因片段, 该片段只出现于致病相关菌株, 可有部分或全部丢失等不稳定表现, G+C含量与*H. pylori*整个染色体DNA的平均含量不同, 其侧面为两个31 bp的直接重复序列, 并有插入序列(IS)元件的出现, 随着*cag*致病岛的分割及缺失, *H. pylori*的毒力梯度呈下降趋势. *cag*致病岛基因呈高密度分布并编码一个分泌转运系统(type IV secretion system, TFSS). 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的VirB-VirD系统或称Ti-DNA输送系统被公认为是TFSS的标准, 他是由virB操纵子的产物(VirB1-VirB11蛋白)和virD4基因编码的产物VirD4装配而成, 形成跨膜通道将蛋白直接注入宿主细胞内^[5]. Tanaka *et al*^[6]认为*H. pylori*的TFSS装置是一个丝状的大分子结构, 伸出细菌外膜的表面. 在*H. pylori*中, TFSS组分包括定位于内膜的ATPases即HP0544/CagE和HP0525/Cag α , 以及偶联蛋白HP0524/Cag β , 他们分别是VirB4、VirB11及VirD4的同源物, 为转运底物提供能量. HP0523可能与VirB1的功能相似, 可能是一个糖基转移酶, 切断肽聚糖, 使得TFSS装置能够横跨细菌细胞壁^[3,7]. 跨膜通道本身连接内外膜, 由HP0529/VirB6, HP0532(CagT)/VirB7, HP0530/VirB8, HP0528(CagX)/VirB9和HP0527/VirB10组成, 一般认为HP0530/VirB8和HP0527/VirB10形成转运装置的核心, 可能跨越内外膜形成一个孔道. HP0529/VirB6有多层跨膜螺旋, 与HP0530/VirB8和HP0527/VirB10形成内膜复合体. HP0528/VirB9与脂蛋白HP0532/VirB7形成外膜复合体. Tanaka *et al*^[6]用免疫金电镜技术发现, VirB7和VirB9的同系物HP0532/*cagT*和 HP0528/CagX沿着菌毛的长度定植, 而Rohde *et al*^[3]描述

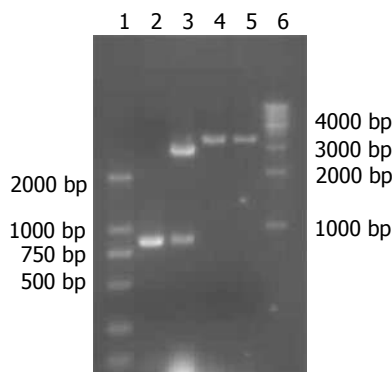


图 2 重组质粒pGEM-T/*cagT*的双酶切鉴定结果. 1: DNA Marker DL2000; 2: PCR product; 3: pGEM-T/*cagT*/BamHI + HindIII; 4: pGEM-T/*cagT*/BamHI; 5: pGEM-T/*cagT*/HindIII; 6: 1 kb DNA Ladder.

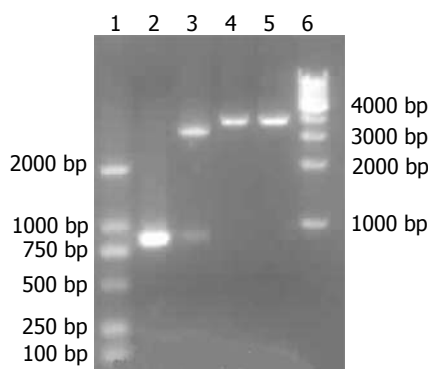


图 3 重组质粒pQE30/*cagT*的双酶切鉴定结果. 1: DNA Marker DL2000; 2: PCR product of *cagT*; 3: pQE30/*cagT*/BamHI + HindIII; 4: pQE30/*cagT*/BamHI; 5: pQE30/*cagT*/HindIII; 6: 1 kb DNA Ladder.

HP0532/*cagT*在菌毛的基部环形分布. 在根癌农杆菌中, VirB7其自身稳定是通过cys-24形成二硫键交联的同型二聚体, VirB9的cys-262与VirB7的cys-24间形成二硫键交联的异型二聚体, 然后与内膜蛋白VirB8和VirB10作用形成转运装置孔道, 其VirB7在形成转运装置的过程中, 介导菌毛与通道的核心复合物VirB8-VirB9-VirB10的连接, 对稳定其他VirB蛋白起着关键的作用^[8-12]. HP0546是TFSS伸出细菌表面菌毛样结构的主要成分, 其作用可能是建立细菌和宿主细胞的接触^[13]. 目前认为, 由*cag*致病岛编码的蛋白构成的细菌IV型分泌系统(TFSS), 通过转运细胞相关毒素CagA而参与*H. pylori*诱导上皮细胞内的酪氨酸磷酸化、细胞骨架重排、基垫结构形成、活化核转录因子NF- κ B、诱导促炎细胞因子白细胞介素-8的表达等, 在*H. pylori*致病中起着关键作用^[14-15].

我们从*H. pylori* NCTC11637菌株中克隆*cagT*基因并对其DNA序列进行测定, 利用生物

■创新盘点

本文首次克隆*H. pylori* NCTC 11637菌株*cagT*基因全长, 比较其与其他菌株的同源性, 并成功构建了原核表达载体, 为后续的研究工作奠定基础.

■同行评价

本文进行了幽门螺杆菌NCTC 11637 *cagT*基因的克隆及序列分析,介绍了有关*cag*克隆的基因的结果,方法先进,结果可信,有一定的科学性。

信息数据库及生物学软件对*cagT*基因序列进行同源性分析,结果表明,*cagT*基因是一类高度保守的原核型基因,与*H pylori*其他菌株的同源性在97%-99%,与真核生物无同源序列。测序结果证实*cagT*基因克隆成功,为深入研究其生物学功能及潜在的临床应用前景提供了良好的实验基础。

4 参考文献

- 1 Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastroduodenal disease. *Annu Rev Med* 1992; 43: 135-145
- 2 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- 3 Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. A novel sheathed surface organelle of the Helicobacter pylori *cag* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2003; 49: 219-234
- 4 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14648-14653
- 5 Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 137-149
- 6 Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2003; 5: 395-404
- 7 Hoppner C, Liu Z, Domke N, Binns AN, Baron C. VirB1 orthologs from Brucella suis and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* 2004; 186: 1415-1422
- 8 Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42: 1337-1348
- 9 Spudich GM, Fernandez D, Zhou XR, Christie PJ. Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7512-7517
- 10 Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, Haas R, Blaser MJ. Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* 2003; 198: 1349-1360
- 11 Buhrdorf R, Forster C, Haas R, Fischer W. Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the *cag* type IV secretion system in Helicobacter pylori. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 213-217
- 12 Busler VJ, Torres VJ, McClain MS, Tirado O, Friedman DB, Cover TL. Protein-protein interactions among Helicobacter pylori *cag* proteins. *J Bacteriol* 2006; 188: 4787-4800
- 13 Yeo HJ, Waksman G. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J Bacteriol* 2004; 186: 1919-1926
- 14 Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191: 593-602
- 15 Li SD, Kersulyte D, Lindley IJ, Neelam B, Berg DE, Crabtree JE. Multiple genes in the left half of the *cag* pathogenicity island of Helicobacter pylori are required for tyrosine kinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1999; 67: 3893-3899

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

肿瘤坏死因子 α 在大鼠脑外伤后急性胃黏膜病变中的作用

王娟

王娟, 中国人民解放军总医院消化科 北京市 100853
通讯作者: 王娟, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科. wjlaqlss@sina.com
电话: 010-66937078 传真: 010-68154653
收稿日期: 2007-04-03 接受日期: 2007-04-13

Role of tumor necrosis factor- α in acute gastric mucosal injury in rats after acute brain trauma

Juan Wang

Juan Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Juan Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. wjlaqlss@sina.com
Received: 2007-04-03 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To detect the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in acute gastric mucosal injury in rats after acute brain trauma and explore its significance.

METHODS: Modified Allen's method was used to induce the rat model of acute gastric mucosal injury after acute brain trauma. Meanwhile, the sham operation group was also designed. The content of TNF- α and ulcer index of gastric mucosa were determined at different time points (1, 3, 6, 24 h), and the pathological changes were also observed under light microscope.

RESULTS: The content of TNF- α in model group was significantly higher than that in control group at the 1st, 3rd, 6th and 24th hour ($t = 16.45, P = 0.000; t = 5.252, P = 0.000; t = 9.099, P = 0.000; t = 12.028, P = 0.000$). More severe injury occurred in model group and the ulcer index of gastric mucosa was markedly higher than that in control group at the 6th and 24th hour ($t = 7.275, P = 0.000; t = 10.579, P = 0.000$). TNF- α content was positively correlated with the ulcer index of gastric mucosa ($r = 0.68, P = 0.004$).

CONCLUSION: TNF- α plays a certain role in acute gastric mucosal injury after acute brain trauma.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Acute gastric mucosal injury; Brain trauma; Rat

Wang J. Role of tumor necrosis factor- α in acute gastric mucosal injury in rats after acute brain trauma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(12):1437-1440

摘要

目的: 检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在大鼠脑外伤后急性胃黏膜病变前后的含量并探讨其意义。

方法: 采用改良的Allen法建立大鼠颅脑外伤并发急性胃黏膜病变模型, 同时设立假手术对照组, 测定不同时间点(1, 3, 6, 24 h)各组大鼠血清中TNF- α 含量及胃黏膜溃疡指数, 并观察胃黏膜大体及光镜下组织病理学改变。

结果: 模型组1, 3, 6, 24 h血清中TNF- α 含量明显高于对照组($t = 16.45, P = 0.000; t = 5.252, P = 0.000; t = 9.099, P = 0.000; t = 12.028, P = 0.000$)。模型组胃黏膜损伤严重, 6, 24 h点溃疡指数明显高于对照组($t = 7.275, P = 0.000; t = 10.579, P = 0.000$)。TNF- α 含量与溃疡指数呈线性正相关($r = 0.68, P = 0.004$)。组织学也有相应改变。

结论: TNF- α 在颅脑外伤急性胃黏膜病变的发病中起一定作用。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 急性胃黏膜病变; 脑外伤; 大鼠

王娟. 肿瘤坏死因子 α 在大鼠脑外伤后急性胃黏膜病变中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1437-1440
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1437.asp>

0 引言

急性胃黏膜病变是临床常见急症, 是机体在应激状态下所引起的急性胃黏膜糜烂、溃疡和出

■背景资料

对于急性胃黏膜病变的发病机制, 研究较多的是胃黏膜血流减少和微循环障碍、胃酸分泌异常和胃黏膜屏障功能的破坏、胃运动功能异常、神经内分泌失调、心理因素等, TNF- α 的作用报道甚少。有些学者给大鼠服用NSAIDs, 建立急性胃黏膜病变模型, 提出TNF- α 与胃黏膜损伤关系密切, 本研究建立了大鼠颅脑外伤急性胃黏膜病变模型, 发现TNF- α 在急性胃黏膜病变的发病中起一定作用。

■同行评价

本文研究了肿瘤坏死因子(TNF- α)在大鼠脑外伤后急性胃黏膜病变中的作用,科学性好,结果可信,结论可靠,有较高的指导意义。

血,在重症监护病房中发病率85%-100%。其发病机制非常复杂,关于TNF- α 在颅脑损伤引起的急性胃黏膜病变的研究报道甚少。我们建立大鼠颅脑外伤急性胃黏膜病变模型,检测血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)含量及胃黏膜溃疡指数(UI),并观察胃黏膜大体及光镜下组织病理学改变,以探讨TNF- α 在急性胃黏膜病变发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量为220-280 g δ Wistar大鼠48只随机分为2组,各组24只,即: I组应激组, II组假手术组,每组按颅脑外伤后1, 3, 6, 24 h时间点再分为4小组(每组6只)。实验仪器包括307-2B牙科台式电钻车(宁波医疗器械厂);大鼠立体定位仪(国营西北光学仪器厂);离心机(北京医用离心机厂)。TNF- α 试剂盒由北京邦定生物医学公司提供。

1.2 方法 用改良的Allen法^[1]建立颅脑外伤模型,将禁食(自由饮水)24 h大鼠用100 mL/L水合氯醛麻醉(4 mL/kg),头部固定于立体定位仪上,中线处切开头皮约4-5 cm,剥离骨膜,用牙科电钻于大鼠头颅齿状缝左旁2 mm,冠状缝后1 mm,人字缝前1 mm处钻孔至硬脑膜,将中心黏有直径3 mm高4 mm圆柱体的硬塑料板(直径1 cm,厚5 mm)放置于大鼠头部顶叶,其中心圆柱体置于钻孔内,于距硬塑料板上方50 cm高度将20 g砝码自由落下造成颅脑损伤模型后缝合头皮。I组大鼠分别于颅脑损伤后禁食水1, 3, 6, 24 h后测定各项指标; II组大鼠于切开头皮钻孔后不打击缝合头皮,禁食水1, 3, 6, 24 h后测定各项指标。大鼠用100 mL/L水合氯醛(4 mL/kg)麻醉后,于剑突下正中切开腹壁,游离胃,口肛两端结扎,沿胃大弯侧剪开胃壁,用生理盐水冲洗后评定UI;剪去一小块胃黏膜,浸于40 g/L甲醛固定,光镜下观察黏膜组织的病理变化。心脏取血1 mL后处死大鼠,将血以3000 r/min离心15 min,取上清液-20℃保存;观测血清TNF- α 含量,采用双抗体夹心ELISA方法, TNF- α 浓度以ng/L表示;胃黏膜UI,参照Guth^[2-3]标准评定,即以胃黏膜斑点糜烂记1分,糜烂长径<1 mm记2分, 1-2 mm记3分, >2-3 mm记4分, ≥ 3 mm记5分,按上述方法计分全胃得分之和即为UI;光镜下观察黏膜组织的病理变化。

统计学处理 计量数据用均数 \pm 标准差表示,采用CHISS统计软件,对同一组中不同时间

的计量资料用单因素方差分析,对不同组间计量资料两两比较使用 t 检验,用直线相关与回归分析UI与血清肿瘤坏死因子含量之间关系。

2 结果

2.1 病理学观察 I组大鼠于打击后1, 3 h可见胃黏膜弥漫性充血水肿,无糜烂、出血、溃疡;6 h胃黏膜出现点状糜烂;24 h胃黏膜充血糜烂,并见溃疡形成。II组大鼠各时段胃黏膜表面光滑,有粉红色光泽。I组1, 3 h组胃黏膜表光镜下表层血管充血及出血,黏膜腺体肿胀,黏膜层内有少量中性粒细胞浸润,二者镜下无显著性差异;6 h组较前二者损伤重,镜下见黏膜上皮局部坏死脱落并伴出血;24 h组最为严重,黏膜层广泛出血坏死,其损伤深度约达上皮全层上4/5,并有大量中性粒细胞浸润。II组大鼠各时段胃黏膜上皮均完整,未见明显炎细胞浸润。

2.2 血清TNF- α 含量 I, II组各时点血清TNF- α 含量比较,均有显著性差异($t = 16.45, 5.252, 9.099, 12.028, P = 0.000 < 0.01$, 表1), I组内血清TNF- α 含量随时间延长有增加趋势,观察期限内24 h最高,各时间点有显著性差异($F = 80.696, P = 0.000 < 0.01$, 表1); II组各时点血清TNF- α 含量无统计学意义。I组动物1, 3 h胃黏膜无溃疡出现;6, 24 h UI则明显增大,与II组比较,差异显著($t = 7.275, 10.579, P = 0.000 < 0.01$, 表1), I组内24 h UI明显大于6 h ($F = 85.58, P = 0.000 < 0.01$, 表1)。用线性相关与回归分析,应激组血清TNF- α 含量与UI之间存在线性正相关($r = 0.68, P = 0.004 < 0.01$)。

3 讨论

急性胃黏膜病变的发病机制非常复杂,他是多种因素综合作用的结果^[4-13],其中国内外关于其机制方面研究较多的是胃黏膜血流减少和微循环障碍、胃酸分泌异常和胃黏膜屏障功能的破坏、胃运动功能异常、神经内分泌失调、心理因素等,肿瘤坏死因子在大鼠急性脑损伤后急性胃黏膜病变过程中的作用国内外研究甚少。我们应用改良的Allen法成功地建立起大鼠急性胃黏膜病变模型,组织形态学证实,应激组大鼠胃黏膜有充血、水肿、糜烂、溃疡、出血,而假手术组则无上述变化;光镜下发现应激组胃黏膜表层血管充血及出血,腺体肿胀,黏膜上皮坏死脱落,有中性粒细胞浸润,假手术组胃黏膜上皮均完整,未见明显炎细胞浸润。通过观察大

表 1 急性胃黏膜病变大鼠血清TNF- α 以及胃黏膜UI的变化(mean \pm SD, $n = 24$)

分组	TNF- α (ng/L)				胃黏膜UI			
	1 h	3 h	6 h	24 h	1 h	3 h	6 h	24 h
I 组	165.6 \pm 22.2 ^{bd}	247.5 \pm 31.5 ^{bd}	355.2 \pm 40.2 ^{bd}	447.3 \pm 37.5 ^{bd}	0	0	4.13 \pm 1.96 ^b	32.75 \pm 8.41 ^{bf}
II 组	20.3 \pm 1.9	18.6 \pm 3.2	19.4 \pm 2.8	22.5 \pm 2.3 ^d	0	0	0	0

^b $P < 0.01$ vs II 组; ^d $P < 0.01$, 1, 3 h vs 6, 24 h; ^f $P < 0.01$ vs 6 h.

鼠颅脑损伤后胃黏膜损害发生、发展的过程, 血中TNF- α 含量的变化, 研究他们之间的关系, 探讨TNF- α 在颅脑损伤引起的急性胃黏膜病变中的作用。

TNF系因其具有使肿瘤组织坏死的作用而得名, 分为两类: TNF- α 及TNF- β , TNF- α 是由巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞和活化T细胞产生的免疫调节因子, 具有广泛的生物学活性, 并具有双重性。一方面他是机体免疫防护的重要介质, 另一方面可参与机体的免疫病理损伤, 在疾病的发病机制上具有十分重要的临床价值, 在正常情况下具有抗肿瘤、抗感染等重要作用, 对机体有利, 但如持续释放或产生过多或与其他细胞因子的关系失调, 又会引起机体发热、休克、恶病质或器官出血性坏死等, 成为造成组织广泛损伤的促炎症因子, 参与疾病的发病机制。Kleine *et al*^[14-15]证实, 脑内多种在结构和功能方面与巨噬细胞相似的细胞如神经元、小胶质细胞、血管内皮细胞在生理状态下均可合成分泌TNF- α 等细胞因子, 在炎症情况下这些因子水平多显著升高, 并对中性粒细胞有明显趋化作用, 国外不同实验室也证实, 在脑损伤时, 脑组织产生了炎症反应^[16-17]。Santucci *et al*^[18]研究表明, 给大鼠服用NSAIDs, 可导致早期血浆中TNF- α 浓度增加, 胃黏膜损伤加重, 应用TNF- α 转换酶抑制剂(TACE)可使血浆中TNF- α 下降, 降低TNF- α mRNA的表达。张伟 *et al*^[19]用小剂量阿司匹林灌服大鼠, 免疫组化测定TNF- α 表达的阳性率为92.8%, 而且TNF- α 与胃黏膜损伤指数呈正相关, 表明TNF- α 与胃黏膜损伤关系密切, 并在其发病机制中有一定意义。

本实验中, 应激组与假手术组比较, 血清TNF- α 含量明显增高($P < 0.01$), 且随着应激时间的延长, 应激组血清TNF- α 的含量逐渐增加, 各时点间有显著性差异($P < 0.01$), 胃黏膜的损伤亦逐渐加重($P < 0.01$), 其6, 24 h组与假手术组相应时段比较有显著性差异($P < 0.01$), 且血清TNF- α

含量与UI呈正相关($r = 0.68$, $P < 0.01$)。提示急性脑外伤时血清TNF- α 明显升高, 与应激性溃疡的产生有一定关系, 其可能发生机制为^[20-29]: (1)激活血管内皮细胞, 促进血凝和血管收缩, 影响血管通透性, 并上调内皮细胞上的细胞间黏附分子的表达, 从而使中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞与血管内皮细胞表面的黏附增强, 导致炎症细胞浸润; (2)对中性粒细胞和单核巨噬细胞具有刺激作用, 可增强其吞噬功能, 并使之脱颗粒释放多种炎性介质, 如氧自由基、细胞因子及弹性蛋白酶等, 这些都是强力破坏组织的因素, 可造成胃黏膜损伤; (3)与其他细胞因子及炎症递质相互作用, 引起多种致损伤因子发生连锁反应。TNF- α 能诱导IL21, IL26等的基因表达, 活化磷脂酶A2(PLA2), 致使花生四烯酸分解, 产生PAF, LTs, PGEs, TXA2等炎性递质, 从而加剧炎症反应及微循环障碍; (4)通过灭活组织纤溶酶原激活物而抑制纤溶反应, 通过增强组织因子表达下调血栓调理素表达而激活凝血系统, 导致毛细血管微血栓形成, 引起血液流变学和血流动力学改变, 使胃黏膜产生缺血性病变。

总之, 急性胃黏膜病变的发病是多种因素综合作用的结果, 本实验结果表明, 血清TNF- α 与胃黏膜损伤程度密切相关, 其在颅脑外伤并发急性胃黏膜病变的发病中起一定作用。

4 参考文献

- 1 Faden AI. TRH analog YM-14673 improves outcome following traumatic brain and spinal cord injury in rats: dose-response studies. *Brain Res* 1989; 486: 228-235
- 2 Yabana T, Yachi A. Stress-induced vascular damage and ulcer. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 751-761
- 3 Ohba R, Otaka M, Odashima M, Jin M, Komatsu K, Konishi N, Wada I, Horikawa Y, Matsushashi T, Oyake J, Hatakeyama N, Watanabe S. Effect of cilostazol, a selective type-III phosphodiesterase inhibitor, on water-immersion stress-induced gastric mucosal injury in rats. *J Gastroenterol* 2006; 41: 34-40
- 4 Hamaguchi M, Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Mechanisms and roles

- of neutrophil infiltration in stress-induced gastric injury in rats. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2708-2715
- 5 Chen SH, Lei HL, Huang LR, Tsai LH. Protective effect of excitatory amino acids on cold-restraint stress-induced gastric ulcers in mice: role of cyclic nucleotides. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2285-2291
- 6 Yoshida M, Wakabayashi G, Ishikawa H, Kameyama K, Shimazu M, Tanabe M, Kawachi S, Kumai K, Kubota T, Otani Y, Saikawa Y, Sano K, Kitajima M. A possible defensive mechanism in the basal region of gastric mucosa and the healing of erosions. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003; 29: 301-312
- 7 Umarova BA, Smirnova EA, Luk'yantseva GV, Kopylova GN, Samonina GE, German SV, Zhuikova SE. Effect of amylin on mast cell secretion as a possible mechanism increasing gastric mucosa resistance. *Bull Exp Biol Med* 2001; 132: 929-931
- 8 Otsuka M, Kato K, Murai I, Asai S, Iwasaki A, Arakawa Y. Roles of nocturnal melatonin and the pineal gland in modulation of water-immersion restraint stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *J Pineal Res* 2001; 30: 82-86
- 9 Fujikawa T, Soya H, Tamashiro KL, Sakai RR, McEwen BS, Nakai N, Ogata M, Suzuki I, Nakashima K. Prolactin prevents acute stress-induced hypocalcemia and ulcerogenesis by acting in the brain of rat. *Endocrinology* 2004; 145: 2006-2013
- 10 李兆申, 万维琴, 段义民, 湛先保, 许国铭, 龚燕芳, 屠振兴. 应激状态下大鼠胃黏膜组织中内皮素-1A受体 mRNA 的表达及其意义. *胃肠病学* 2003; 8: 75-78
- 11 刘婧, 李兆申, 宛新建, 王雯. 凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 和 Fas/Fas L 在应激性溃疡发生发展过程中的表达及作用. *中华医学杂志* 2003; 83: 504-509
- 12 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 应激状态下胃粘膜组织 ECE-1 mRNA 表达变化及其意义. *解放军医学杂志* 2003; 28: 249-251
- 13 刘婧, 李兆申, 许国铭, 宛新建, 王雯. 细胞凋亡和增殖在大鼠应激性溃疡发病中的作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 595-598
- 14 Kleine TO, Zwerenz P, Graser C, Zofel P. Approach to discriminate subgroups in multiple sclerosis with cerebrospinal fluid (CSF) basic inflammation indices and TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8. *Brain Res Bull* 2003; 61: 327-346
- 15 Kleine TO, Zwerenz P, Zofel P, Shiratori K. New and old diagnostic markers of meningitis in cerebrospinal fluid (CSF). *Brain Res Bull* 2003; 61: 287-297
- 16 Siddique MS, Fernandes HM, Wooldridge TD, Fenwick JD, Slomka P, Mendelow AD. Reversible ischemia around intracerebral hemorrhage: a single-photon emission computerized tomography study. *J Neurosurg* 2002; 96: 736-741
- 17 Dziedzic T, Bartus S, Klimkowicz A, Motyl M, Slowik A, Szczudlik A. Intracerebral hemorrhage triggers interleukin-6 and interleukin-10 release in blood. *Stroke* 2002; 33: 2334-2335
- 18 Santucci L, Fiorucci S, Di Matteo FM, Morelli A. Role of tumor necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 393-401
- 19 张伟, 吴本俨, 王孟薇. 小剂量阿司匹林胃黏膜损伤与 TNF- α 的表达分析. *北京医学* 2004; 26: 186-188
- 20 李文英, 张祥建, 胡书超, 张丽英, 李海燕. 实验性大鼠脑出血后 TNF- α 、ICAM-1 的表达和脑水肿的研究. *脑与神经疾病杂志* 2005; 13: 456-458
- 21 李春艳, 张莹, 崔泽实, 卢瑶, 于明. 幼鼠肠缺血/再灌注损伤肠组织 TNF- α 和 c-fos mRNA 的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1631-1634
- 22 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1303-1306
- 23 马强, 张方信, 张振书. 幽门螺杆菌相关性胃炎活动性与 TNF- α , EGF 的相关性. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2190-2192
- 24 彭毅志, 袁志强, 肖光夏. 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 982-985
- 25 张伟, 吴本俨, 尤纬缔. 药物性胃粘膜损伤大鼠 ICAM-1 及 TNF- α 表达的研究. *解放军医学杂志* 2001; 26: 358-360
- 26 余崇林, 孙蔚亮, 秦大莲. TNF- α 在重症胰腺炎大鼠肺组织内的表达及与肺损伤关系的实验研究. *解剖与临床* 2006; 11: 24-27
- 27 聂海岭, 方树友, 王建平, 李庆军. 大鼠脑缺血再灌注损伤后血清中 TNF- α 变化及雷公藤多甙的影响. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 40-41
- 28 Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Brunori PM, Di Matteo FM, Morelli A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 1994; 35: 909-915
- 29 Douzinas EE, Tsidemiadou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, Sfyas D, Malagari K, Roussos C. The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 53-59

电编 张敏 编辑 张焕兰

转铁蛋白阿霉素脂质体的制备及其对人肝癌细胞系的杀伤活性

秦历杰, 刘占举

秦历杰, 河南省人民医院急诊科 河南省郑州市 450003
刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. zhanjuli@yahoo.com
电话: 0371-63939084
收稿日期: 2006-11-03 接受日期: 2007-03-06

Preparation of adriamycin liposome coupled with HTf(Fe)₂ and its anti-tumor activity on human hepatoma cell line SMMC-7721

Li-Jie Qin, Zhan-Ju Liu

Li-Jie Qin, Department of Emergency Management, He'nan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, He'nan Province, China
Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China
Correspondence to: Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China. zhanjuli@yahoo.com
Received: 2006-11-03 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To modify the adriamycin (ADM) liposome with transferrin HTf(Fe)₂ according to the difference of receptor or antigen expression between tumor cells and normal cells, and study its efficacy of anti-tumor activities on human hepatoma cell line SMMC-7721.

METHODS: Cross-linking reagent (SPDP) reacting with human transferrin HTf(Fe)₂ was utilized, and liposomes coupled with transferrin [named as HTf(Fe)₂-ADM-liposome] were prepared. Then human hepatoma cell line SMMC-7721 was treated with different concentrations of HTf(Fe)₂-ADM-liposome and MTT assay was used to the killing effect on SMMC-7721 cells.

RESULTS: The success rate of HTf(Fe)₂ coupling with liposomes was 73.5%. Electron mi-

croscopy showed no significant difference in the diameters between HTf(Fe)₂-ADM-liposome and ADM-liposome (56 ± 38 nm vs 54 ± 30 nm, $P < 0.05$). Modification and coupling didn't affect the activity of HTf(Fe)₂. The specific cytotoxicities of HTf(Fe)₂-ADM-liposome, ADM-liposome and free ADM on SMMC-7721 cells were 64.52%, 22.12% and 37.82%, respectively, and there were marked difference between the former and the latter two ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The anti-tumor activity of HTf(Fe)₂-ADM-liposome on SMMC-7721 cells *in vitro* shows a high potency and specificity and a minimal dosage is able to achieve this effect.

Key Words: Transferrin; Liposome; Target effect; Hepatocellular carcinoma; Adriamycin

Qin LJ, Liu ZJ. Preparation of adriamycin liposome coupled with HTf(Fe)₂ and its anti-tumor activity on human hepatoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1441-1445

摘要

目的: 利用正常肝细胞和肝癌细胞表面转铁蛋白受体以及亲和力的差异, 用转铁蛋白修饰脂质体, 使脂质体具有导向肝癌细胞的靶向性, 分析其对肝癌细胞系的杀伤作用。

方法: 超声法制备阿霉素脂质体, 暴露脂质体上的巯基, 然后用双功能交联剂N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)交联HTf(Fe)₂和脂质体, 制备成HTf(Fe)₂-阿霉素脂质体。用MTT法分析HTf(Fe)₂-阿霉素脂质体对人肝癌细胞系SMMC-7721的杀伤力。

结果: 实验检测HTf(Fe)₂与脂质体的交联率为73.5%, 电镜观察修饰后的脂质体呈单层状, 平均直径 56 ± 38 nm, 未用HTf(Fe)₂修饰的脂质体直径平均为 54 ± 30 nm, 两者无显著差异。SPDP修饰和脂质体交联不影响HTf(Fe)₂的活力。MTT法分析发现, 当浓度为0.10 mg/L时HTf(Fe)₂阿霉素脂质体、无HTf(Fe)₂阿霉素脂

■背景资料

脂质体作为抗肿瘤药物的载体治疗肿瘤研究较多, 近年来研究发现, 肿瘤组织尤其消化道肿瘤转铁蛋白受体的含量较高。应用转铁蛋白修饰脂质体表面用脂质体作为载体使抗肿瘤药物更好的靶向肿瘤研究尚未见报道。用交联剂交联蛋白质和脂质体方法很多, 但传统方法导致蛋白质活性受影响, 且交联率低, 这一难题亟待解决。

■创新盘点

由于带双铁的 HTf(Fe)₂ 在酸性条件下铁离子易失去, 无铁转铁蛋白与受体的结合力降低, 本试验先暴露脂质体上的巯基, 用双功能交联剂 SPDP 交联 HTf(Fe)₂ 制成 HTf(Fe)₂-脂质体, 保证了 HTf(Fe)₂ 完整性以便更好的导向。

质体及游离阿霉素对肝癌细胞的杀伤率分别为 64.52%, 22.12% 和 37.82%, 前一组与后两组之间有显著差异 ($P < 0.05$)。

结论: HTf(Fe)₂ 阿霉素脂质体体外杀伤肝癌细胞系 SMMC-7721 具有用药量小、高效、特异性强等优点, 为体内应用治疗肝癌提供了实验依据。

关键词: 转铁蛋白; 脂质体; 靶向作用; 肝细胞癌; 阿霉素

秦历杰, 刘占举. 转铁蛋白阿霉素脂质体的制备及其对人肝癌细胞系的杀伤活性. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1441-1445
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1441.asp>

0 引言

近年来发现转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)在消化道肿瘤如肝癌、食管癌、胃癌及结肠癌^[1-3]组织中表达升高. TfR 为肿瘤细胞生长所必需, 不易发生抗原调变和基因丢失, 且血液中几乎无游离成份, 故 TfR 在消化道肿瘤靶向性治疗是一种理想的靶抗原^[4]. 转铁蛋白(transferrin, Tf)是 TfR 的配体, 利用正常细胞和癌细胞表面 TfR 的差异, 用 Tf 修饰脂质体, 使脂质体具导向癌细胞的高度靶向性. 通过受体介导的胞吞作用^[5]能特异性导向药物到细胞内发挥生物效应. 本文制备转铁蛋白脂质体同时加入抗肿瘤药物阿霉素, 合成转铁蛋白阿霉素脂质体, 进行抗人肝癌细胞系 SMMC-7721 的实验研究, 旨在为转铁蛋白阿霉素脂质体的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 双铁人转铁蛋白[HTf(Fe)₂]; 二巯代蔗糖醇(DTT); 异型双功能交联剂 N-羧琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)均为 Sigma 产品; 柱层析用硅胶 100-140 目, 上海五四化学试剂厂产品; 薄层层析用硅胶 GF²⁵⁴, 德国 Merk 公司产品; 葡聚糖凝胶 Sepharose 4B, Sephadex G-50 为 Pharmacia 产品进口分装; RPMI1640 培养基, 德国 Gibco 公司产品; 小牛血清(FCS), 杭州四季青生物工程材料研究所产品; 阿霉素(adriamycin, ADM), 意大利 Farmitalia Carlo ER-BA 产品; 层析柱($\phi 1 \times 30$ cm), 郑州大学玻璃仪器厂制; Beckman DU Series-70 型紫外分光光度计(美国); 二氧化碳培养箱, 日本 Alscoc 公司. 人肝癌细胞株 SMMC-7721 引自北京大学第一临床医学院消化研究室; 小鼠 B₁₂ 黑色素瘤细胞系, 引自河南省医

学科学研究所。

1.2 方法

1.2.1 薄层层析(TLC)板的制作和色谱柱的装填 取 GF²⁵⁴ 硅胶 10 g 加蒸馏水 20 mL, 调成糊状物, 手摆法平铺在 5 张载玻片上室温凉干, 在烘箱中渐渐升温, 维持 105-110℃ 活化 30 min, 放置干燥器中备用. 用时取出在离一端 1 cm 处画线, 在画线上点样, 放置于展开剂中展开, 记下展开剂前沿位置, 凉干后用三用紫外灯在 254 nm 处观察样本移动位置, 计算 R_f 值。

硅胶柱层析制作: 取一支 $\phi 1 \times 30$ cm 的色谱柱, 在底部平铺一层玻璃丝棉, 在丝棉上盖一张滤纸, 将溶剂装入柱内约为柱高四分之三, 将柱层析用硅胶和溶剂调成糊状慢慢倒入柱中, 打开柱下端活塞, 控制流出速度为 1 滴/s. 当装入量约为柱高四分之三时, 再在上面加盖一层滤纸, 然后加样洗脱。

1.2.2 蛋白质含量的测定 配制标准蛋白质溶液, 制作标准曲线求回归方程, 测定样品蛋白质含量。

1.2.3 有机磷测定法 配制磷标准液制作标准曲线, 求回归方程, 由标准曲线求出样本含量。

1.2.4 HTf(Fe)₂ 阿霉素脂质体的制备及其特性^[6]

(1) SPDP 修饰 DOPE 36 mg DOPE(0.048 mmol)用氮气除去有机溶剂, 加 3 mL 含 5 μ mol 三乙胺, 25 mg SPDP(0.095 mmol)的无水甲醇, 吹氮气去氧, 25℃ 反应 5 h. 经 TLC 木工检测后, 减压蒸馏除去甲醇, 然后溶于 5 mL 氯仿. 上硅胶柱层析, 先用 120 mL 氯仿洗脱, 然后依次用 20 mL 40 : 1, 30 : 1, 20 : 1, 15 : 1 的氯仿: 甲醇, 100 mL 10 : 1 的氯仿: 甲醇和 50 mL 5 : 1 的氯仿: 甲醇洗脱液洗脱, 合并, 减压蒸馏浓缩得 DOPE-PDP, 定磷, -80℃ 保存. (2) SPDP 修饰 HTf(Fe)₂ HTf(Fe)₂ (1 mol)溶于 2 mL 含 0.15 mol/L NaCl 的 PBS 中(pH 7.4). 取 1.065 mg SPDP(4 mmol)溶于 80 mL 无水乙醇. 在搅拌下, 将 SPDP 滴加入 HTf(Fe)₂ 溶液中, 23℃ 反应 40 min 离心超滤 4 次除去未反应 SPDP 和其他小分子物质, 得 HTf(Fe)₂-PDP. 定蛋白量, 4℃ 保存. (3) 阿霉素脂质体制备 取 10 mg 卵磷脂(PC), 4 mg 胆固醇(Chol)和 0.6 mg DOPE-PDP 于灯泡瓶中氮气吹干一部分有机溶剂, 在旋转蒸发器上蒸去剩余溶剂, 使均匀形成一层脂膜. 加入 1 mL 2 g/L 阿霉素溶液, 旋涡震荡 30 min, 再在 CSF-1A 型探头或超声仪上超声粉碎 30 min, 直至形成均匀的上清液. 在 4000 g 离心机上离心 10 min, 上清液即为小单层阿霉素脂质体-PDP, 超声前后立即取样在倒置显微镜下观察脂质体大小、形

态、层数变化. 空白脂质体由10 mg PC和4 mg Chol, 用1 mL含0.15 mol/L NaCl的PBS(pH7.4)代替阿霉素溶液按上法制备. (4)HTf(Fe)₂阿霉素脂质体制备 0.5 mg阿霉素脂质体-PDP中加入等体积0.1 mol/L DTT(配于含有0.15 mol/L NaCl的PBS液中, pH7.4), 室温反应20 min, 离心, 过Spharose 4B柱, 得脂质体-SH, 再加入0.5 mg等体积的HTf(Fe)₂-PDP, 搅拌下室温交联反应过夜. 离心过Spharose 4B柱, 得HTf(Fe)₂阿霉素脂质体.

1.2.5 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体HTf(Fe)₂活性检测 制备¹²⁵I-HTf(Fe)₂和增溶入胎盘TfR^[7], 比较HTf(Fe)₂阿霉素脂质体上的HTf(Fe)₂对¹²⁵I-HTf(Fe)₂与人胎盘TfR结合抑制率同游离HTf(Fe)₂对¹²⁵I-HTf(Fe)₂与人胎盘TfR结合抑制率.

1.2.6 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体中阿霉素含量和包封率测定 制作阿霉素含量测定标准曲线, 求出回归方程. 根据阿霉素在232 nm处有最大吸收, 选232 nm为测定波长, 取1 mL HTf(Fe)₂阿霉素脂质体由标准曲线求出阿霉素含量. 考察脂质体凝胶柱流出曲线, 测定 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体中阿霉素包封率^[7].

1.2.7 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体体外细胞毒试验 取人肝癌细胞系SMMC-7721及小鼠B₁₆黑色素瘤细胞系(1×10⁸/L), 加在96孔培养板上, 每孔0.1 mL, 加入HTf(Fe)₂阿霉素脂质体、无HTf(Fe)₂阿霉素脂质体、游离阿霉素溶液及培养液(作为对照)共4组. 阿霉素浓度每组设6个, 分别为20, 10, 5, 1, 0.1, 0.01 kg/L, 37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养48 h后加MTT(5 g/L)、20 μL/孔过4 h吊篮离心弃上清, 加甲潜溶液(20 g SDS溶于500 g/L DMF溶液100 mL配制)溶解深蓝色结晶物, 每孔100 μL, 振荡10 min, 放置1 h后在DG3022酶标仪上测A值, 计算杀伤率. 按照上述方法使用B₁₆黑色素瘤细胞作对照重复上述试验, 加药物后孵育0.5 h, 用培养液洗去药物后继续培养48 h, 用MTT法计算杀伤率^[8].

统计学处理 实验数据以均数加减标准差(mean±SD)表示, 组间采用 t 或 t' 检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体制备及其特性 DOPE与SPDP反应生成DOPE-PDP, TLC检测其R_f = 0.51. 碘蒸气显色呈棕黄色, 该点茛三酮不显色, DOPE R_f值为0.49, 碘蒸气显棕黄色, 茛三酮显色呈紫蓝色. DOPE-PDP中磷含量为0.03 g/g,

DOPE磷含量为0.71 g/g. HTf(Fe)₂的蛋白质含量为0.98 g/g, 制备小单层阿霉素脂质体电子显微镜下观察, 脂质体为单层状, 其直径大小为54±30 nm, 空白脂质体, 其形态同阿霉素脂质体, 直径大小为52±28 nm. HTf(Fe)₂阿霉素脂质体的电镜图, 呈单层状, 大小均匀, 直径约为56±38 nm, 蛋白质含量为0.47 g, HTf(Fe)₂与阿霉素脂质体的交联率为73.50%. HTf(Fe)₂空白脂质体的交联率为76.50%.

2.2 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体HTf(Fe)₂活性检测 HTf(Fe)₂及HTf(Fe)₂阿霉素脂质体以含HTf(Fe)₂ 0.05 g/L时对¹²⁵I-HTf(Fe)₂与人胎盘TfR结合抑制率分别为75.00%±2.17%和75.19%±1.91%, HTf(Fe)₂阿霉素脂质体与HTf(Fe)₂组相比 $P > 0.05$ ($t = 0.15$), 表明SPDP的修饰和与脂质体交联不影响HTf(Fe)₂的活性.

2.3 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体中阿霉素含量和包封率测定 阿霉素含量测定的回归方程为 $Y = 0.51 + 107.53X$, 相关系数 $r = 0.99$, Y 为阿霉素微克数, X 为A值. 以2 g/L阿霉素浓度配制的HTf(Fe)₂阿霉素脂质体阿霉素含量为0.12 g/L. 阿霉素脂质体中阿霉素的包封率为6.89%; HTf(Fe)₂阿霉素脂质体中阿霉素的包封率为6.10%.

2.4 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体的体外细胞毒试验 HTf(Fe)₂阿霉素脂质体, 阿霉素脂质体和游离阿霉素对肝癌细胞株SMMC-7721的杀伤率, 随着浓度的降低, 杀伤率随之降低, 当浓度为0.10 mg/L时3组杀伤率分别为64.52%, 22.12%和37.82%, 表明HTf(Fe)₂阿霉素脂质体组对肝癌细胞的杀伤力明显优于后两组的杀伤力($P < 0.01$). 上述3组对B₁₆黑色素瘤细胞的48 h细胞毒试验结果, 在相同浓度下对细胞杀伤力无显著性差异.

0.5 h预处理细胞毒试验: HTf(Fe)₂阿霉素脂质体组, 阿霉素脂质体和游离阿霉素组对肝癌细胞SMMC-7721的杀伤率, 当浓度较低时, 如0.01 mg/L, HTf(Fe)₂阿霉素脂质体组仍保持较强杀伤肝癌细胞能力(杀伤率为32.41%), 而阿霉素脂质体和游离阿霉素组仅为8.16%和4.80%, 从杀伤力结果看前者是后二者的3.97倍和6.75倍; 3组对B₁₆黑色素瘤细胞0.5 h细胞毒作用检测结果, 游离阿霉素具有较强杀细胞作用, HTf(Fe)₂阿霉素脂质体组和阿霉素脂质体杀伤作用无明显差异.

3 讨论

脂质体包裹抗肿瘤药物较游离抗肿瘤药物具有

■应用要点

本试验研究通过转铁蛋白阿霉素脂质体的制备, 以及对肝癌细胞系SMMC-7721的细胞毒试验, 表明HTf(Fe)₂阿霉素脂质体对表面有较多TfR的人肝癌细胞具有靶向杀伤性, 为肿瘤的治疗提供了一条有效途径.

■名词解释

N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP): 是一种双功能交联剂, 交联蛋白和脂质体, 可提高HTf(Fe)₂与脂质体的交联率, 操作方便, 重复性好, 是一种理想的交联剂。

明显的缓释作用和靶向作用, 穿越细胞膜屏障, 降低抗肿瘤药物的毒性作用, 保护肿瘤药物免受酶、免疫及其他生理环境破坏和增加耐药细胞的敏感性等优点。最显著特点是以脂质体作为载体后, 在保持甚至增加抗肿瘤药物临床疗效前提下, 由于改变了药物的药代动力学及药物在组织中分布, 使药物的毒性作用, 特别对生命器官的毒性作用显著降低, 这就为进一步扩大用药的范围提供了可能。影响脂质体在体内靶向性因素主要有脂质体大小、成份、表面电荷、流动性等。目前研究最多是使脂质体表面结合上某些识别分子, 提高靶向治疗^[9-10]。

我们采用异型双功能交联剂SPDP, 发现HTf(Fe)₂与脂质体交联率达73.5%, 测得HTf(Fe)₂活性不受影响, 且操作方便, 重复性好, 故SPDP是一种理想的交联剂。选择卵磷脂作为脂质体主要成份, 可减低脂膜流动性, 这种固相脂质体可最大限度保证HTf(Fe)₂插入脂双层的效率, 加入胆固醇可显著增加脂质体在生物体内稳定性, 减少脂膜流动性, 防止脂质体内包裹物的渗漏^[11]。比较游离HTf(Fe)₂和HTf(Fe)₂-脂质体对¹²⁵I-HTf(Fe)₂与人胎盘TfR结合的竞争抑制发现, HTf(Fe)₂-脂质体中的HTf(Fe)₂与游离HTf(Fe)₂比较无显著差异, 表明SPDP的修饰和与脂质体交联不影响HTf(Fe)₂的活力。阿霉素是由放射菌发酵液中提取的一种具有广谱抗癌作用的糖甙类抗生素。用脂质体作为他的载体后, 不仅能增强抗肿瘤活力, 而且可改变其药代动力学和体内分布, 从而显著的减少心脏毒性作用, 扩大治疗范围^[12-13]。

TfR在肝癌的导向治疗中是一种理想的靶抗原治疗^[14-15], 我们用HTf(Fe)₂修饰的脂质体杀伤肝癌细胞的能力明显优于无HTf(Fe)₂阿霉素脂质体和游离阿霉素, 对非靶细胞B₁₆黑色素瘤细胞三者接近。因此TfR在肝癌的导向治疗中是一种理想的靶抗原。HTf(Fe)₂阿霉素脂质体体外杀瘤作用特点是减少用药剂量, 48 h细胞毒试验表明HTf(Fe)₂阿霉素脂质体对人肝癌细胞系7721的杀伤力较无HTf(Fe)₂阿霉素脂质体和游离阿霉素明显提高。HTf(Fe)₂与受体的结合引起细胞内化作用, 从而促进阿霉素进入细胞, 增强其对细胞的杀伤力, 对含TfR较少的B₁₆黑色素瘤细胞的杀伤力(IC₅₀0.0.71ug/Ml)明显低于对SMMC-7721细胞的杀伤力, HTf(Fe)₂阿霉素脂质体与无HTf(Fe)₂阿霉素脂质体及游离阿霉素比较对B₁₆细胞杀伤力无明显变化, 表明HTf(Fe)₂阿

霉素脂质体对表面较多TfR的肝癌细胞具有靶向性。

本研究提示, HTf(Fe)₂脂质体作为药物导向载体具有以下特点: (1)分子大小适中, 可通过肝脏内一系列生物学屏障, 把药物送到肝细胞; (2)选择性较高, 具有靶向TfR的肿瘤特异性和主动转运入细胞能力; (3)载药量比较大, 可以把有效治疗量的药物带到靶细胞而不丧失配体特异性; (4)没有免疫原性, 自身无毒, 可生物降解, 不影响药物的作用; (5)稳定性较好, 可大量制备。因此, HTf(Fe)₂修饰的药物脂质体具有广泛的临床前景。

4 参考文献

- 1 沈霞, 林菊生, 孔心涓. 腺病毒增强转铁蛋白受体介导的针对突变型p53的大酶转染可促进肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1539-1542
- 2 Smith TA, Perkins AC, Walton PH. 99mTc-labelled human serum transferrin for tumour imaging: an *in vitro* and *in vivo* study of the complex. *Nucl Med Commun* 2004; 25: 387-391
- 3 Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Buchler MW, Schmidt J. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1418-1422
- 4 吴志坚, 张永学. 裸鼠中人肝细胞癌转铁蛋白受体的分子显像研究. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 96-98
- 5 张豪, 沈明山, 方宏清, 王明刚, 陈惠鹏. 转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的药物运输. 中国生物工程杂志 2004; 24: 1-5
- 6 赵莉霞, 颜冰, 黄培堂. 转铁蛋白受体及其在药物运输中的作用. 生命的化学 2004; 24: 468-469
- 7 王坚成, 刘晓岩, 吕万良, Lee HS, Goh BC, 张强. 新型阿霉素抗耐药性隐形脂质体的体外细胞毒和体内毒性研究. 药理学报 2005; 40: 475-480
- 8 Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, Sonoue H, Matsumoto T, Sasai K, Tsurumaru M. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor enhances radiosensitivity of esophageal cancer cell lines expressing HER-2/neu oncoprotein. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 203-211
- 9 Altin JG, Parish CR. Liposomal vaccines-targeting the delivery of antigen. *Methods* 2006; 40: 39-52
- 10 张阳德, 刘鑫, 彭健. 5-氟尿嘧啶磁性脂质体纳米粒在大鼠体内药代动力学研究. 中国现代医学杂志 2006; 16: 1772-1774, 1778
- 11 Hartel S, Diehl HA, Ojeda F. Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem* 1998; 258: 277-284
- 12 Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 463-478
- 13 Bakker-Woudenberg IA, ten Kate MT, Guo L, Working P, Mouton JW. Ciprofloxacin in polyethylene glycol-coated liposomes: efficacy in rat models

- of acute or chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2575-2581
- 14 刘波, 方国安, 金秀国, 刘晓光, 庄晓玲, 方汉波. 乳腺癌细胞DNA分析和转铁蛋白受体表达与化疗药物敏感性的关系. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 193-195
- 15 曹利民, 王骞, 潘宇红, 陈蓉芳, 卢志贤, 马志兰, 祝建中, 沈关心. 转铁蛋白受体介导的肝癌靶向性HSV-tk/GCV系统的构建及体外效应研究. *南通医学院学报* 2003; 23: 127-129

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

本试验设计合理, 结果正确, 探索了新功能交联剂SPDP交联蛋白质和脂质体, 制备了具有靶向性的HTf(Fe)₃阿霉素脂质体, 使抗肿瘤药物能有效的靶向肿瘤细胞。

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 18th 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 13th Annual International Congress
20-23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilt.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
27-30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation
10 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology
11-12 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

人食管癌组织中 β_1 -整合素mRNA的表达及其意义

张军, 张文君, 郭家龙, 林意, 原野

■背景资料

食管癌是常见的恶性肿瘤, 尤其是我国鄂西北一带是该病的高发区, 病因还不清楚, 他的侵袭和转移是导致手术、放疗、化疗等治疗效果不佳和患者死亡的最主要原因。近年研究显示: 食管癌的发生、发展涉及多个基因、分子水平的异常, 是多个因素参与共同作用的结果。整合素作为黏附分子中一类跨膜蛋白, 是肿瘤细胞实现细胞与基质黏附的重要受体, 可通过改变肿瘤细胞黏附性、调控肿瘤细胞凋亡和血管形成而影响其侵袭转移。本研究结果与李娜 *et al* 的研究结果不同, 可能是实验所用方法不同, 但都提示 β_1 -integrin与食管癌的发生、发展及淋巴结转移密切相关。

张军, 张文君, 郭家龙, 林意, 原野, 郟阳医学院附属太和医院胸心外科 湖北省十堰市 442000
通讯作者: 张文君, 442000, 湖北省十堰市, 郟阳医学院附属太和医院超声科. pulushi68@126.com
电话: 0719-8801336
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-01-31

Expression and significance of β_1 -integrin mRNA in human esophageal cancer

Jun Zhang, Wen-Jun Zhang, Jia-Long Guo, Yi Lin, Ye Yuan

Jun Zhang, Wen-Jun Zhang, Jia-Long Guo, Yi Lin, Ye Yuan, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Affiliated Taihe Hospital of YunYang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Correspondence to: Wen-Jun Zhang, Department of ultrasonography, the Affiliated Taihe Hospital of YunYang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China. pulushi68@126.com
Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-01-31

Abstract

AIM: To investigate the expression of β_1 -integrin in human esophageal carcinoma and its correlation with clinical pathology.

METHODS: The expression of β_1 -integrin mRNA was detected in 30 cases of esophageal carcinoma and cancer-adjacent tissues by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The expression of β_1 -integrin mRNA in esophageal carcinoma tissues was significantly higher than that in the normal esophageal tissues (1.205 ± 0.379 vs 0.470 ± 0.166 , $P = 0.003$), and it was also markedly higher in the cases with metastasis than that in the ones without metastasis (1.534 ± 0.229 vs 0.998 ± 0.160 , $P = 0.023$). With the elevation of histological grading, the expression of β_1 -integrin mRNA was also increased.

CONCLUSION: β_1 -integrin may play an important role in the malignant biological behavior of esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal carcinoma; β_1 -integrin; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhang J, Zhang WJ, Guo JL, Lin Y, Yuan Y. Expression and significance of β_1 -integrin mRNA in human esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1446-1448

摘要

目的: 研究 β_1 -整合素(β_1 -integrin)在人食管癌组织中的表达及其与食管癌的临床病理关系。

方法: 采用RT-PCR方法检测30例人食管癌组织及癌旁正常食管组织中 β_1 -integrin的表达。

结果: 食管癌组织及癌旁正常食管组织中都有不同程度 β_1 -integrin的表达, 并且前者明显高于后者(1.205 ± 0.379 vs 0.470 ± 0.166 , $P = 0.003$); 伴有淋巴结转移者食管癌组织 β_1 -integrin表达量明显高于无转移者(1.534 ± 0.229 vs 0.998 ± 0.160 , $P = 0.023$)。随食管癌分期增高, β_1 -integrin mRNA表达量也不断增高。

结论: β_1 -integrin可能在食管癌细胞的恶性生物学行为中具有重要的作用。

关键词: 食管癌; β_1 -整合素; 逆转录-聚合酶链式反应

张军, 张文君, 郭家龙, 林意, 原野. 人食管癌组织中 β_1 -整合素mRNA的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1446-1448
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1446.asp>

0 引言

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人们的健康, 且早期诊断率低、生存期短、预后差。食管癌的发生、发展涉及多个基因、分子水平的异常, 是多个因素参与共同作用的结果。在肿瘤侵袭进程中, 必须完成3个过程: 黏附细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白质, 降解ECM生长, 离开ECM转移到别处。整合素作为黏附分子中一类跨膜蛋白, 是肿瘤细胞实现细胞与基质黏附的重要受体, 可通过改变肿瘤

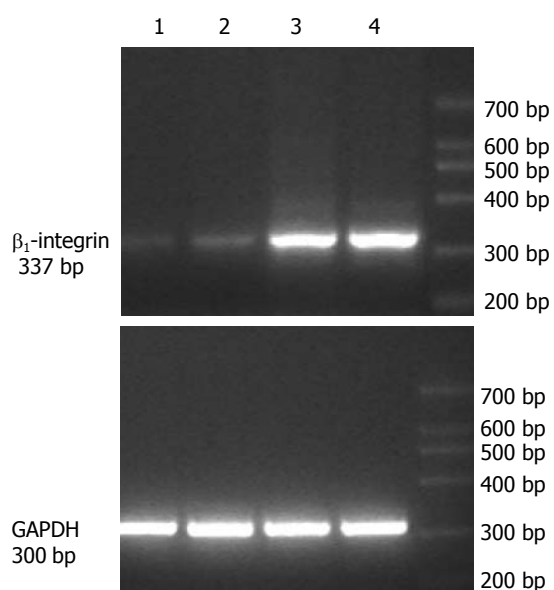


图1 β_1 -integrin mRNA的表达. 1-2: 癌旁正常组织; 3-4: 癌组织.

细胞黏附性、调控肿瘤细胞凋亡和血管形成而影响其侵袭转移^[1]. 现已证实不同特定的整合素受体与多种癌症发病及侵袭、转移有关. 我们用RT-PCR方法检测了 β_1 -integrin mRNA在食管癌组织中的表达, 以探讨 β_1 -integrin与食管癌发生、发展和转移等特性之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2002-05/2006-05期间郧阳医学院附属太和医院胸外科手术切除的食管癌组织标本30例, 患者年龄为44-70(平均57.16)岁, 其中男28例, 女2例, 术前均未经放化疗. 所有标本经病理学检查确诊为食管鳞状细胞癌. 临床分期依照国家抗癌联盟TNM分期标准. 每例标本均于术后30 min内采集食管癌组织及周围正常食管组织(距肿瘤边缘>5 cm)并立即放入液氮中保存. TRIzol试剂盒、逆转录试剂盒均购自美国Invitrogen公司; 紫外分光光度计产自Beckman公司; PCR仪及凝胶成像系统为Bio-Rad公司.

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA提取及浓度测定 取液氮保存的食管癌配对标本(癌组织和癌旁正常组织), 按TRIzol试剂盒说明书提取总RNA, DEPC水溶解, 紫外分光光度计进行纯度和浓度检测.

1.2.2 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 β_1 -integrin mRNA表达 按照试剂盒说明书步骤(Fermentas #k1622)将所提RNA逆转录成cDNA, 4℃保存, 用于PCR反应. 引物设计:

表1 食管癌组织 β_1 -integrin mRNA表达

类别	n	β_1 -integrin mRNA)
癌旁正常组织	30	0.470 ± 0.166^a
癌组织	10	1.205 ± 0.379

^a $P < 0.01$ vs 癌组织.

β_1 -integrin上游引物: 5'-AATGAAGGGCGTGTTGGTAG-3'; 下游引物: 5'-CGTTGCTGGCTTCACAAGTAC-3'; 扩增片段为337 bp. 选入GAPDH为内参, 上游引物: 5'-CGCGGGCTCTCCAGAACATCAT-3'; 下游引物: 5'-CCAGCC-CCAGCGTCAAAGGTG-3'; 扩增片段为300 bp. 反应条件: 94℃预变性4 min, 94℃变性1 min, 59℃退火1 min, 72℃延伸30 s, 循环27次. 扩增的cDNAs进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 通过灰度扫描比较 β_1 -integrin和内参GAPDH的相对表达量.

统计学处理 数据采用SPSS11.5统计软件进行处理, 所得数值以均数±标准差(mean±SD)表示, 组间比较采用方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 食管癌组织 β_1 -integrin mRNA表达 SO 30例食管癌和癌旁正常组织中 β_1 -integrin PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果见图1. 经灰度扫描分析后, 测得各期 β_1 -integrin PCR产物定量值见表1. 统计分析提示, 食管癌组织中 β_1 -integrin mRNA表达水平明显高于癌旁正常食管组织, 两者之间差异有统计学意义($P < 0.05$).

2.2 β_1 -integrin mRNA的表达与食管癌转移及分期 伴有淋巴结转移者 β_1 -integrin mRNA的表达高于无转移者($P < 0.05$). 随食管癌分期增高, β_1 -integrin mRNA表达量也不断增高(表2).

3 讨论

肿瘤细胞的浸润及转移是十分复杂的生物学现象, 重要环节之一是瘤细胞与细胞外基质相互作用, 脱离原发灶并与正常细胞相互作用, 其中细胞黏附是关键. 在恶性肿瘤侵袭转移过程中肿瘤细胞表达的多种细胞黏附分子起着极其重要的作用^[2]. 整合素(integrins)是黏附分子中由 α 和 β 两个亚基组成的以非共价键连接成异二聚体的一类跨膜糖蛋白, 主要介导细胞与细胞外

■同行评价

本文研究了人食管癌组织中 β_1 -整合素mRNA的表达及其意义. 文章选题新颖, 方法先进, 结果可信, 有较高实际意义.

表 2 食管癌组织 β_1 -integrin mRNA的表达与临床病理特征的关系

临床病理类型	<i>n</i>	β_1 -integrin mRNA
淋巴结转移		
无	5	0.998 ± 0.160
有	25	1.534 ± 0.229 ^a
组织分级		
I	5	0.704 ± 0.102
II	20	1.298 ± 0.492 ^c
III	5	1.993 ± 0.611 ^d

^a $P < 0.05$ vs 无淋巴结转移组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs I型组。

基质的黏附, 研究表明, β_1 亚基分别与 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αV 等亚基组合构成整合素分子, 与其配体IV型胶原蛋白、纤连蛋白和层黏连蛋白等结合, 调节细胞的多种功能及肿瘤细胞的侵袭转移^[3]。目前对 β_1 -integrin在肝癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、直肠癌等上的研究较多^[4-8], 发现 β_1 -integrin的表达与这些肿瘤的侵袭、转移、预后都不同程度相关, 但对其与食管鳞癌的关系报道相对较少。本研究结果表明, β_1 -integrin在人食管鳞癌组织中表达高于癌旁正常组织, 在有淋巴结转移与无淋巴结转移组其表达率亦存在差异, 随着组织分期的增高, β_1 -integrin表达进一步增高。这一点与李娜 *et al*^[9]的研究结果不同, 可能是实验所用方法不同, 但都提示 β_1 -integrin与食管鳞癌的发生、发展及淋巴结转移密切相关。整合素和ECM蛋白相互作用为细胞黏附提供“抛锚点”的同时, 也起始了调解细胞黏附和迁移的信号传导, 行使了整合素“由外到内”(outside-in)的信

号传导功能; 有研究发现, β_1 -integrin和PI3K/Akt信号通路是IGF-1诱导的人的骨髓瘤细胞黏附和迁移的关键调节因子^[10], 而 β_1 -integrin又是通过什么机制调节食管鳞癌的侵袭、转移还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Parise LV, Lee J, Juliano RL. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 407-414
- 2 Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. *J Clin Pathol* 2005; 58: 343-351
- 3 Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res* 2002; 107: 305-329
- 4 王旦, 黄智铭, 黄磊, 吴建胜, 陈向荣, 徐昌隆, 陈民新, 韩清锡. 肝细胞肝癌组织中整合素 α_6 及 β_1 mRNA的表达研究. *中华内科杂志* 2006; 45: 582-583
- 5 黄涛, 秦仁义, 裘法祖. 胰腺癌组织中蛋白激酶C α 、整合素 $\beta 1$ 的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2005; 40: 1096-1098
- 6 贾慧, 郭其森, 韩明勇. 整合素 $\alpha_5\beta_1$ 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 593-595
- 7 靳双玲, 常瑞霞, 肖鹏. 整合素 $\alpha_5\beta_1$ 在卵巢上皮性癌中的定性及定量研究. *中国妇幼保健* 2006; 21: 833-836
- 8 李智, 庄竞, 韩广森, 刘永刚, 黄涛. 人结直肠癌组织中E-cadherin、整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2005; 40: 880-882
- 9 李娜, 王洪兴, 王淑秀, 张哲莹, 杨晓煜. 食管鳞癌组织中 $\beta 1$ 整合素的表达及其与生物学行为的关系. *新乡医学院学报* 2006; 23: 139-140
- 10 Tai YT, Podar K, Catley L, Tseng YH, Akiyama M, Shringarpure R, Burger R, Hideshima T, Chauhan D, Mitsiades N, Richardson P, Munshi NC, Kahn CR, Mitsiades C, Anderson KC. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res* 2003; 63: 5850-5858

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度及叶酸与维生素B₁₂浓度变化及相关性

杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕

杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕, 石家庄市第一医院干部病房 河北省石家庄市 050011
河北省科技发展项目, No. 052761543
通讯作者: 杨慧君, 050011, 河北省石家庄市范西路36号, 石家庄市第一医院干部病房. yanghuijun79@126.com
电话: 0311-86919372
收稿日期: 2007-03-01 接受日期: 2007-03-23

Research on the plasma levels of homocysteine, folate and vitamin B₁₂ and their correlations in nonalcoholic fatty liver disease

Hui-Jun Yang, Qian Li, Ling Cui, Yu-Zhong Qian, Wen-Jing Li, Yan Tang

Hui-Jun Yang, Qian Li, Ling Cui, Yu-Zhong Qian, Wen-Jing Li, Yan Tang, Department for Cadre, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Supported by the Science and Technology Development Foundation of Hebei Province, No. 052761543

Correspondence to: Hui-Jun Yang, Department for Cadre, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. yanghuijun79@126.com
China. yanghuijun79@126.com

Received: 2007-3-1 Accepted: 2007-3-23

Abstract

AIM: To explore the plasma levels of homocysteine, folate and vitamin B₁₂ as well as their correlations in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: B-ultrasound examination was performed on 199 individuals, of which 67 cases were confirmed with NAFLD and 132 cases served as controls. The plasma levels of homocysteine, folate and vitamin B₁₂ were tested and their correlations were analyzed.

RESULTS: The plasma level of homocysteine in NAFLD group was higher than that in normal group ($18.64 \pm 11.2 \mu\text{mol/L}$ vs $12.49 \pm 6.4 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), and an inverse linear correlation existed between the plasma levels of homocysteine and folate ($r = -0.381$, $P < 0.01$), either between

the plasma levels of homocysteine and vitamin B₁₂ ($r = -0.561$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: The plasma level of homocysteine is enhanced in NAFLD patients, and hyperhomocysteinemia may be a new risk factor in NAFLD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Homocysteine; Folate; Vitamin B₁₂; Risk factor

Yang HJ, Li Q, Cui L, Qian YZ, Li WJ, Tang Y. Research on the plasma levels of homocysteine, folate and vitamin B₁₂ and their correlations in nonalcoholic fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(12):1449-1452

摘要

目的: 探讨非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)患者同型半胱氨酸浓度、叶酸与维生素B₁₂浓度变化及其关系。

方法: 对199例健康体检人群行B超检查, 其中NAFLD 67例, 正常对照组132例, 分别检测血浆Hcy、叶酸与维生素B₁₂浓度并进行相关性分析。

结果: NAFLD患者血Hcy水平高于正常对照组($18.64 \pm 11.2 \mu\text{mol/L}$ vs $12.49 \pm 6.4 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), 并且Hcy与叶酸、维生素B₁₂呈直线负相关($r = -0.381$, $P < 0.01$; $r = -0.561$, $P < 0.001$)。

结论: NAFLD患者血Hcy增高, 高Hcy血症可能是NAFLD一个新的危险因素。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 同型半胱氨酸; 叶酸; 维生素B₁₂; 危险因素

杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕. 非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度及叶酸与维生素B₁₂浓度变化及相关性研究. 世界华人消化杂志. 2007;15(12):1449-1452
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1449.asp>

0 引言

同型半胱氨酸(Hcy)是必需氨基酸蛋氨酸在人体内代谢的中间产物, 是一种含硫氨基酸, 近年

■背景资料

近年来, 有动物实验表明非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肝窦存在微血栓形成现象, 而基础与临床研究显示同型半胱氨酸(Hcy)是动脉与静脉血栓形成的危险因素。本文旨在研究NAFLD患者中Hcy水平及叶酸和维生素B₁₂浓度, 以探讨其在NAFLD中的临床意义。

同行评价

本文对非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度、叶酸与维生素B₁₂浓度变化及相关性进行研究,内容新颖,有一定的创新性,符合伦理学要求,对非酒精性脂肪肝的病因学有一定的研究意义,并且对临床防治非酒精性脂肪肝提供了新的思路。

表 1 脂肪肝组与对照组Hcy、叶酸及维生素B₁₂水平比较(mean ± SD)

	<i>n</i>	同型半胱氨酸(μmol/L)	叶酸(μg/L)	维生素B ₁₂ (μg/L)
NAFLD组	67	18.64 ± 11.2	17.28 ± 8.66	357.5 ± 117.25
对照组	132	12.49 ± 6.4	17.59 ± 7.01	366.54 ± 145.11
<i>P</i>		<0.01	>0.05	>0.05

来基础与临床研究显示其是动脉与静脉血栓形成的危险因素^[1]。有动物实验表明,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肝窦存在微血栓形成现象^[2],那么Hcy在NAFLD中水平如何鲜见临床报道。本文旨在研究NAFLD患者中Hcy水平及叶酸和维生素B₁₂浓度,以探讨其在NAFLD中的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究入选了2006-03在我院健康体检人群,经B超确诊的脂肪肝患者67人,其中男49人,女18人,年龄45.42 ± 10.99岁。脂肪肝诊断主要依据B超影像图作为诊断依据:肝脏普遍增大,肝包膜光滑,肝实质点状高回声,肝回声强度大于肾回声强度;肝深部回声衰减;肝内回声血管显示不清。上述三项中,具备第1项加第2项或第3项中任何一项即可诊断为脂肪肝。非酒精性脂肪肝诊断标准按照中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性脂肪肝病组2002年修订的诊断标准(折合乙醇摄入量<40 g/wk,持续1 a以上^[3])。病例排除标准:排除心脑血管系统肿瘤疾患,对照组为同期健康体检人群,其中男80人,女52人,年龄44.89 ± 13.34岁。上述两组均未服用叶酸、B族维生素。

对所有入选对象采取空腹(禁食12 h以上)肘静脉血3 mL,注入含抗凝剂EDTA 30 μL的一次性试管中,于2 h内以3000 r/min离心15 min,分离血浆,置于-80℃冰箱保存待测。

1.2 方法 用酶联免疫吸附试验(ELISA方法)测定血浆同型半胱氨酸浓度,使用美国雅培公司Axis-Hcy测定试剂盒;采用免疫化学发光法测定血浆叶酸、维生素B₁₂质量浓度,试剂盒由美国雅培公司提供。严格按试剂盒说明书进行操作。质控指标:用雅培公司提供的标准品作为对照,并对其做稳定性检验,批内及批间变异系数均<5%。

统计学处理 计量资料以均数±标准差表示,采取配对*t*检验及相关分析。统计分析由统计软件SPSS13.0完成,以*P*<0.05为有统计学意义。

表 2 两组血浆Hcy与叶酸、维生素B₁₂相关性比较

	叶酸		维生素B ₁₂	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NAFLD组	-0.381	0.01	-0.561	0.001
对照组	-0.122	0.165	-0.192	0.027

2 结果

NAFLD组与对照组Hcy比较明显增高,且具有统计学意义;而两组之间叶酸及维生素B₁₂水平无统计学差异(表1)。同时对两组分别行Hcy与叶酸及Hcy与维生素B₁₂相关性分析表明:两组血浆Hcy与维生素B₁₂均呈直线负相关,两组比较其中NAFLD组两者间相关性明显;NAFLD组血浆Hcy与叶酸呈直线负相关,对照组血浆Hcy与叶酸相关性不明显。

3 讨论

NAFLD是一种无过量饮酒史致肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积,炎症和纤维化为特征的疾病,其与肥胖、高脂血症的发生密切相关。而理论上讲,肥胖、高脂血症通常存在高凝和低纤维蛋白溶解状态。

范建高 *et al*^[2]研究发现NAFLD大鼠肝窦超微结构有内皮细胞损伤炎症细胞附壁及窦周胶原纤维大量沉积及微血栓形成。提示其发病和微血栓形成有关。Hcy是一种含硫氨基酸,为蛋氨酸的中间代谢产物,即体内蛋氨酸经甲基等一系列反应生成Hcy。当Hcy代谢受阻,Hcy就在细胞内积聚,并进入血液循环导致血中Hcy含量增高,形成高同型半胱氨酸血症。目前较为公认正常值5-15 μmol/L,高于16 μmol/L被认为是高同型半胱氨酸血症。Kang将高同型半胱氨酸血症按浓度分为轻度16-30 μmol/L、中度31-100 μmol/L、重度>100 μmol/L。流行病学及实验室资料表明,血中Hcy水平升高是引发普通人群脑血管、心血管和外周血管疾病的一个重要的独立危险因素^[4-6]。体内实验显示,Hcy可直接造成血管内皮细胞损伤和血管功能异常,可引起

内皮细胞衰老, 自由基产生增多, 一氧化氮(NO)表达或活性降低^[11-13], 血管性血友病因子(vWF)等分泌增多, 同时高Hcy血症增加血液中血小板的黏附性^[7], 从而引起血液凝血和纤溶功能紊乱, 导致血管硬化和血栓形成. Hcy能引起脂代谢紊乱, 加强低密度脂蛋白(LDL)的自身氧化, 而氧化的LDL能影响NO的合成和凝血酶调节蛋白的活性, 从而导致内皮功能的进一步受损^[8-10, 21-22]. Hcy主要在肝脏进行合成和分解, 其中85%的Hcy转硫作用在肝脏中进行, 因此肝脏是Hcy重要调节器官. 沈雄文 *et al* 的研究表明, 慢性肝病、肝硬化和原发性肝癌患者的血浆Hcy浓度增高, 同时血浆Hcy浓度检测还可应用于对普通人群慢性肝病的筛选, 这对引起慢性肝损伤的乙型肝炎的高发地区防治慢性肝损伤导致的肝硬化和肝癌可起到重要作用^[19-20]. 本实验结果显示, 脂肪肝组血浆Hcy明显高于对照组($P<0.01$)说明Hcy在NAFLD发病中起一定的作用. Hcy在细胞内主要有两条转化代谢途径: (1)Hcy重新甲基化为蛋氨酸, 此途径需要叶酸参与代谢提供甲基供体, 需要维生素B₁₂作为辅酶; Hcy与5-甲基四氢叶酸在蛋氨酸合成酶的催化下合成蛋氨酸和四氢叶酸. (2)Hcy与丝氨酸缩合为胱硫醚, 此途径需要胱硫醚合成酶催化, 以维生素B₆为辅酶. 上述的两个转化代谢途径出现任何异常, 都可能产生高同型半胱氨酸血症. 如血中叶酸及维生素B₁₂的缺乏, 可以影响Hcy的再甲基化途径产生血同型半胱氨酸浓度的升高. 一些研究表明, 血浆Hcy水平与叶酸、维生素B₆及维生素B₁₂浓度呈负相关, 增加这些维生素特别是叶酸的摄入可降低血Hcy水平^[14-18]. 本实验研究显示, 脂肪肝组血浆Hcy浓度与叶酸、维生素B₁₂浓度均呈直线负相关, 这表明对血浆Hcy浓度有影响的营养因素中叶酸与维生素B₁₂同等重要. 同时也为通过补充叶酸、B族维生素来降低血Hcy水平提供依据. 而于两组之间叶酸及维生素B₁₂水平无统计学差异, 两组血浆Hcy与维生素B₁₂均呈直线负相关, NAFLD组血浆Hcy与叶酸呈直线负相关, 对照组血浆Hcy与叶酸相关性不明显. 一方面, 可能与本研究样本量不大有关, 另一方面在NAFLD患者中是否存在叶酸、维生素B₁₂受体下调? 目前尚未见相关的报道, 有待进一步增加样本量进行相关的研究以证实.

本研究表明高Hcy血症可能是非酒精性脂肪肝的一个新的重要危险因素. Hcy水平与叶酸、维生素B₁₂呈负相关. 通过补充叶酸、维生

素B₁₂或许能为脂肪肝的防治提供新的途径.

4 参考文献

- 1 Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-1057
- 2 范建高, 郑晓英, 张梅, 杨兆瑞. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝窦超微结构及微血栓观察. *肝脏* 2005; 10: 41-42
- 3 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. *中华肝病杂志* 2003; 11: 71-71
- 4 Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 Suppl 2: S40-44
- 5 Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-298
- 6 Sacco RL, Roberts JK, Jacobs BS. Homocysteine as a risk factor for ischemic stroke: an epidemiological story in evolution. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 167-173
- 7 Selhub J, D'Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease. *Am J Med Sci* 1998; 316: 129-411
- 8 Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1993; 87: 1107-1113
- 9 Yoo JH, Chung CS, Kang SS. Relation of plasma homocyst(e)ine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis. *Stroke* 1998; 29: 2478-2483
- 10 王清涛, 秦晓光. 同型半胱氨酸的检测和临床应用. *中华检验医学杂志* 2006; 29: 193-195
- 11 严江涛, 汪道文. 同型半胱氨酸与血管内皮功能失调的关系及其分子机制的研究进展. *临床心血管病杂志* 2004; 20: 254-256
- 12 Hucks D, Thuraishingham RC, Raftery MJ, Yaqoob MM. Homocysteine induced impairment of nitric oxide-dependent vasorelaxation is reversible by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1999-2005
- 13 Gottsater A, Forsblad J, Mattiasson I, Lindgarde F. Decreasing plasma endothelin-1 and unchanged plasma neopterin during folate supplementation in hyperhomocysteinemia. *Int Angiol* 2002; 21: 158-164
- 14 Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340: 1449-1454
- 15 Franken DG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Kloppenborg PW. Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 465-470
- 16 张哲成, 高海凤, 刘建国, 张和顺, 赵学惠. 高同型半胱氨酸血症及相关因子与脑梗死相关性的研究. *中国临床神经科学* 2003; 11: 272-274
- 17 赵玉芳, 江晓津, 韩仲岩, 鞠兴东, 陈荣. 急性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸、叶酸、维生素B₁₂水平的测定及其临床意义. *卒中与神经疾病* 2003; 10: 259-262
- 18 黄延焱, 程梅芬. 老年脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平及药物干预研究. *中华神经科杂志* 2001; 34: 264-266
- 19 沈雄文, 孙国红, 孙关忠, 毛飞. 肝损伤时血清同型半胱

- 氨酸的浓度变化. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 242-242
- 20 Bosy-Westphal A, Ruschmeyer M, Czech N, Oehler G, Hinrichsen H, Plauth M, Lotterer E, Fleig W, Muller MJ. Determinants of hyperhomocysteinemia in patients with chronic liver disease and after orthotopic liver transplantation. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1269-1277
- 21 黄先玫, 章毅英, 余钟声, 朱卫华, 傅君芬, 何瑾, 蒋国平. 肥胖儿童血浆同型半胱氨酸含量及动脉病变的研究. 中华儿科杂志 2005; 43: 192-195
- 22 Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H. Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 2004; 279: 52961-52969

电编 郭海丽 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。

不同Nevin分期原发性胆囊癌的超声诊断

袁朝新, 卢强, 罗燕

袁朝新, 卢强, 罗燕, 四川大学华西医院超声诊断科 四川省成都市 610041

通讯作者: 袁朝新, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院超声诊断科. redycx@126.com

电话: 028-85421093

收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-06

Ultrasonographic diagnosis of gallbladder cancer with different Nevin stages

Chao-Xin Yuan, Qiang Lu, Yan Luo

Chao-Xin Yuan, Qiang Lu, Yan Luo, Department of Sonography, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Chao-Xin Yuan, Department of Sonography, Huaxi Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Alley, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. redycx@126.com

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

Abstract

AIM: To evaluate the values of ultrasonography in the diagnosis of gallbladder cancer with different Nevin stages.

METHODS: The ultrasonographic characteristics of 553 gallbladder cancer cases proved by surgery and pathological diagnosis were retrospectively analyzed.

RESULTS: No cases with gallbladder cancers of Nevin stage I and II were diagnosed by ultrasonography, while the diagnostic accuracy was 3.61%, 50.00%, 99.49%, respectively, for the stage-III, -IV, and -V gallbladder cancers.

CONCLUSION: Ultrasonography can hardly diagnose gallbladder cancers of Nevin stage I and II. For the stage-III cancers, ultrasonography presents a low diagnostic accuracy, but for the stage-IV and -V cancers, ultrasonography shows a relatively higher one.

Key Words: Ultrasonography; Gallbladder cancer; Nevin staging

Yuan CX, Lu Q, Luo Y. Ultrasonographic diagnosis of gallbladder cancer with different Nevin stages. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(12):1453-1455

摘要

目的: 探讨超声影像在不同Nevin分期原发性胆囊癌的诊断价值。

方法: 对我院近10 a经手术和病理确诊的553例原发性胆囊癌病例进行回顾性超声影像分析。

结果: 对Nevin分期中的 I 和 II 期原发性胆囊癌超声诊断符合率为零, III 期、IV 期、V 期原发性胆囊癌的超声诊断符合率分别为3.61%, 50.00%, 99.49%。

结论: 超声对Nevin I 和 II 期原发性胆囊癌难以做出准确诊断; 对III期原发性胆囊癌的诊断率较低, 但对囊壁局限性增厚伴有囊内结石时需要警惕; 对IV和V期原发性胆囊癌具有较高的诊断符合率。

关键词: 超声; 胆囊癌; Nevin分期

袁朝新, 卢强, 罗燕. 不同Nevin分期原发性胆囊癌的超声诊断. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1453-1455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1453.asp>

0 引言

原发性胆囊癌恶性度高^[1-10], 5 a生存率低于5%^[11], 流行病学调查表明, 他与胆囊结石高度相关, 胆囊癌常发生在胆囊结石和慢性胆囊炎的基础上, 早期常缺乏典型、特异的临床症状^[12], 从而容易与慢性胆囊炎混淆, 待出现黄疸或发生胆囊床肿瘤浸润时, 已是晚期, 预后不良, 因此, 胆囊癌的早期诊断是提高治愈率的关键. 超声是诊断胆囊结石的主要诊断手段, 也是诊断胆囊癌的首先和主要的一环. 现总结我院近10 a经手术及病理证实的553例胆囊癌, 进行回顾性超声影像分析, 旨在探讨超声检查在胆囊癌诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收集1996-01/2006-06我院经手术及病

■背景资料

长期以来, 医学界认为超声诊断对胆囊癌的诊断准确率不高, 应用价值不大, 通过我们这些年的经验积累, 发现超声在胆囊癌的诊断方面具有一定的价值. 主要问题在于胆囊壁及淋巴结的改变对早期诊断该疾病的意义认识不足, 充分认识上述问题对重新认识超声诊断在该疾病诊断方面的价值有着重要的意义, 而且具有明显卫生经济学效益。

■研发前沿

原发性胆囊癌恶性程度高, 早期诊断是提高治愈率的关键, 影像学发现常常已经是中晚期, 因此胆囊癌的早期诊断是临床医学的一个世界性难题, 亟待解决。

■应用要点

目前在胆囊癌的
诊断影像诊断
方面,可以用于
诊断的技术有超
声、CT、MRI、
PETCT等技术,所
有这些技术在胆
囊癌的诊断方面
基本上是中晚期。
超声对胆囊壁细
微变化具有较好
的敏感性,因而常
将胆囊壁的良性
增生当作恶性疾
病而手术治疗,若
将胆囊壁改变与
邻近淋巴结结合
起来动态观察,具
备良好的鉴别诊
断价值。

理证实的胆囊癌患者共553例,其中男210例,女343例,年龄45-78(中位64)岁。其中胆囊结石患者有549例,出现梗阻性黄疸的患者为380例,因其他症状就诊的患者73例。

1.2 方法 使用的超声诊断仪器为Toshiba, HP4500, HDI5000, 探头频率3.5-5 MHz。取常规体位,多切面观察胆囊形态、大小、囊壁、囊腔、肝内外胆管、以及肝脏、肝十二指肠隐窝等情况。必要时行彩色多普勒超声了解肿块内血流情况。本组553例患者均有手术及病理结果,病理采取Nevin分期方案。

2 结果

2.1 不同Nevin分期胆囊癌的超声声像图表现 胆囊结石在各期胆囊癌中的比例为: I & II期及IV期中占100%, III期中占97.59%, V期占99.49%。I & II期胆囊癌的胆囊壁的改变难以在超声图像中显示。III期胆囊癌的超声图像中有3.61%(3/83)的病例可以显示出胆囊壁的局限性改变。IV期胆囊癌中超声能显示胆囊壁的改变及周围淋巴结转移的占50.00%(10/20)。V期胆囊癌中胆囊壁的改变占29.56%(115/389), 肝床浸润占64.27%(250/389), 出现梗阻性黄疸的占95.12%(370/389)(表1)。

2.2 不同Nevin分期胆囊癌的病例数及超声诊断符合率 对Nevin分期中的 I 和 II期原发性胆囊癌超声诊断符合率为0, III, IV, V期原发性胆囊癌的超声诊断符合率分别为3.61%, 50.00%, 99.49%(表2)。

3 讨论

1976年, Nevin *et al*^[13]首先提出了原发性胆囊癌的临床病理分期方案,其依据是胆囊癌组织浸润生长和扩散的范围以及细胞的分化程度,具体分为5期,方案如下: I期, 癌组织仅限于胆囊黏膜; II期, 癌组织侵犯胆囊黏膜和肌层; III期, 癌组织侵及胆囊壁全层, 即黏膜、肌层和浆膜层; IV期, 癌组织侵犯胆囊壁全层并有淋巴结转移; V期, 癌组织直接侵犯肝脏或有肝转移, 或者有任何器官的转移。由于其简便实用, 很快为广大学者认同并广泛采用。

胆囊癌早期症状不明显且临床特征性不强, 虽然各种影像检查及肿瘤分子生物学和免疫学研究进展迅速, 但尚未发现有早期诊断胆囊癌特异的方法^[14]。尽管近年来超声技术已有长足发展, 本组资料还未发现 I & II期胆囊癌的特征性

表 1 553例胆囊癌病例的Nevin分期及超声声像图表现(n)

Nevin分期	n	胆囊结石	胆囊壁改变	肝床浸润	梗阻性黄疸	周围淋巴结转移
I & II	61	61	0	0	0	0
III	83	81	3	0	0	0
IV	20	20	10	0	10	10
V	389	387	115	250	370	90
总计	553	549	128	250	380	100

表 2 553例胆囊癌病例的Nevin分期与超声诊断符合率

Nevin分期	胆囊癌(n)	超声诊断阳性(n)	符合率(%)
I & II	61	0	0
III	83	3	3.61
IV	20	10	50.00
V	389	387	99.49
总计	553	400	72.33

声像图改变。超声对于胆囊壁的隆起性病变的检出灵敏度高且准确, 这些病变大多为胆囊壁的胆固醇沉积。胆固醇结晶脱落诱发急性胆囊炎后胆汁淤积附着在壁上, 易在声像图上发现1 cm以上的团块回声, 易误认为肿瘤。我们认为, 只要掌握回声的强弱, 鉴别附壁的胆固醇结晶是可以做到的。对胆囊增生性疾病, 确诊癌变目前尚属困难, 需要排除胆囊壁胆固醇沉积, 对这些胆囊增生性疾病的患者应建议手术或密切随访。

胆囊壁的增厚是III期胆囊癌的重要超声图像特征, 但是仅根据胆囊壁的增厚作出胆囊癌的诊断十分勉强, 还需了解囊壁的规则性及完整性。此外, 囊壁的增厚还需与黄色肉芽肿性胆囊炎相鉴别。后者是一种良性而具有破坏性的胆囊炎性病变, 常表现为不规则囊壁增厚, 在影像学上易与胆囊癌相混淆, 但常不伴有周围淋巴结肿大。

超声对周围淋巴结的观察对胆囊癌的诊断有重要价值, 所以除了观察胆囊壁情况外, 还需了解周围有无肿大的淋巴结, 因为癌肿虽未侵犯肝脏, 但可以沿淋巴转移途径而扩散。胆囊癌伴有淋巴结转移占35%-70%^[14], 多经肌层和浆膜下层转移至胆囊前哨淋巴结, 经胆总管周围淋巴结至胰十二指肠上淋巴结, 腹腔动脉周围淋巴结; 另一路至胰后淋巴结、肠系膜上血管周围淋巴结和主动脉旁淋巴结。因此, 常在

十二指肠隐窝, 门腔间隙发现有肿大淋巴结. 本组20例IV期胆囊癌中有50.00%(10/20)结合胆囊壁的改变和淋巴结的变化而做出正确诊断. 本组资料中V期胆囊癌占70.34%(389/553), 出现累及肝床、胆管、胰腺及结肠肝曲等周围脏器、梗阻性黄疸等多种超声表现, 因此对V期胆囊癌不难得出正确的超声诊断. 原发性胆囊癌占全部癌肿的0.76%-1.2%^[14]. Nervi *et al*^[15]应用Logistic回归模式计算出胆囊结石患者的胆囊癌发生率比无结石高出7倍, 结石可引起胆囊黏膜长期慢性机械损伤, 转而导致黏膜上皮发育异常, 后者具有癌变倾向. 本组病例中绝大多数伴有胆囊结石, 发生率为99.28%(549/553), 仅4例无胆囊结石.

总之, 本组资料说明, 超声对原发性胆囊癌Nevin分期中的I和II期难以做出确定性诊断; 对III期胆囊癌的诊断较难, 但对囊内结石伴有囊壁的局限性改变需要警惕; 对IV和V期胆囊癌由于伴有周围淋巴结肿大或周围脏器的浸润不难作出诊断. 我们仍需对原发性胆囊癌的生物特性及影像学特征进行深入的总结和研究.

4 参考文献

- 1 陈革, 王鹏, 石景森, 秦兴雷. 胆囊癌与胆囊结石关系的临床探讨. 新消化病学杂志 1997; 5: 321-322
- 2 郭英辉, 张啸. 原发性胆囊癌31例临床分析. 新消化病学杂志 1994; 2: 183-184
- 3 徐伟忠. 胆囊癌35例超声与手术病理对照. 新消化病学杂志 1996; 4: 263
- 4 李耕, 张学庸, 樊代明, 胡家露, 周绍娟, 陈敏. 新肿瘤标志物MGAg诊断胆囊癌. 新消化病学杂志 1995; 3: 114-115
- 5 石景森, 郝秀原. 癌基因、抑癌基因、细胞凋亡与原发性胆囊癌. 华人消化杂志 1998; 6: 430-431
- 6 范文涛, 李永国, 王群伟, 李清龙. 胆囊癌44例诊治体会. 世界华人消化杂志 2002; 10: 118-119
- 7 邱丽, 李永忠, 罗燕. 胆囊癌超声诊断55例. 世界华人消化杂志 2001; 9: 851-852
- 8 苑菁, 张经中, 王永平. 原发性胆囊癌的超声诊断及误诊分析. 中国超声医学杂志 1998; 14: 66-67
- 9 林琳, 翟全科. 原发性胆囊癌54例误诊分析. 新消化病学杂志 1997; 5: 129
- 10 王绍文. 胆囊隆起样病变53例超声与病理对照. 新消化病学杂志 1995; 3: 245-246
- 11 Cubertafoond P, Gainant A, Cucchiario G. Surgical treatment of 724 carcinomas of the gallbladder. Results of the French Surgical Association Survey. *Ann Surg* 1994; 219: 275-280
- 12 Donohue JH, Nagorney DM, Grant CS, Tsushima K, Ilstrup DM, Adson MA. Carcinoma of the gallbladder. Does radical resection improve outcome? *Arch Surg* 1990; 125: 237-241
- 13 Nevin JE, Moran TJ, Kay S, King R. Carcinoma of the gallbladder: staging, treatment, and prognosis. *Cancer* 1976; 37: 141-148
- 14 张延龄. 胆囊癌(文献综述). 国外医学·外科学分册 1991; 18: 262-264
- 15 Nervi F, Duarte I, Gomez G, Rodriguez G, Del Pino G, Ferrerio O, Covarrubias C, Valdivieso V, Torres MI, Urzua A. Frequency of gallbladder cancer in Chile, a high-risk area. *Int J Cancer* 1988; 41: 657-660

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

文章行文流畅, 表达准确, 易读性强, 科研方案设计简单明了, 纳入的病例多, 临床资料丰富, 得出的结论具有重要的临床价值.

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.

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!

蔡三军 主任医师
复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈洪 副教授
东南大学附属中大医院消化科

陈凇 教授
中国人民解放军总医院普通外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

关晓辉 主任医师
吉林北华大学附属医院消化内科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

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

郝春秋 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病防治中心(传染科)

郝纯毅 主任医师
北京大学临床肿瘤学院肿瘤外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

匡安仁 教授
四川大学华西医院核医学科

蓝宇 主任医师
北京积水潭医院消化科

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

马大烈 教授
上海市长海医院病理科

牛建昭 教授
北京中医药大学细胞生物化学实验室

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院医学实验科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

宋世兵 主任医师
北京大学第三医院普外科

屠红 副研究员
上海市肿瘤研究所

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科

吴健雄 主任医师
中国医学科学院中国协和医科大肿瘤医院肿瘤医院腹部外科

宣世英 主任医师
青岛市市立医院肝病科

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

郁宝铭 教授
上海市第八人民医院结直肠中心

张绪清 副教授
第三军医大学西南医院感染病科

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科