

量子点荧光探针在生物医学研究中的应用进展

黄萍, 颜仰东, 李东辉

黄萍, 李东辉, 厦门大学医学院抗癌研究中心 福建省厦门市 361005
颜仰东, 柯达(厦门)有限公司 福建省厦门市 361005
李东辉, 博士, 教授, 主要从事肝纤维化和光动力学治疗的研究.
国家自然科学基金重大研究计划资助项目, No. 90206016
福建省科技重点项目, No. 2001H045
厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助
厦门大学固体表面物理国家重点实验室开放课题资助
通讯作者: 李东辉, 361005, 福建省厦门市大学路168号, 厦门大学医学院抗癌研究中心. lidh@xmu.edu.cn
电话: 0592-2186321 传真: 0592-2186731
收稿日期: 2007-05-18 接受日期: 2007-06-18

A review of progress in the application of quantum dots to biomedical research

Ping Huang, Yang-Dong Yan, Dong-Hui Li

Ping Huang, Dong-Hui Li, Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China
Yang-Dong Yan, Kodak (Xiamen) Company Ltd, Xiamen 361005, Fujian Province, China
Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 90206016, Key Technology Projects in Fujian Province, No. 2001H045, Program for New Century Excellent Talents in Xiamen University and Open Topic of State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface (Xiamen University)
Correspondence to: Dong-Hui Li, Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, 168 Daxue Road, Xiamen 361005, Fujian Province, China. lidh@xmu.edu.cn
Received: 2007-05-18 Accepted: 2007-06-18

Abstract

Quantum dots, as a class of fluorescence probes, exhibit distinct luminescence characteristics compared to those of traditional fluorophores. They have shown great potential for applications in biomedical research. The last decade of developments in quantum dots for biomedical applications are reviewed.

Key Words: Quantum dots; Nanocrystals; Fluorescence probes; Semiconductor

Huang P, Yan YD, Li DH. A review of progress in the application of quantum dots to biomedical research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2175-2180

摘要

20世纪末, 随着纳米科技的进步, 诞生了一类

新型荧光探针—量子点. 与传统有机荧光探针相比表现出独特而优良的发光特性, 在不到10 a的时间里, 这类探针在科学研究中得到了迅速的应用. 本文对量子点荧光探针在生物医学中的应用及进展进行简要的综述.

关键词: 量子点; 纳米晶; 荧光探针; 半导体

黄萍, 颜仰东, 李东辉. 量子点荧光探针在生物医学研究中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2175-2180
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2175.asp>

0 引言

荧光检测技术由于灵敏度高、选择性好、特性参数多、动态范围宽而在诸多学科领域的研究工作中发挥着重要作用. 更由于其可高灵敏度、高选择性且直观、可视化地检测复杂生物分子集群中的特别组份而成为生命科学研究的重要工具^[1-2]. 荧光检测技术应用于生命科学的研究离不开荧光探针的使用. 20世纪生命科学的快速发展对荧光探针的性能提出了更高的要求. 多种待测组份的快速、原位、实时、多色及可视化的检测越来越成为实际工作的需要, 因此, 新型荧光探针的开发一直受到人们的极大关注.

20世纪末期, 一类新型的荧光探针-量子点 (quantum dot) 的出现为上述问题的解决带来了曙光^[3-4]. 量子点, 文献中亦常称作半导体纳米晶, 是指直径在1-100 nm的半导体纳米荧光颗粒. 尽管量子点在上世纪50年代就已出现, 但直到上世纪末, Bruchez *et al*^[3]和Chan *et al*^[4]解决了其水溶性和生物相容性的问题之后, 量子点的生物医学应用才成为可能. 自此以后, 量子点的研究迅速成为热点领域, 而量子点的生物医学应用尤为研究之重点.

国内外的研究工作表明, 与传统的荧光化合物相比, 量子点荧光探针具有如下显著特点: (1)发射光谱狭窄, 光谱重叠明显减小, 对于提高测定的选择性和灵敏度极为有利; (2)具有宽广的激发带, 而其发射波长可通过调整粒子径的

■背景资料

随着纳米科技的进步, 科技工作者在20世纪末发现了一类性质优良而独特的新型荧光探针—量子点. 在不到10 a的时间里, 这类探针在科学研究尤其是生物医学研究中得到了迅速的应用. 量子点荧光探针与传统荧光探针相互补充, 显著增加了荧光探针的种类, 丰富并发展了荧光探针技术, 展示了其在生命科学领域广阔的应用前景.

■ 研发前沿

量子点在细胞及动物的活体、实时、原位示踪与成像中的应用是当前以及今后很长一段时间的热点。而利用量子点多色发射的特性进行多指标同时定性、定量的检测也十分令人关注。须重点解决的问题是具有可标记基团的量子点的规模化制备技术,以显著降低应用成本。

大小进行调节,这意味着可用同一波长的光进行激发而获得不同颜色的荧光发射,使多组份的同时(多色)检测成为可能。换言之,人们可用不同粒径的纳米发光微粒进行标记,而以同一激发波长进行激发,对不同的待检分析物进行同时检测或观测。纳米发光材料的这一特点对于荧光显微成像和流式细胞术技术具有特别的意义;(3)具有较高的量子产率、较大的stokes位移、优良的稳定性及抗光漂白能力(其抗光漂白能力可比传统的有机荧光染料大50-100倍)。本文拟对近年来量子点荧光探针在生物学中的应用的进展作简要的介绍。

1 量子点的结构

量子点是由少量的原子或分子组成的原子团簇。国内外文献报道的主要是元素周期表中II-VI主族如CdSe, CdTe, III-V主族如InP, InAs等半导体纳米晶。应用于生物学领域的量子点的典型结构(图1)所示^[4]。量子点通常为核壳(core-shell)结构,核心为具有高发光效率的半导体物质(如CdSe),外包一层硫化物(如ZnS)以进一步提高发光量子效率。更重要的是,外层硫化物的存在极大地提高了量子点的光化学稳定性。因而,与传统有机荧光探针相比,量子点的抗光漂白能力大为增强。核壳结构之外再通过化学方法引入活性基团如羧基,活性基团的引入解决了两个重要问题:(1)使量子点具有水溶性;(2)使量子点具有可标记基团,因而可与生物分子进行化学偶联。

2 生物分子相互作用研究

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术是研究生物分子相互作用的有力工具。但在研究中人们也发现,传统的有机荧光染料存在着局限性:由于有机荧光染料的吸收谱通常较窄,因此很难避免在对供体分子进行有效激发时同时也激发了受体分子;另外,有机荧光探针的发射光谱较宽且带有较长的红端拖尾,因而常与受体的发射光发生重叠。而纳米荧光探针(量子点)激发谱带宽、发射谱对称而狭窄且发射波长与其粒径相关,因而可望克服有机探针所存在的上述弱点。近来有报道^[5]表明,半导体量子点如CdSe, CdTe能够参与FRET过程,这意味有望成为FRET的新型探针而在生物分子结构、配体受体结合等方面获得应用。实际上,这方面的研究已经开始,如Willard

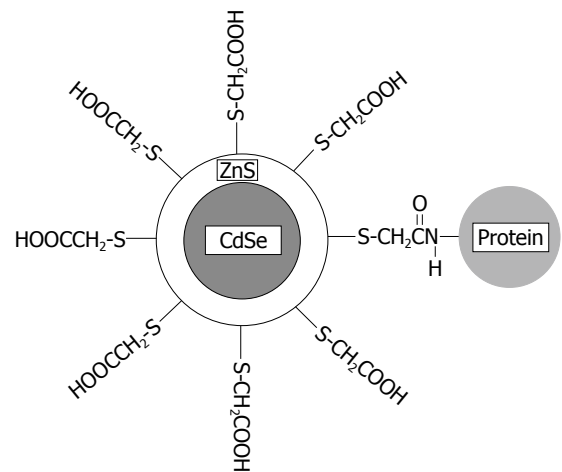


图1 核壳结构的水溶性量子点。

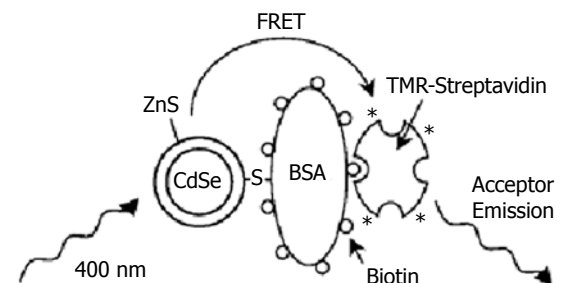


图2 量子点-四甲基罗丹明能量转移对应用生物分子相互作用的研究。

et al^[6]以具有核壳结构的CdSe-ZnS量子点与四甲基罗丹明组成FRET对,应用于生物素化牛血清白蛋白(bBSA)与标有四甲基罗丹明的链亲和素(streptavidin)的相互作用的模型研究(图2),获得了令人满意的结果。他们认为,这一工作可望得到进一步拓展而应用于抗原-抗体、DNA杂交、酶-底物的相互作用的均相研究。Yildiz *et al*^[7]以量子点为荧光探针,将上述原理应用于受体-底物相互作用的研究。

3 核酸分子生物学研究

3.1 核酸结构的研究 越来越多来自于X-射线晶体结构、凝胶电泳、酶环化作用以及电子显微学的实验证据表明,核酸序列能够决定核酸的整体结构。Mahtab *et al*^[8]提出了一种探测稀溶液中核酸结构的新方法,他们将具有特定结构的核酸序列吸附于半导体量子点CdS上后发现,通过量子点表面敏化发光行为可以区分“直线型”、“弯曲线”和“扭结型”的双链寡核苷酸。这一研究工作的另一意义在于提供了一种无蛋白背景下DNA向底物弯曲的检测方法。

■名词解释

量子点:文献中亦常称作半导体纳米晶,是指直径在1-100 nm的半导体纳米荧光颗粒。具有:(1)发射光谱狭窄,光谱重叠明显减小,对于提高测定的选择性和灵敏度极为有利。(2)宽广的激发带,而其发射波长可通过调整粒子径的大小进行调节,这意味着可用同一波长的光进行激发而获得不同颜色的荧光发射,使多组份的同时(多色)检测成为可能。(3)较高的量子产率、较大的stokes位移、优良的稳定性及抗光漂白能力。

原体检测、细胞示踪、细胞谱系研究等工作中,人们对全细胞的量子点标记特别有兴趣;(2)受体与配体的相互作用研究^[28]。

7 动物活体成像

量子点的光化学稳定(强抗光漂白能力)及高亮度(荧光强度高)使其成为理想的动物活体定位与靶向成像的荧光示踪剂。Dubertret *et al*^[29]以磷脂包埋的方式制备了具有生物相容性的量子点,并应用于体内、体外研究。在体内研究中,他们将这种量子点直接注射非洲爪蟾的胚胎中,可用于胚胎发育全过程的示踪。Larson *et al*^[30]以量子点为荧光示踪剂,结合双光子激光扫描共聚焦显微术,对活体动物的血管成像进行了多方面研究,结果显示,无论是对比度还是观测纵深都明显优于传统的有机荧光染料。Ballou *et al*^[31]对量子点在小鼠体内长时活体成像进行了研究,并指出包被高分子量的聚乙二醇可避免量子点的聚集,这对于长时成像十分有利。Gao *et al*^[32]则将功能化量子点用于动物恶性肿瘤的靶向定位和体内成像。

8 生物传感

8.1 用于分子、离子的传感 如前所述,量子点可与分子光谱匹配的有机荧光染料组成荧光共振能量转移对。这一原理也被用于某些生化分子的传感。如Medintz *et al*^[33]以发绿色荧光(560 nm)的量子点标记麦芽糖结合蛋白,以有机荧光染料QSY-9(其最大吸收在565 nm)标记 β -环糊精,组成荧光共振能量转移对。在有麦芽糖存在时,二者之间的能量转移过程被破坏,量子点的荧光得以恢复。据此,实现了对麦芽糖的均相传感。Nechyporuk-Zloy *et al*^[34]将双色量子点标记技术应用于钾离子通道的检测,获得了满意的结果。

8.2 生物传感新模式 伴侣蛋白GroEL由2个超分子环形成双层结构,包含一个直径4.5 nm的圆柱型凹穴,正好可以容纳一个量子点。Ishii *et al*^[35]发现,在伴侣蛋白GroEL-量子点复合物中加入ATP,并在 Mg^{2+} 、 K^+ 的存在下,蛋白分子发生构型改变而将量子点释放出来(图4)。正如量子点专家聂书明教授所说,日本科学家的这一研究工作“为量子点的生物学应用开辟了新的道路,人们有可能因此设计出新的生物传感器”。

9 量子点荧光编码技术

量子点派生技术一个令人兴奋的进展是近年出现的发光编码微球^[36]。Han *et al*将量子点包埋于

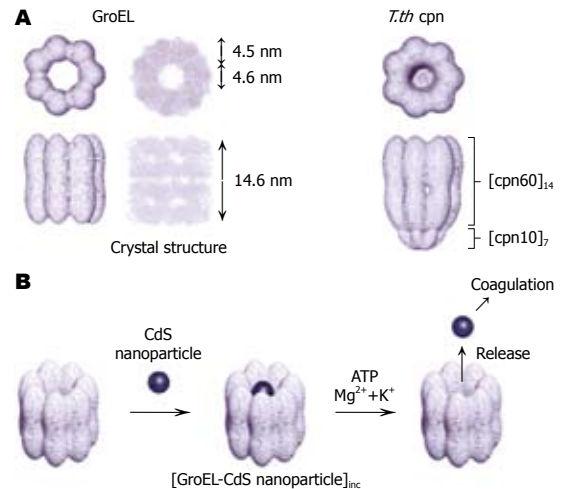


图4 响应ATP的桶状伴侣蛋白及其内含的量子点。

高分子(聚苯乙烯)微球中,制成强度与发射波长可调的发光微球。这种发光微球具有如下特点:(1)强度可调。通过控制原料比例,可以调节包埋于微球中的纳米晶体的数量,从而使不同种类的微球具有不同的荧光发射强度,如可以获得10个强度级别的纳米微球;(2)发射波长可调。如前所述,由于纳米发光微粒(量子点)的发射波长与其粒径大小有关,因此,将不同粒径的纳米发光微粒(1种或几种)包埋于微球中,即可获得具有不同发射波长(颜色)特性的发光微球;(3)控制合适的反应条件,可获得粒径均匀的发光微球。由于发光微球的强度与发射波长具有多重性(即可调),通过二者之间的组合,可获得大量的、具有不同荧光发射强度与发射波长特性的微球[可获得的微球种类数目为 n^m-1 , n 为可调的强度级别数目, m 为可调的波长(颜色)数目],即每种(或每个)发光微球的发光性各有差别。如将发光微球的这种特性应用于生物示踪,则每种(或每个)发光微球可标记不同的生物分子(如,不同的抗原、抗体或序列不同的核酸探针),即可对不同的生物分子进行编码标识,并应用于靶目标(抗体、抗原、受体、核酸等)的检测。以纳米发光微粒标记的发光微球的这种独特性质使其在理论上可以编码上百万个核酸或蛋白质序列。为生命科学研究尤其是基因表达、高通量扫描、医学诊断提供崭新的检测手段,具有巨大的应用潜力。如Mattneakis *et al*^[37]和Lagerholm *et al*^[38]将上述编码技术用于多细胞的平行分析。

10 展望

量子点发展的历史并不长,而其在解决了水溶性和生物相容性的问题后应用于生命科学研究

领域只有短短的不到10 a的时间, 但进展却十分迅速. 其应用领域涉及生物化学与分子生物学、免疫学、细胞生物学、发育生物学等主要学科, 研究对象涉及从微观到宏观的各个层次(离子、亚分子、分子、细胞、组织、胚胎、大体). 这表明, 作为一种与传统有机荧光探针相比具有独特优点的新型荧光探针, 量子点荧光探针尽管不能取代技术成熟的有机荧光探针和荧光融合蛋白技术, 但可与二者相互补充, 极大地丰富了荧光探针家族, 促进了荧光探针技术的发展. 量子点正在全面而深入地介入生命科学问题的研究中, 越来越广泛地引起生命科学领域科学工作者的兴趣与重视. 我们有理由相信, 随着量子点科学的进一步发展, 其在生命科学领域将具有更加广阔的应用空间, 也将为生命科学的发展做出更多的贡献.

11 参考文献

- Haugland RP, Handbook of fluorescent probes and research chemicals, sixth edition, Molecular probes, Inc., Eugene, OR, 1996
- Slavik J, Fluorescent probes in cellular and molecular biology, CRC Press, 1994
- Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281: 2013-2016
- Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998; 281: 2016-2018
- Mamedova NN, Kotov NA, Rogach AL, Studer J, Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: Preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. *Nano Lett* 2001; 1: 281-286
- Willard DM, Carillo LL, Jung JY, Orden AV. CdSe-ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein-protein binding assay. *Nano Lett* 2001; 1: 469-474
- Yildiz I, Tomasulo M, Raymo FM. A mechanism to signal receptor-substrate interactions with luminescent quantum dots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11457-11460
- Mahtab R, Rogers JP, Murphy CJ. Temperature- and salt-dependent binding of long DNA to protein-sized quantum dots: Thermodynamics of "inorganic protein"-DNA interactions. *J Am Chem Soc* 2000; 122: 14-17
- Pathak S, Choi SK, Arnheim N, Thompson ME. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 4103-4104
- Patolsky F, Gill R, Weizmann Y, Mokari T, Banin U, Willner I. Lighting-up the dynamics of telomerization and DNA replication by CdSe-ZnS quantum dots. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 13918-13919
- Courty S, Bouzigues C, Luccardini C, Ehrensperger MV, Bonneau S, Dahan M. Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging. *Methods Enzymol* 2006; 414: 211-228
- Choi JH, Chen KH, Strano MS. Aptamer-capped nanocrystal quantum dots: a new method for label-free protein detection. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 15584-15585
- Bakalova R, Zhelev Z, Ohba H, Baba Y. Quantum dot-based western blot technology for ultrasensitive detection of tracer proteins. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 9328-9329
- Ghazani AA, Lee JA, Klostranec J, Xiang Q, Dacosta RS, Wilson BC, Tsao MS, Chan WC. High throughput quantification of protein expression of cancer antigens in tissue microarray using quantum dot nanocrystals. *Nano Lett* 2006; 6: 2881-2886
- Ravindran S, Kim S, Martin R, Lord EM, Ozkan CS. Quantum dots as bio-labels for the localization of a small plant adhesion protein. *Nanotechnology* 2005; 16: 1-4
- Dahan M. Watching the dynamics of individual proteins in live cells using quantum dots. *J Histochem & Cytochem* 2004; 52: S18-S18 Suppl
- Sun B, Xie W, Yi G, Chen D, Zhou Y, Cheng J. Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection. *J Immunol Methods* 2001; 249: 85-89
- Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Ge N, Peale F, Bruchez MP. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 41-46
- Goldman ER, Anderson GP, Tran PT, Mattoussi H, Charles PT, Mauro JM. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays. *Anal Chem* 2002; 74: 841-847
- Lingerfelt BM, Mattoussi H, Goldman ER, Mauro JM, Anderson GP. Preparation of quantum dot-biotin conjugates and their use in immunochromatography assays. *Anal Chem* 2003; 75: 4043-4049
- Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, Medintz IL, Mattoussi H. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal Chem* 2004; 76: 684-688
- Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TF, Betts MR, Yu J, Gostick E, Perfetto SP, Goepfert P, Koup RA, De Rosa SC, Bruchez MP, Roederer M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med* 2006; 12: 972-977
- Wu XY, Harper TF, Ng CH, Liu HJ, Burt A, Minalla A, Nikiforov T, Bruchez MP, Ornberg RL. Multiplexing fluorescence immunohistochemistry with quantum dot conjugates. *J Histochemistry & Cytochemistry* 2004; 52: S17-S17
- Ziring D, Shimazaki K, Dry S, Braun J. Inflammatory bowel disease immune monitoring: Multiplex analysis of quantum dot immunophenotyping. *Clinical Immunology* 2006; 119: S157-S157
- Sukhanova A, Devy J, Venteo L, Kaplan H, Artemyev M, Oleinikov V, Klinov D, Pluot M, Cohen JH, Nabiev I. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem* 2004; 324: 60-67
- Tokumasu F, Dvorak J. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J Microsc* 2003; 211:

■同行评价

本文对量子点荧光探针在生物医学研究中的作用进行了综述, 内容新颖, 论述全面, 行文流畅, 具有潜在的应用价值.

- 256-261
- 27 Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12617-12621
- 28 Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003; 302: 442-445
- 29 Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002; 298: 1759-1762
- 30 Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, Clark SW, Bruchez MP, Wise FW, Webb WW. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* 2003; 300: 1434-1436
- 31 Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 79-86
- 32 Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 969-976
- 33 Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater* 2003; 2: 630-638
- 34 Nechyporuk-Zloy V, Stock C, Schillers H, Oberleithner H, Schwab A. Single plasma membrane K⁺ channel detection by using dual-color quantum dot labeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C266-269
- 35 Ishii D, Kinbara K, Ishida Y, Ishii N, Okochi M, Yohda M, Aida T. Chaperonin-mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles. *Nature* 2003; 423: 628-632
- 36 Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 631-635
- 37 Mattheakis LC, Dias JM, Choi YJ, Gong J, Bruchez MP, Liu J, Wang E. Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots. *Anal Biochem* 2004; 327: 200-208
- 38 Lagerholm BC, Wang M, Ernst LA, Ly DH, Liu H, Bruchez MP, Waggoner AS. Multicolor coding of cells with cationic peptide coated quantum dots. *Nano Lett* 2004; 4: 2019-2022

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

功能性胃肠病诊治进展通知

本刊讯 经卫生部批准,由甘肃省人民医院消化科主办的2007年国家继续医学教育项目“功能性胃肠病诊治进展”(项目编号:2007-0-0-02),定于2007-09-01/05在甘肃兰州举行.学习班期间将邀请国内及省内知名消化专家,讲授功能性胃肠病诊治进展.

1 授课内容

功能性胃肠病罗马III分类及诊断标准的核心内容,有消化道症状的抑郁及焦虑症状的判定评分标.伴有抑郁及焦虑症状的功能性胃肠病患者的心理治疗,便秘及腹泻型IBS、功能性腹胀、功能性便秘等,功能性烧心、食管源性胸痛、功能性吞咽困难,食管压力测定的临床意义;糖尿病人食管压力测定结果与正常人群食管压力测定结果对比分析;功能性消化不良、反刍综合征等;胆囊及Oddi括约肌功能紊乱的诊断和治疗;功能性大便失禁、功能性肛门直肠疼痛、功能性排便障碍;功能性腹痛的诊断标准及治疗,兰州地区50例健康成人食管PH测定结果分析;食管PH监测的临床意义;胃食管反流病人反流程度不同伴有不同的症状积分;治疗功能性胃肠道疾病新方法疗效的临床试验设计;学习班结业时授予国家级继续医学教育项目学分12学分.学习班费用(含资料及证书费):680元.食宿统一安排.费用自理.有意参加者请于2007-07-25前将回执寄至甘肃省人民医院消化科,以便预定房间并发第二轮通知.

2 联系方式

730000,兰州市东岗西路160号,甘肃省人民医院消化科.联系人:陈翔;电话:0931-8281140;8281141

大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系

金武丕, 权修权, 孟繁平, 崔香丹, 朴海今

金武丕, 权修权, 崔香丹, 朴海今, 延边大学医院 吉林省延吉市 133000
孟繁平, 延边大学医学院 吉林省延吉市 133000
金武丕, 博士在读, 主任医师, 主要从事酒精性肝病的研究。
通讯作者: 金武丕, 133000, 吉林省延吉市, 延边大学医院急诊科. wpcj8933@163.com
电话: 0433-2660120
收稿日期: 2007-03-19 接受日期: 2007-04-13

Relationship between hepatocyte apoptosis, cytochrome P4502E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease in rats

Wu-Pi Jin, Xiu-Quan Quan, Fan-Ping Meng, Xiang-Dan Cui, Hai-Jin Piao

Wu-Pi Jin, Xiu-Quan Quan, Xiang-Dan Cui, Hai-Jin Piao, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Fan-Ping Meng, Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Correspondence to: Wu-Pi Jin, Department of Emergency, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China. wpcj8933@163.com
Received: 2007-03-19 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To observe the pathological changes and investigate the relationship between hepatocyte apoptosis, cytochrome P4502E1 (CYP2E1) and oxygen free radicals in alcoholic liver disease (ALD) in rats.

METHODS: Ethanol (400 mL/L) was administered at 8 g/kg body weight by gavage twice daily for 8 weeks in the ALD model group, and the control group received isovolumic saline by gavage. By the end of the eighth week, the serum activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were detected by automatic biochemistry analyzer. The pathological changes in the liver were observed by light microscopy of HE-stained sections; hepatocyte apoptosis was detected by the TdT-mediated d-UTP nick end labeling (TUNEL) method; and

expression of caspase-3 in the liver was detected by immunohistochemistry. Expression of serum CYP2E1 was determined by polymerase chain reaction, and maleic dialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity in serum were detected by the thiobarbituric acid (TBA) method.

RESULTS: TUNEL-positive cells were located around the central vein, spotty and focal necrosis area in the ALD group, and Caspase-3 was observed around the central vein and areas of hepatocellular necrosis. The apoptotic index (AI) and expression of caspase-3 in the ALD group were significantly higher than those in the control group (AI, $6.2\% \pm 1.7\%$ vs $1.7\% \pm 0.8\%$; Caspase-3, 66.7% vs 9.5% , $P < 0.05$, $P < 0.01$). The allelic frequency of *c1* and *c2* subtypes of CYP2E1 gene in control group was 91.6% and 8.4%, respectively, and 53.4% and 46.6%, respectively, in the ALD group. There were significant differences between the two groups (both $P < 0.05$). The serum MDA content showed a positive correlation with hepatocyte AI ($r = 0.644$), and serum activity of SOD showed a negative correlation with AI ($r = -0.511$) in the ALD group.

CONCLUSION: Chronic alcohol administration induced ALD and liver dysfunction, and increased hepatocyte apoptosis. *Rsa* I and *Pst* I restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were related to ALD in rats, and the *c2* gene might be related to development of ALD. The MDA content and SOD activity play an important role in the process of hepatocyte apoptosis and lipid peroxidation.

Key Words: Alcoholic liver disease; Apoptosis; Cystein-dependent aspartate-specific progerase-3; Cytochrome P4502E1; Oxidative stress; TdT-mediated d-UTP nick end labeling; Immunohistochemistry; Polymerase chain reaction

Jin WP, Quan XQ, Meng FP, Cui XD, Piao HJ. Relationship between hepatocyte apoptosis, cytochrome P4502E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2181-2185

■背景资料

酒精性肝病是由于长期大量饮酒所致的慢性肝脏疾病, 在欧美国家发病率较高, 是西方发达国家常见肝病之一. 近年来, 随着我国居民生活水平的提高, 嗜酒者增多, ALD的发病率呈逐年上升趋势, 酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第2大病因. 吉林省延边地区酒精性肝病发病率较高.

■ 研发前沿

酒精性肝病发病机制较复杂,尚未完全明了。CYP2E1是细胞色素P450的酒精诱导形式,他在非乙醇脱氢酶氧化途径中起重要作用,为酒精性肝病的主要发病机制。近年来,氧化应激在酒精性肝病中的作用受到重视。

摘要

目的: 观察大鼠酒精性肝病组织病理形态学改变,探讨细胞凋亡与细胞色素P4502E1的表达以及和氧化应激的关系。

方法: 用酒精灌胃法制备酒精性肝病大鼠模型,模型组给予酒精8 g/kg,每天分2次灌胃连续8 wk,对照组给予等量的生理盐水灌胃。实验8 wk末,观察肝组织的病理形态学改变,用原位末端标记法(TUNEL)检测肝细胞凋亡,用免疫组化法检测肝组织中Caspase-3蛋白表达,用全自动生化仪检测ALT和AST的含量,用PCR法测定肝细胞色素P4502E1的基因表达,分别用硫代巴比妥酸法(TBA法)和黄嘌呤氧化酶法测定肝组织丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活力。

结果: 模型组凋亡的肝细胞明显增多,主要分布在中央静脉周围、点状和灶状坏死区;Caspase-3主要分布于中央静脉及肝细胞坏死灶周围细胞的胞质中。模型组肝细胞凋亡指数(AI)和Caspase-3蛋白表达强度明显高于对照组(AI: $6.2\% \pm 1.7\%$ vs $1.7\% \pm 0.8\%$; Caspase-3: 66.7% vs 9.5% , $P < 0.05$, $P < 0.01$)。CYP2E1表达: 对照组c1基因频率为91.6%,c2基因频率为8.4%;模型组c1基因频率为53.4%,c2基因频率为46.6%,均有显著性差异($P < 0.05$)。长期酒精摄入大鼠血清MDA含量增加($41.53 \pm 7.43 \mu\text{mol/L}$ vs $15.72 \pm 2.06 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$),SOD活力下降($353.12 \pm 61.02 \text{ kU/L}$ vs $636.82 \pm 138.60 \text{ kU/L}$, $P < 0.05$),与酒精性肝病肝细胞凋亡程度有相关性($r = 0.644$, $r = -0.511$)。

结论: 长期酒精摄入可引起大鼠酒精性肝病及肝功能损伤,肝细胞凋亡明显增加。CYP2E1基因Pst I及Rsa I RFLPs与酒精性肝病有关,其中c2基因可能与大鼠酒精性肝病的发生有关。MDA含量和SOD活力在酒精性肝病的肝细胞凋亡过程及脂质过氧化反应中发挥重要作用。

关键词: 酒精性肝病; 细胞凋亡; Caspase-3; 细胞色素P4502E1; 氧化应激; 原位末端标记法; 免疫组化法; 聚合酶链式反应

金武丕, 权修权, 孟繁平, 崔香丹, 朴海今. 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2181-2185

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2181.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由长

期大量饮酒所致的慢性肝脏疾病,近年来ALD的发病率呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第2大病因^[1]。酒精及其代谢产物和代谢过程中产生的代谢混乱是导致酒精性肝病的重要原因。酒精在肝内主要通过三酶系统被氧化^[2]。CYP2E1是细胞色素P450的酒精诱导形式,他在非乙醇脱氢酶氧化途径中起重要作用,为酒精性肝病的主要发病机制^[3]。近年来,氧化应激在酒精性肝病中的作用受到重视^[4-5]。我们通过酒精灌胃的方法建立动物模型,进一步探讨肝细胞凋亡以及与之密切相关的CYP2E1,氧化应激等因素在ALD的作用,为今后的临床诊断及治疗提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠由延边大学医学院动物科提供,体质量为 $222.1 \pm 20.9 \text{ g}$ 。原位细胞死亡检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Caspase-3多克隆抗体、即用型SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),CYP2E1引物、PCR反应缓冲液、dNTP、Taq酶、Pst I和Rsa I内切酶(大连宝生物工程有限公司),丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物有限公司)。将70只大鼠随机分为2组:对照组33只,模型组37只。模型组给予乙醇8 g/kg,每天分2次灌胃连续8 wk,对照组给予等量的生理盐水。自由饮水,饲以条杆状动物饲料。实验8 wk末各组选30只麻醉后采血(分离血清冰冻待用)处死大鼠取肝(部分用40 g/L甲醛固定,另一部分用液氮冰冻待用)。

1.2 方法 采用TUNEL法、免疫组化法(Caspase-3蛋白测定)检测肝凋亡细胞,用PCR加酶切法测定细胞色素P4502E1基因型,用硫代巴比妥酸(TBA)法测定血清MDA的含量及黄嘌呤氧化酶法测定SOD的活力。

统计学处理 采用SPSS软件,数据以mean \pm SD表示,进行单因素方差和 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为两者之间有显著性差异。

2 结果

2.1 肝脏组织病理学改变 模型组肝窦结构不清,肝细胞肿胀,可见大小不等的脂肪空泡,部分处可见点状、灶状坏死,对照组肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝窦结构清晰,肝细胞无变性坏死(图A1, B1)。模型组凋亡的肝细胞散在分布于肝实质中,小叶中

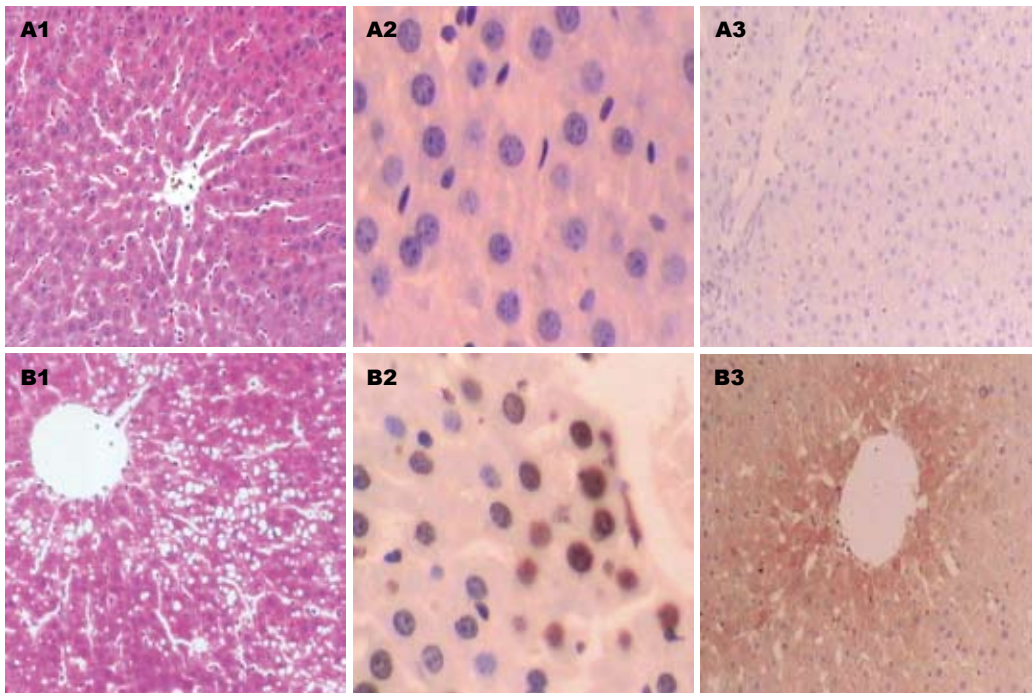


图1 大鼠酒精性肝病. 1: 肝组织学改变(HE×100); 2: 肝细胞凋亡(×400); 3: Caspase-3蛋白表达(SABC×100); A: 对照组; B: 模型组.

■创新亮点

本实验通过灌胃的方法建立ALD大鼠模型发现长期乙醇摄入肝细胞凋亡明显增加. CYP2E1基因 Pst I及 Rsa I RFLPs与酒精性肝病有关, 其中 $c2$ 基因可能与大鼠酒精性肝病的发生有关. MDA含量和SOD活力在酒精性肝病的肝细胞凋亡过程及脂质过氧化反应中发挥重要作用.

居多, 主要位于小叶点状、灶状坏死区及其中央静脉周围, 对照组偶见肝细胞凋亡. Caspase-3蛋白主要分布于中央静脉及肝细胞坏死灶周围细胞的胞质中. 模型组凋亡指数高于对照组, 差异有显著性($P<0.05$, 表1, 图A2, B2); 模型组Caspase-3蛋白表达明显高于对照组, 差异有显著性($\chi^2 = 20.376$, $P<0.01$, 表1, 图A3, B3).

2.2 肝组织细胞色素P4502E1的基因频率 模型组与对照组相比 $c1$ 基因频率明显降低, $c2$ 基因频率则相反, 其差异有统计学意义($P<0.05$, 表1, 图2).

2.3 大鼠血清学改变 模型组大鼠血清ALT, AST与对照组相比均升高, 两组相比有显著差异($P<0.05$, 表1). 模型组大鼠血清MDA含量随着SOD活性的降低而增高, 经统计学分析两组各指标之间有显著的差异($P<0.05$, 表1), 两指标之间呈负相关($P<0.05$, $r = -0.582$).

3 讨论

酒精性肝病是指由于酒精摄入过量而导致的肝脏损害等一系列病变, 可分为轻型酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化5种类型^[6]. 近来研究表明酒精是肝细胞的一种凋亡诱导剂, 他在ALD的发生、发展过程中起着重要作用^[7]. 细胞凋亡(apoptosis)是由体内因素触发细胞内预存的死

表1 大鼠乙醇性肝病血清学、Caspase-3表达和基因情况

指标	模型组	对照组
AI(%)	6.2±1.7 ^a	1.7±0.8
ALT(U/L)	107.4±16.6 ^a	48.4±10.5
AST(U/L)	232.1±52.9 ^a	102.9±14.1
SOD(kU/L)	353.12±61.02 ^a	636.82±138.60
MDA(μmol/L)	41.53±7.43 ^a	15.72±2.06
Caspase-3		
(-)	10	26
(+)	13	3
(++)	5	1
(+++)	2	0
表达率(%)	66.7 ^b	9.5
基因情况		
A($c1/c1$)	8	25
B($c1/c2$)	16	5
C($c2/c2$)	6	0
A($c1/c1$ %)	26.7 ^a	83.3
B($c1/c2$ %)	53.3	16.7
C($c2/c2$ %)	20 ^a	0
$c1$ (%)	53.4 ^a	91.6
$c2$ (%)	46.6 ^a	8.4

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

亡程序而导致的细胞死亡过程, 是细胞在生理或病理信号刺激下启动自身凋亡基因发生的主

■应用要点

本文通过乙醇灌胃的方法建立动物模型, 进一步探讨肝细胞凋亡以及与之密切相关的CYP2E1, 氧化应激等因素在ALD的作用, 为今后的临床诊断及治疗提供基础资料.

■名词解释

1 酒精性肝病 (ALD): 是指由于乙醇摄入过量而导致的肝脏损害等一系列病变, 可分为轻型ALD、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化5种类型。

2 CYP2E1: 是一参与体内生理、病理和毒理过程, 有着广泛功能的代谢酶, 其表达水平往往与代谢活性相关且受体内外诸多因素的影响。CYP2E1是细胞色素P450的乙醇诱导形式, 他在非乙醇脱氢酶氧化途径中起重要作用, 为酒精性肝病的主要发病机制。

程, 同时对于维持正常组织的细胞生长/死亡平衡至关重要。凋亡细胞的清除与凋亡是保证肝脏功能的关键因素^[8]。我们通过灌胃的方法建立ALD大鼠模型, 并研究发现模型组大鼠肝细胞凋亡比例显著高于对照组, 多散在分布于肝实质中, 小叶中居多, 主要位于小叶点状、灶状坏死区及其中央静脉周围, 并且肝细胞凋亡程度与肝损伤的轻重密切相关, 与文献^[9]报道一致。因此可以认为肝细胞凋亡发生时常伴有肝细胞坏死, 两者均可引起肝损伤, 导致ALD的发生、发展。

Caspase-3是凋亡的重要执行者和哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶^[10-11]。细胞凋亡是由各种凋亡刺激信号始动, 受细胞内源性基因、酶类和信号传导途径等调控的“瀑布式”激活过程。其中蛋白酶与细胞凋亡密切相关, 凋亡的发生是一个复杂、由Caspase家族成员介导的蛋白酶级联反应过程。在蛋白酶级联切割过程中, Caspase-3处于核心位置, 不同的蛋白酶分别切割Caspase-3酶原, 从而激活Caspase-3; 活化的Caspase-3又进一步切割不同的底物, 导致蛋白酶级联切割放大, 最终使细胞走向死亡^[12]。因此, Caspase-3称为死亡蛋白酶。目前对于Caspase-3在酒精性肝病中表达的意义及其与其他凋亡基因在酒精性肝病发生、发展中的相互关系研究很少。我们通过免疫组织化学检测发现酒精性肝病大鼠模型中Caspase-3蛋白表达增强。

细胞色素P450(cytochromeP450, CYP)是位于滑面内质网上的一组混合功能氧化酶系, 是肝脏代谢最主要的酶系之一, 其中细胞色素P4502E1(CYP2E1)与乙醇代谢密切相关。CYP2E1是一参与体内生理、病理和毒理过程, 有着广泛功能的代谢酶, 其表达水平往往与代谢活性相关且受体内外诸多因素的影响, 如饥饿、禁食及糖尿病均会导致体内CYP2E1水平增高, 其代谢底物可诱导该酶本身的表达等, 而人和大鼠的CYP2E1是由单基因调控^[13], 并且所有CYP2E1的底物在人和动物中都是相同的^[14], 因此, 研究动物的CYP2E1对人具有重要参考意义。乙醇既为CYP2E1特异性代谢底物, 又对其表达具有诱导作用。乙醇对CYP2E1的诱导有两种形式。当血乙醇浓度低时, 通过增加mRNA翻译的效率或稳定翻译后蛋白而增加CYP2E1的活性, 当血乙醇浓度较高时, 则通过增强CYP2E1的基因转录使CYP2E1 mRNA翻译增加而使其活性增高^[15]。CYP2E1具有基因多

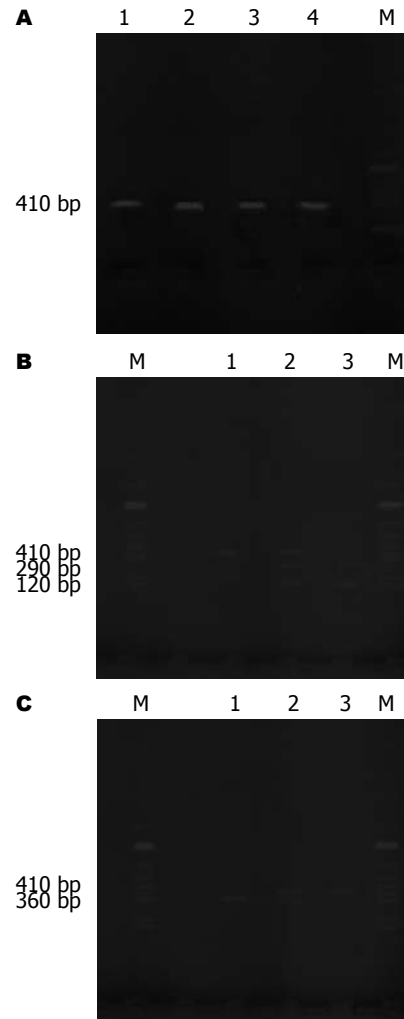


图2 电泳图。A: PCR产物; B: *Pst* I 酶切; C: *Rsa* I 酶切。

肽性, 可能与嗜酒者是否产生酒精性肝损伤有关。Tsutsumi *et al*^[16]对日本的酒精性肝病患者的CYP2E1基因型进行研究, 发现84%酒精性肝病患者带有c2等位基因, 该基因频率比健康对照组或非乙醇性肝病组高2倍以上, 认为c2基因在酒精性肝病的发展中可能起决定作用。本实验研究表明, 模型组中A基因型占26.7%, B基因型占53.3%, C基因型占20%, 即c1基因频率为53.4%, c2基因频率为46.6%。对照组中A基因型占83.3%、B基因型占26.7%、即c1基因频率为91.6%、c2基因频率为8.4%。模型组与对照组相比, c1基因频率明显降低, c2基因频率明显升高, 其差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此, 考虑c2基因在乙醇性肝病的发病中起一定作用。

氧化应激(oxidative stress)是活性氧(ROS)产物增加和抗氧化剂屏障缺失引起的酒精性肝损伤的重要特征。促氧物质增多和抗氧化物质减少的氧化应激可引起细胞内ATP衰竭和谷光甘

肽(GSH)水平下降等一系列改变, 这种改变在中央静脉周围远较门脉周围严重, 最终导致肝细胞死亡. 正常情况下, 体内存在自由基的清除系统, 使自由基处于不断产生和不断被清除的动态平衡中. 一旦机体内保持平衡的因素被破坏, 自由基强大的生物活性就转变为对生物分子的损伤, 引起体内新陈代谢发生混乱及一系列自由基连锁反应加剧, 导致RNA、DNA、蛋白、酶、生物膜的氧化和过氧化损伤, 从而诱发疾病. 机体为避免受到内源性或外源性活性氧的损伤, 在进化过程中形成了一整套代谢ROS的抗氧化系统, 主要由酶和抗氧化剂组成. SOD是生物体内最为重要的抗氧化酶之一, 是清除ROS的第一道防线. 主要清除O₂⁻及防止O₂⁻直接或间接转变为其他形式的自由基, 防止生物膜脂质过氧化损伤. 我们采用400 mL/L乙醇灌胃8 wk后可以看出乙醇灌胃组血清中MDA明显升高, 则SOD明显降低, 且与正常对照组比较有差异显著性, 表明长期乙醇灌胃的动物体内脂质过氧化产物增多, 而且与细胞凋亡程度呈正相关; 长期灌酒后大鼠体内抗氧化产物明显减少, 与细胞凋亡程度呈负相关.

长期乙醇摄入可引起大鼠酒精性肝病及肝功能损伤, 肝细胞凋亡明显增加. CYP2E1基因*Pst* I 及*Rsa* I RFLPs与乙醇性肝病有关, 其中*c2*基因可能与大鼠酒精性肝病的发生有关. MDA含量和SOD活力在酒精性肝病的肝细胞凋亡过程及脂质过氧化反应中发挥重要作用.

4 参考文献

- 1 庄辉. 酒精性肝病的流行病学. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 689
- 2 卿笃信, 凌奇荷. 酒精代谢酶与酒精性肝病的关系研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2003; 23: 310-313
- 3 Koop DR, Coon MJ. Ethanol oxidation and toxicity: role of alcohol P-450 oxygenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 44S-49S
- 4 Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27: 63-68
- 5 Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 778-790
- 6 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 72
- 7 Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med* 2001; 7: 408-413
- 8 Neuman MG. Apoptosis in diseases of the liver. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 109-166
- 9 李伟平, 任浩洋, 张宝阳, 虞朝辉, 厉有名. VEGF在大鼠慢性酒精性肝损伤中的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1766-1770
- 10 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
- 11 Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39: 978-983
- 12 Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* 1996; 271: 27099-27106
- 13 Naveau S, Emilie D, Balian A, Grangeot-Keros L, Borotto E, Portier A, Giraud V, Capron F, Galanaud P, Chaput JC. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 in patients with alcoholic liver disease of increasing severity. *J Hepatol* 1998; 28: 778-784
- 14 Zioli M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, Trinchet JC, Beaugrand M, Guillet JG, Guettier C. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 254-260
- 15 Oneta CM, Simanowski UA, Martinez M, Allali-Hassani A, Pares X, Homann N, Conradt C, Waldherr R, Fiehn W, Coutelle C, Seitz HK. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut* 1998; 43: 612-619
- 16 Tsutsumi M, Takada A, Wang JS. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1994; 107: 1430-1435

■同行评价

本文研究了大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系, 选题较新颖, 研究内容较丰富, 文笔较好, 有一定的学术价值.

编辑 何燕 电编 张敏

CEBPs及其调节的基因与大鼠肝再生相关性分析

王望, 陈晓光, 徐存拴

■背景资料

肝脏具有很强的再生能力, 大鼠部分肝切除模型被广泛用于研究肝再生。肝再生涉及细胞激活、去分化、增殖及调控、再分化和组织结构功能重建等生理生化过程, 受到包括转录因子在内的多种因素调控。

王望, 徐存拴, 河南师范大学生命科学院 河南省新乡市 453007

陈晓光, 河南省科技部共建细胞分化调控重点实验室 河南省新乡市 453007

王望, 河南师范大学生命科学院细胞生物学专业在读硕士研究生, 主要从事肝再生分子机制的研究。

通讯作者: 徐存拴, 453007, 河南省新乡市建设东路46号, 河南师范大学生命科学院. xucs@x263.net

电话: 0373-3326001

收稿日期: 2007-04-24 接受日期: 2007-05-10

Correlation analysis of CCAAT/enhancer-binding proteins and their regulated genes with rat liver regeneration

Wang Wang, Xiao-Guang Chen, Cun-Shuang Xu

Wang Wang, Cun-Shuang Xu, Life Science College of He'nan Normal University, Xinxiang 453007, He'nan Province, China

Xiao-Guang Chen, Key Laboratory of Cell Differentiation and Regulation Co-construction from Science and Technology Department of He'nan Province, Xinxiang 453007, He'nan Province, China

Correspondence to: Cun-Shuang Xu, Life Science College of He'nan Normal University, 46 Jianshe East Road, Xinxiang 453007, He'nan Province, China. xucs@x263.net
Received: 2007-04-24 Accepted: 2007-05-10

Abstract

AIM: To explore the effects on transcription levels of CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBP) genes and genes regulated in liver regeneration (LR).

METHODS: CEBP family transcription factors correlated with LR were input into the websites of NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) and RGD (rgd.mcg.edu). Documents related to the transcription functions of CEBP family transcription factors were located and the CEBP family downstream target genes in human, rat and mice obtained. The human and mice non-repeated genes in rat genes were screened out; the results were confirmed by comparison by Rat Genome 230 2.0 chip examination. Twice up-regulated and down-regulated genes were regarded as significantly changed rat homologous genes. The Rat Genome 230 2.0 chips were used to detect the expressions of the above genes in rat RL. Genes

correlated with liver regeneration were confirmed by comparison in a true and false operation.

RESULTS: Twenty-seven genes correlated with LR, 11 of which were up-regulated, 6 down-regulated, and 10 that were up-regulated at certain time points but down-regulated at others. The up-regulated range was 2 to 128 fold of the comparison group, while the down-regulated range was 2 to 16 fold. The number of genes expressed in the LR initiation [0.5-4 hours after partial hepatectomy (PH)], G₀/G₁ transition (4-6 hours after PH), cell proliferation (6-66 hours after PH) and cell differentiation and tissue structure reconstruction (72-168 hours after PH) stages were 18, 3, 8 and 1, respectively. Total expression times were 18, 11, 25 and 16, respectively, showing that the correlated genes were primarily expressed in the LR initiation stage. Genes were up-regulated 126 fold and down-regulated 76 fold, indicating that more genes were up-regulated than down-regulated in LR.

CONCLUSION: CEBPs and their regulated genes are highly correlated with cell proliferation, cell differentiation, cell apoptosis, inflammation, stress response, lipids metabolism and changes in the extracellular matrix.

Key Words: Partial hepatectomy; Rat genome 230 2.0 chip; CCAAT/enhancer-binding proteins; Liver regeneration correlated genes

Wang W, Chen XG, Xu CS. Correlation analysis of CCAAT/enhancer-binding proteins and their regulated genes with rat hepatic regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2186-2193

摘要

目的: 探讨基因转录水平CCAAT增强子结合蛋白(CEBPs)及其调节基因在肝再生(LR)中的作用。

方法: 将与肝再生相关的CEBPs家族转录因子输入NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)和RGD(rgd.mcg.edu)等网站查找与其转录功能相关的文献, 从中得出大鼠、小鼠和人的

CEBPs家族下游基因. 然后将人和小鼠基因与大鼠比对, 筛选出与大鼠不重复的人和小鼠基因. 再将他们与Rat Genome 230 2.0芯片的检测结果进行比对确认, 把其中表达上调或下调2倍以上的基因视为有意义变化的大鼠同源基因. 用Rat Genome 230 2.0芯片检测他们在大鼠再生肝中的表达情况, 用真、假手术比较方法确定肝再生相关基因.

结果: 27个基因与肝再生相关, 其中11个基因表达上调, 6个基因表达下调, 10个基因在有的时点表达上调, 有的时点表达下调(简称上/下调表达). 他们的上调范围为对照的2-128倍, 下调范围为对照的2-16倍. 肝再生启动[部分肝切除(PH)后0.5-4 h]、G₀/G₁过渡(PH后4-6 h)、细胞增殖(PH后6-66 h)、细胞分化和组织结构功能重建(PH后72-168 h)等4个阶段起始表达的基因数分别为18, 3, 8和1; 基因的总表达次数分别为18, 11, 25和16. 表明相关基因主要在肝再生启动阶段起始表达, 在不同阶段发挥作用. 他们共表达上调126次, 下调76次. 表明肝再生中表达上调基因多于表达下调基因.

结论: CEBPs及其调节的基因与肝再生中细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、炎症反应、应激反应、脂类代谢和细胞外基质变化等密切相关.

关键词: 部分肝切除; 大鼠基因组230 2.0芯片; CCAAT增强子结合蛋白; 肝再生相关基因

王望, 陈晓光, 徐存拴. CEBPs及其调节的基因与大鼠肝再生相关性分析. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2186-2193
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2186.asp

0 引言

部分肝切除(partial hepatectomy, PH)^[1]或肝损伤后, 残肝细胞通过细胞增殖(细胞数目增加)和肥大(细胞体积增加)由基本不生长状态转变为快速生长状态以补偿丢失、损伤的肝组织^[2-3], 这个过程称为肝再生(liver regeneration, LR)^[2]. 同时, 机体可精确感知再生肝的大小, 适时停止再生^[4]. 通常, 根据细胞的生理活动将肝再生分为启动(PH后0.5-4 h)、G₀/G₁过渡(PH后4-6 h)、细胞增殖(PH后6-66 h)、细胞分化和组织结构功能重建(PH后72-168 h)等4个阶段^[5]. 根据时间进程分为早期(PH后0.5-4 h)、前期(PH后6-12 h)、中期(PH后16-66 h)、后期(PH后72-168 h)等4个时期^[6]. 涉及细胞激活、去分化、增殖及调控、再分化、组织结构和功能重建等生理生

化过程^[7], 受到包括转录因子在内的多种因素调控^[8]. 研究表明, CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding proteins, CEBPs)家族转录因子CEBP α , CEBP β , CEBP γ , CEBP δ 和CEBP ϵ 均含碱性亮氨酸拉链结构域, 在C端有DNA结合元件和异源或同源亮氨酸拉链元件. CEBP α 通过调节scd1, cd36和cds1^[9], CEBP β 通过调节afp^[10], a2m^[11], gsta2^[12], cat^[13], il6, colla2和col2a1^[14], CEBP γ 通过调节ercc5和xrcc1^[15], CEBP δ 通过调节ccl2^[16], CEBP ϵ 通过调节il6, ccl2, ccl4, csf1r^[17], itgam, bcl2l1, bcl2, ccna2, ccnd2, ccne1和cdk4^[18], 从而在细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、炎症反应、应激反应、脂类代谢和细胞外基质变化等方面发挥重要作用. 为在基因转录水平^[19-20]了解CEBPs及其调节基因与肝再生的相关性, 我们用含42个CEBPs及其调节基因的Rat Genome 230 2.0芯片^[21]检测了大鼠2/3肝切除后再生肝基因表达情况, 并初步分析了他们在肝再生中的表达方式与肝再生的相关性和作用^[22].

1 材料和方法

1.1 材料 SD纯系大鼠由河南师范大学实验动物中心提供, 体质量200-250 g, 将大鼠随机分组, 每组6只, 雌雄各半. 对照组材料为正常成年大鼠肝. 按Higgins *et al*^[1]方法切除大鼠肝左叶和中叶后恢复0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 96, 120, 144和168 h时再生肝. 于相应恢复时间颈椎脱臼处死动物, 切取再生肝置4℃ PBS中涮洗3次, 从右叶再生肝中部取100-200 mg组织, 将每组的6个样品混合后放到一起(总肝量为0.1-0.2 g \times 6 = 1-2 g), 于-80℃保存备用. 假手术(sham-operation, SO)组除不切除肝叶外, 其他同部分肝切除组. 实验中严格遵循中国动物保护法. 总RNA提取按Invitrogen公司的TRIzol试剂盒操作程序进行^[23]. 总RNA纯化按Qiagen公司的RNeasy mini试剂盒操作程序进行^[24]. 用琼脂糖凝胶电泳(180 V, 0.5 h)检测总RNA的28S和18S比例; 其亮度约为2:1; 在260/280 nm波长下测定总RNA浓度和纯度^[25].

1.2 方法 cDNA, cRNA合成按Affymetrix公司方法进行^[26]. 合成cDNA时, 模板量为1-8 μ g总RNA. 合成生物素标记的cRNA时, 取12 μ L上述cDNA溶液作模板. cDNA, cRNA纯化按基因芯片分析样品纯化操作程序进行^[27]. 两者的浓度、纯度和质量检测方法同上^[25]. 1 g/L的cRNA 15 μ L, 5 \times 片段化缓冲液6 μ L, 无RNA酶水9 μ L

■ 研发前沿
再生生物学和再生医学已成为当今生物学和医学的研究热点. 其中, 肝再生的功能基因组学、蛋白质组学、细胞组学等研究正在广泛深入地进行.

■ 相关报道

研究表明, CEBPs家族转录因子对细胞增殖和细胞分化等相关基因有调控作用, 肝再生亦涉及CEBPs对细胞增殖和细胞分化等相关基因

的调节. 混匀, 94°C温浴35 min, 得到长度为35-200 bp的cRNA片段. 按Affymetrix公司提供的配方配制杂交液, 然后将杂交液加至经预杂交处理的Rat Genome 230 2.0芯片中, 于45°C 60 r/min杂交16 h, 吸去杂交液, 用GeneChip全自动洗涤工作站450(Affymetrix公司, USA)洗涤和染色芯片. 用高分辨芯片扫描仪3000(Affymetrix公司, USA)扫描芯片, 获得基因表达信号值^[21]. 用GCOS1.2软件读取、处理信号值数据, 获得归一化后的信号值、信号检出(P, A, M)以及实验和对照组的比值^[21]. 为减少芯片分析误差, 用Rat Genome 230 2.0芯片对每个时点再生肝重复检测3次. 把3次检测中总比值最大的那次结果视为最接近真实(R^m), 同时, 也将3次检测中3个持家基因(β -actin, hexokinase和glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)平均值最接近1的那次结果视为最接近真实(R^h). 将前者比后者, 得到矫正系数, 用矫正系数乘以后者每个时点每个基因对应的比值, 得到用于分析基因表达模式和作用的基因相对表达丰度. 为克服芯片分析误差导致的基因不合常规和/或不合逻辑的表达变化, 又根据肝再生中肝实质细胞的细胞周期进程, 用合理化分析软件(RAP)整理部分肝切除后0-4 h, 6-12 h, 12-24 h的基因表达变化值使之更具科学性. 然后用GeneMath, GeneSpring, Microsoft Excel等分析软件对各组数据进行统计和聚类分析^[21,27-28].

将查出的与肝再生相关的CEBPs家族转录因子输入NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)和RGD(rgd.mcw.edu)等网站查找与其转录功能相关的文献, 从中得出大鼠、小鼠和人的CEBPs家族下游基因. 然后将人和小鼠基因与大鼠比对, 筛选出与大鼠不重复的人和小鼠基因. 再将他们与Rat Genome 230 2.0芯片的检测结果进行比对确认, 把其中表达上调或下调2倍以上的基因视为有意义变化^[28]的大鼠同源基因. 用上述芯片对再生肝进行检测, 将3次检验结果相同或相似, 至少在部分肝切除后一个时点表达上调或下调2倍以上, 部分肝切除组与假手术组差异显著($P < 0.05$)或极显著($P \leq 0.01$)的基因视为肝再生相关基因.

2 结果

2.1 肝再生中CEBPs及其调节基因的表达 查NCBI, RGD网站资料表明, 46个基因受CEBPs调节; 查Rat Genome 230 2.0芯片资料表明, 该芯片

含上述42个基因, 其中27个基因至少在部分肝切除(partial hepatectomy, PH)后一个时点发生了有意义表达变化, 部分肝切除组与SO组有显著或极显著差异, 3次Rat Genome 230 2.0芯片检测结果具有可重复性. 因此, 初步确认这些基因与LR相关. 其中, 11个基因表达上调, 6个基因表达下调, 10个基因在有的时点表达上调, 有的时点表达下调(简称上/下调表达). 他们的上调范围为对照的2-128倍, 下调范围为对照的2-16倍(表1).

分析表明, 肝再生各时点起始上调和下调及总表达的基因数为: 0.5 h时均为6和3; 1 h时3和1, 7和2; 2 h时2和0, 7和1; 4 h时1和2, 6和3; 6 h时0和0, 7和4; 8 h时0和1, 5和5; 12 h时0和0, 4和5; 16 h时1和0, 6和5; 18 h时0和2, 7和7; 24 h时1和0, 6和6; 30 h时1和0, 4和2; 36 h时0和0, 5和5; 42 h时1和0, 5和1; 48 h时0和0, 8和5; 54 h时0和0, 7和4; 60 h时0和1, 7和5; 66 h时0和0, 7和2; 72 h时1和0, 7和4; 96 h时0和0, 4和3; 120 h时0和0, 6和1; 144 h时0和0, 1和2; 168 h时0和0, 3和1. 肝再生中基因起始表达的总体情况是: 17个基因起始上调, 10个基因起始下调. 其中, 在启动阶段(PH后0.5-4 h)12个基因起始上调, 6个基因起始下调; G_0/G_1 过渡阶段(PH后4-6 h)1个基因起始上调, 2个基因起始下调; 细胞增殖阶段(PH后6-66 h)4个基因起始上调, 4个基因起始下调; 细胞再分化和组织结构功能重建阶段(PH后72-168 h)1个基因起始上调. 肝再生中基因表达的总体情况是: 共表达上调126次, 下调76次. 其中, 肝再生启动阶段(PH后0.5-4 h)基因上调26次, 下调9次; G_0/G_1 过渡阶段(PH后4-6 h)基因上调13次, 下调7次; 细胞增殖阶段(PH后6-66 h)基因上调79次, 下调56次; 细胞再分化和组织结构功能重建阶段(PH后72-168 h)基因上调21次, 下调11次(图1).

2.2 CEBPs及其调节的基因与肝再生相关性 根据功能和表达变化将CEBPs及其调节的22个基因分为7组: (1)细胞增殖相关基因. 其中, *cebpa*在4-66 h表达下调, 其调节的*scd1*在1-6 h表达上调, 48和66 h表达下调. *cebpb*在0.5-8 h表达上调, 他调节的*a2m*在0.5-24 h表达上调, *afp*在6-12 h表达下调, 54-72 h表达上调. *cebpe*在16-120 h表达下调, 其调节的*ccna2*在18-72 h表达上调, *ccnd2*在42 h表达上调, *ccne1*在8-72 h表达上调, *cdk4*在24和66 h表达上调(图2A); (2)细胞分化相关基因. 其中, *cebpa*及其调节的*scd1*表达同上. *cebpe*调节的*il6*在2-8, 18, 48, 60, 96 h表达上调, 在36

表 1 CEBPs及其调节的22个基因在肝再生中表达丰度

名称	Abbr.	Fold difference
CEBPs转录因子		
CCAAT/enhancer binding protein alpha	Cebpa	0.06
CCAAT/enhancer binding protein beta	Cebpb	3.07
CCAAT/enhancer binding protein gamma	Cebpg	0.44
CCAAT/enhancer binding protein delta	Cebpd	6.27, 0.40
CCAAT/enhancer binding protein epsilon	Cebpe	0.14
细胞增殖		
Cebpa stearyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	3.48, 0.29
Cebpb alpha-2-macroglobulin	A2m	46.16, 0.40
alpha-fetoprotein	Afp	3.72, 0.14
Cebpe cyclin A2	Ccna2	45.07
cyclin E	Ccne1	18.47
cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	2.47
cyclin D2	Ccnd2	2.23
细胞分化		
Cebpa stearyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	3.48, 0.29
Cebpe integrin alpha M	Itgam	3.41
Cebpb/Cebpe interleukin 6	Il6	6.06, 0.28
凋亡		
Cebpa stearyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	3.48, 0.29
Cebpb glutathione-S-transferase	Gsta2	6.96, 0.22
Cebpg excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 5	Ercc5	2.38
Cebpb/Cebpd/Cebpe hemokine C-C motif ligand 2	Ccl2	128.00
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	0.32
bcl2-like 1	Bcl2l1	3.00, 0.44
炎症反应		
Cebpb alpha-2-macroglobulin	A2m	46.16, 0.40
Cebpb/Cebpd/Cebpe chemokine C-C motif ligand 2	Ccl2	128.00
colony stimulating factor 1 receptor	Csf1r	13.00
integrin alpha M	Itgam	3.41
chemokine C-C motif ligand 4	Ccl4	4.00, 0.22
应激反应		
Cebpb catalase	Cat	5.00
glutathione -S-transferase	Gsta2	6.96, 0.22
Cebpb/Cebpe interleukin 6	Il6	6.06, 0.28
Cebpg excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 5	Ercc5	2.38
x-ray repair cross-complementing group 1 protein	Xrcc1	5.00, 0.31
脂质代谢		
Cebpa CDP-diacylglycerol synthase 1	Cds1	0.29
CD36 antigen	Cd36	0.10
stearyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	3.48, 0.29
细胞外基质		
Cebpb rocollagen, type I alpha 2	Col1a2	7.00
procollagen, type II alpha 1	Col2a1	7.00, 0.30

■创新盘点
 用高通量 R a t Genome 230 2.0 基因表达谱芯片分析了大鼠2/3肝切除后CEBPs及其调节的基因在肝再生中表达情况,发现上述基因中有27个基因与肝再生相关。

黑体字: 转录因子; 非黑体字: 转录因子调节的基因.

■应用要点
根据结果进一步
研究CEBPs及其
调控的基因在肝
再生中的作用和
机制。

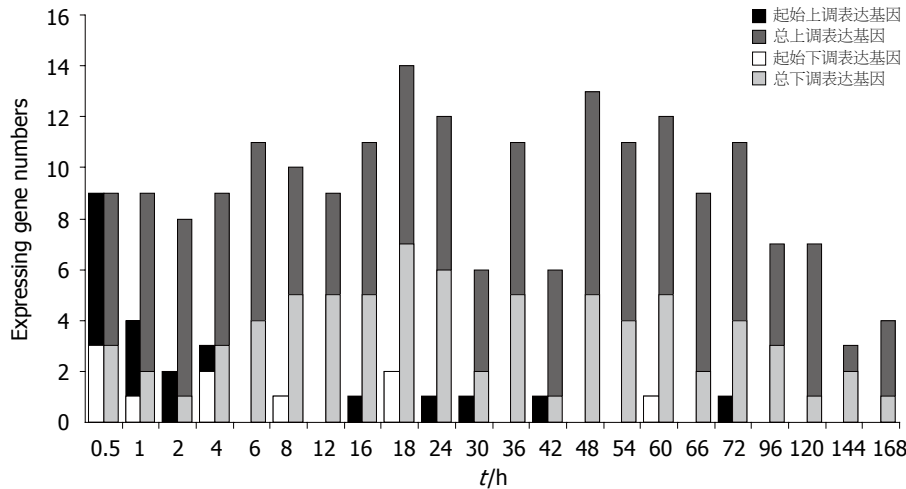


图1 CEBPs及其调
节的22个基因在肝
再生各时点起始表
达及总表达情况。

和72 h表达下调, *itgam*在72和120 h表达上调(图2B); (3)细胞凋亡相关基因. 其中, *cebpa*及其调节的*scd1*表达同上. *cebpb*调节的*gsta2*在8-24 h表达下调, 在30, 42, 96 h表达上调. *cebpg*在60 h表达下调, 其调节的*ercc5*在30 h表达上调. *cebpd*在1-72 h表达上调, 其调节的*ccl2*在12-120 h表达上调. *cebpe*调节的*bcl2*在18-72 h表达下调, *bcl2l1*在0.5 h表达下调, 在6 h表达上调(图2C); (4)炎症反应相关基因. 其中, *cebpb*及其调节的*a2m*, *cebpd*及其调节的*ccl2*, *cebpe*及其调节的*ccl2*和*itgam*表达同上. *cebpe*调节的*ccl4*在18, 54, 96 h表达下调, *csf1r*在16, 30, 42, 96 h表达上调(图2D); (5)应激反应相关基因. *cebpb*及其调节的*gsta2*和*il6*表达同上, *cat*在0.5 h表达上调. *cebpg*及其调节的*ercc5*表达同上, *xrcc1*在36, 48, 60 h表达上调, 在1和144-168 h表达下调(图2E); (6)脂类代谢相关基因. *cebpa*及其调节的*scd1*表达同上, *cd36*在0.5-72 h表达下调, *cds1*在4-18 h表达下调(图2F); (7)细胞外基质变化相关基因. *cebpb*调节的*colla2*在16-24 h和66-168 h表达上调, *col2a1*在2和54 h表达上调, 在24 h表达下调(图2G).

3 讨论

我们研究了CEBP家族转录因子CEBP α , CEBP β , CEBP γ , CEBP δ 和CEBP ϵ 及其调节的基因与肝再生相关性. 其中, *cebpa*通过促进*cds1*, *cd36*和*scd1*转录促进脂类合成^[9,29]. *cds1*在肝再生的4-18 h, *cd36*在0.5-72 h, *scd1*在48和66 h表达下调, 可能受*cebpa*在4-66 h表达下调影响, 并推测肝再生早期、前期和中期的脂类合成受抑制. 此外, *scd1*还能通过改变细胞膜流动性和影响信号转导抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和促进细胞分化^[30]. *cebpa*在4-66 h及*scd1*在48和66 h表达下调

可能与肝再生中期的细胞增殖和分化减弱、细胞凋亡起始有关. 一般认为, *cebpb*通过抑制*cat*转录促进氧化应激反应^[13]. *cebpb*在0.5-8 h表达上调, *cat*在0.5 h表达上调, *cat*表达可能还受其他因素促进, 并在抑制肝再生早期的氧化应激反应中起重要作用. *cebpb*能促进*colla2*转录和抑制*col2a1*转录^[14]. 后者均促进胶原蛋白基因表达. 推测3者的转录平衡与再生肝的胞外基质构建调控密切相关. *cebpb*还是促细胞增殖基因*afp*的主要促进因子^[10,31]. *afp*在54-72 h表达上调, 与*cebpb*共同促进肝再生中期和后期的细胞增殖. *cebpb*通过促进*a2m*转录抑制蛋白酶活性促进细胞增殖^[11,32]. *a2m*在0.5-24 h表达上调, 在8 h达到高峰, 是对照的46倍. 可能他在肝再生的细胞激活、细胞周期进程和缓解炎症反应中起重要作用. *cebpb*通过促进*gsta2*转录抑制细胞凋亡, 参与药物反应来防止化学物诱导的细胞癌变^[12,33-34]. *gsta2*在8-24 h表达下调, 在30, 42和96 h表达上调. 推测前期和中期再生肝细胞的抗癌变能力降低, 中期和后期细胞生存能力提高.

研究表明, *cebpg*促进DNA损伤修复基因*xrcc1*表达^[15,35]. 前者在PH后60 h表达下调, 后者在144-168 h表达下调. 推测肝再生后期的DNA损伤修复活动减少. 此外, *cebpg*通过促进*ercc5*转录促进DNA氧损伤修复和抑制细胞凋亡^[15,36]. *ercc5*在30 h表达上调, 可能与肝再生中期的DNA修复活动加强有关. 研究表明, *cebpe*通过抑制*ccnd2*, *ccne1*和*cdk4*抑制细胞增殖^[18,37-39], 前者在肝再生的16-120 h表达下调, 后3者在8-72 h表达上调, 推测促进相应时期的细胞增殖. *cebpe*通过抑制*bcl2l1*促进细胞凋亡^[18]. 后者在6 h表达上调, 可能与肝再生前期的细胞抗凋亡能力提高有关. *cebpe*还能通过促进*csf1r*和*ccl4*转录促进炎

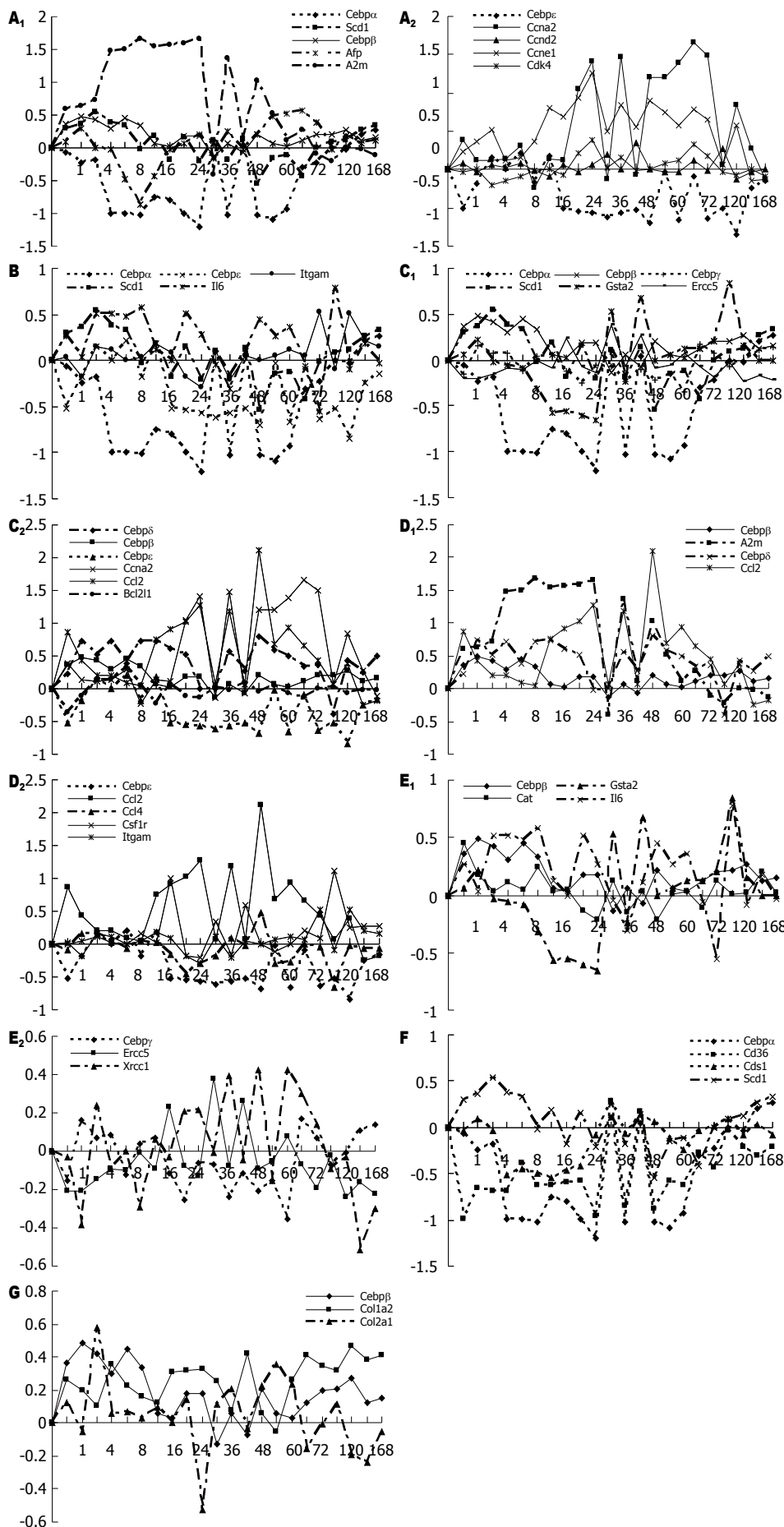


图 2 CEBPs及其调节的22个基因在肝再生中表达变化. A: 细胞增殖相关基因; B: 细胞分化相关基因; C: 细胞凋亡相关基因; D: 炎症反应相关基因; E: 应激反应相关基因; F: 脂类代谢相关基因; G: 细胞外基质变化相关基因. 实线示基因表达上调, 虚线示基因表达下调; 实-虚线示上/下调表达基因. X轴为部分肝切除后恢复时间(h), Y轴为各时点基因表达产物信号值与对照比值的对数.

■名词解释
 部分肝切除(PH): 是 Higgins 和 Anderson于1931年建立的通过外科手术切除大鼠2/3肝脏的方法. 部分肝切除诱导的肝再生(LR)是指用外科手术切除大鼠2/3肝脏后, 残肝细胞通过细胞增殖(细胞数目增加)和肥大(细胞体积增加)由基本不生长状态转变为快速生长状态以补偿丢失的肝组织.

■同行评价

本文系统观察了肝损伤后不同时相CEBPs及其调控的基因的表达变化,文章设计合理,结果分析准确,条理清晰,结果对探讨创伤性肝损伤后肝再生的基因调控机制有重要参考意义。

症反应^[18,40-41]. ccl4在肝再生中表达下调, csflr表达上调. 推测炎症反应受3者的平衡调控. cebpε通过抑制bc12转录促进细胞凋亡^[18,42]. 后者在18-72 h表达下调,可能还受其他因素抑制. cebpε还能通过抑制ccna2转录抑制细胞增殖^[18,43]. 后者几乎在整个肝再生中表达上调,在66 h达到高峰,是对照的45倍. 可能在肝再生的细胞增殖中起重要作用. cebpε通过促进itgam表达促进细胞分化和炎症反应^[18,44-45]. 后者在72和120 h表达上调,推测尚存在促进itgam表达的其他因素. 研究表明, ccl2有抑制细胞凋亡和促进炎症反应的功能^[46-47]. 其表达除受cebpb和cebpe促进外,还受cebpd促进^[16]. cebpd在1-72 h表达上调, ccl2在12-120 h表达上调,并在48 h达到高峰,是对照的128倍. 根据其表达趋势与cebpb和cebpd更为一致推测,肝再生中ccl2表达主要受cebpb和cebpd促进,并在抑制再生肝细胞凋亡中起重要作用. cebpb和cebpe促进il6的转录^[17]. il6是体温调节因子,能促进细胞分化,还与出血导致的肝脏功能紊乱有关^[48-50]. 他在2-8 h表达上调,在16 h后的有些时点上调,有些时点下调. 3者在肝再生中的作用和相互关系有待进一步研究.

总之,我们用高通量基因表达谱芯片分析了大鼠部分肝切除后CEBPs及其调节的基因在肝再生中表达情况,初步证实他们与再生肝的细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、炎症反应、应激反应、脂类代谢、细胞外基质建成等有关. 然而,从基因→mRNA→蛋白质→功能等受包括蛋白互作在内的多种因素影响,以及同一基因受多个转录因子调控等情况今后我们将进一步用Northern印迹、蛋白质芯片、RNA干扰、蛋白互作等技术验证上述结果.

4 参考文献

- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *J Arch Pathol* 1931; 12: 186-222
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-53
- 徐存控, 赵利峰, 杨柯金, 章静波. 肝干细胞的来源与作用. *实验生物学报* 2004; 37: 72-77
- Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 556-562
- Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-134
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847
- Pahlavan PS, Feldmann RE Jr, Zavos C, Kountouras J. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res* 2006; 134: 238-251
- Chang YJ. Mitochondrial calcium ion and oxidative phosphorylation in regenerating rat liver. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 189-194
- Zhang F, Pan T, Nielsen LD, Mason RJ. Lipogenesis in fetal rat lung: importance of C/EBPalpha, SREBP-1c, and stearoyl-CoA desaturase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 174-183
- Thomassin H, Hamel D, Bernier D, Guertin M, Belanger L. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3091-3098
- Milosavljevic TS, Petrovic MV, Cvetkovic ID, Grigoriy II. DNA binding activity of C/EBPbeta and C/EBPdelta for the rat alpha2-macroglobulin gene promoter is regulated in an acute-phase dependent manner. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 918-926
- Ki SH, Cho IJ, Choi DW, Kim SG. Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4150-4165
- Taniguchi M, Hashimoto M, Hori N, Sato K. CCAAT/enhancer binding protein-beta (C/EBP-beta), a pivotal regulator of the TATA-less promoter in the rat catalase gene. *FEBS Lett* 2005; 579: 5785-5790
- Imamura T, Imamura C, Iwamoto Y, Sandell LJ. Transcriptional Co-activators CREB-binding protein/p300 increase chondrocyte Cd-rap gene expression by multiple mechanisms including sequestration of the repressor CCAAT/enhancer-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 16625-16634
- Mullins DN, Crawford EL, Khuder SA, Hernandez DA, Yoon Y, Willey JC. CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. *BMC Cancer* 2005; 5: 141
- Sekine O, Nishio Y, Egawa K, Nakamura T, Maegawa H, Kashiwagi A. Insulin activates CCAAT/enhancer binding proteins and proinflammatory gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 36631-36639
- Williams SC, Du Y, Schwartz RC, Weiler SR, Ortiz M, Keller JR, Johnson PF. C/EBPepsilon is a myeloid-specific activator of cytokine, chemokine, and macrophage-colony-stimulating factor receptor genes. *J Biol Chem* 1998; 273: 13493-13501
- Nakajima H, Watanabe N, Shibata F, Kitamura T, Ikeda Y, Handa M. N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 14494-14502
- Xu CS, Chang CF, Yuan JY, Li WQ, Han HP, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB. Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2932-2940
- Dransfeld O, Gehrman T, Kohrer K, Kircheis G, Holneicher C, Haussinger D, Wettstein M. Oligonucleotide microarray analysis of differential transporter regulation in the regenerating rat liver. *Liver Int* 2005; 25: 1243-1258
- Collins JF. Gene chip analyses reveal differential

- genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol Res* 2006; 39: 25-37
- 22 Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, Stack R, Becker JW, Montgomery JR, Vainer M, Johnston R. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E41-41
- 23 Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis A. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3532-3536
- 24 Nuyts S, Van Mellaert L, Lambin P, Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. *J Microbiol Methods* 2001; 44: 235-238
- 25 Arkin A, Ross J, McAdams HH. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambda-infected *Escherichia coli* cells. *Genetics* 1998; 149: 1633-1648
- 26 Li L, Roden J, Shapiro BE, Wold BJ, Bhatia S, Forman SJ, Bhatia R. Reproducibility, fidelity, and discriminant validity of mRNA amplification for microarray analysis from primary hematopoietic cells. *J Mol Diagn* 2005; 7: 48-56
- 27 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14863-14868
- 28 Werner T. Cluster analysis and promoter modelling as bioinformatics tools for the identification of target genes from expression array data. *Pharmacogenomics* 2001; 2: 25-36
- 29 Weeks R, Dowhan W, Shen H, Balantac N, Meengs B, Nudelman E, Leung DW. Isolation and expression of an isoform of human CDP-diacylglycerol synthase cDNA. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 281-289
- 30 Kim YC, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 1-4
- 31 Li MS, Li PF, Yang FY, He SP, Du GG, Li G. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells. *Cell Res* 2002; 12: 151-156
- 32 Rajan S, Radhakrishnan J, Rajamanickam C. Direct injection and expression in vivo of full-length cDNA of the cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin induces cardiac hypertrophy in the rat heart. *Basic Res Cardiol* 2003; 98: 39-49
- 33 Xie J, Shults K, Flye L, Jiang F, Head DR, Briggs RC. Overexpression of GSTA2 protects against cell cycle arrest and apoptosis induced by the DNA inter-strand crosslinking nitrogen mustard, mechlorethamine. *J Cell Biochem* 2005; 95: 339-351
- 34 Kang KW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 53-66
- 35 Audebert M, Salles B, Weinfeld M, Calsou P. Involvement of polynucleotide kinase in a poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* 2006; 356: 257-265
- 36 Clement V, Dunand-Sauthier I, Clarkson SG. Suppression of UV-induced apoptosis by the human DNA repair protein XPG. *Cell Death Differ* 2006; 13: 478-488
- 37 Kukoski R, Blonigen B, Macri E, Renshaw AA, Hoffman M, Loda M, Datta MW. p27 and cyclin E/D2 associations in testicular germ cell tumors: implications for tumorigenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11: 138-143
- 38 Matsumoto Y, Maller JL. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 2004; 306: 885-888
- 39 Berthet C, Klarmann KD, Hilton MB, Suh HC, Keller JR, Kiyokawa H, Kaldis P. Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev Cell* 2006; 10: 563-573
- 40 Le Meur Y, Tesch GH, Hill PA, Mu W, Foti R, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-fms pathway. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 530-537
- 41 Zipfel PF, Balke J, Irving SG, Kelly K, Siebenlist U. Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. *J Immunol* 1989; 142: 1582-1590
- 42 Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TL, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-1132
- 43 Shen WH, Jackson ST, Broussard SR, McCusker RH, Strle K, Freund GG, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. IL-1beta suppresses prolonged Akt activation and expression of E2F-1 and cyclin A in breast cancer cells. *J Immunol* 2004; 172: 7272-7281
- 44 Wu H, Rodgers JR, Perrard XY, Perrard JL, Prince JE, Abe Y, Davis BK, Dietsch G, Smith CW, Ballantyne CM. Deficiency of CD11b or CD11d results in reduced staphylococcal enterotoxin-induced T cell response and T cell phenotypic changes. *J Immunol* 2004; 173: 297-306
- 45 Piloni MR, Agosto LM, Kennett MJ, Harvill ET. CD11b is required for the resolution of inflammation induced by *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection. *Cell Microbiol* 2006; 8: 758-768
- 46 Eugenin EA, D'Aversa TG, Lopez L, Calderon TM, Berman JW. MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J Neurochem* 2003; 85: 1299-1311
- 47 Mirzadegan T, Diehl F, Ebi B, Bhakta S, Polsky I, McCarley D, Mulkins M, Weatherhead GS, Lapierre JM, Dankwardt J, Morgans D Jr, Wilhelm R, Jarnagin K. Identification of the binding site for a novel class of CCR2b chemokine receptor antagonists: binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle. *J Biol Chem* 2000; 275: 25562-25571
- 48 De Jongh RF, Vissers KC, Booij LH, De Jongh KL, Vincken P, Meert TF. Interleukin-6 and perioperative thermoregulation and HPA-axis activation. *Cytokine* 2003; 21: 248-256
- 49 Takanaga H, Yoshitake T, Hara S, Yamasaki C, Kunimoto M. cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6. *J Biol Chem* 2004; 279: 15441-15447
- 50 Toth B, Yokoyama Y, Schwacha MG, George RL, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Insights into the role of interleukin-6 in the induction of hepatic injury after trauma-hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 2004; 97: 2184-2189

胃癌细胞SGC7901中STAT1, NF- κ B p65和caspase 8的关系

向春香, 邓昊, 罗海莲, 刘丽江

■背景资料

胃癌是严重危害人类健康的最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在我国居恶性肿瘤的第2位, 和其他恶性肿瘤一样, 原癌基因的激活、抑癌基因的突变是胃癌形成的重要分子基础之一, 但胃癌的基因异常大多缺乏特异性, 因此胃癌发生的分子机制仍然模糊不清。近年研究发现, 细胞凋亡与细胞增殖平衡失调在胃癌发生中具有重要意义。

向春香, 邓昊, 罗海莲, 刘丽江, 江汉大学肿瘤研究所 湖北省武汉市 430056
向春香, 2005级武汉大学医学院病理学与病理生理学系硕士生, 现在江汉大学肿瘤研究所工作。
武汉市科技攻关计划引导项目, No. 20025007170
武汉市青年晨光计划项目, No. 20045006071-7
通讯作者: 刘丽江, 430056, 湖北省武汉市, 江汉大学肿瘤研究所, liulijiang@163.com
电话: 027-84226503
收稿日期: 2007-04-05 接受日期: 2007-04-28

Relationship of signal transduction and activators of transcription 1, nuclear factor κ B p65 and caspase 8 in gastric cancer cell line SGC7901

Chun-Xiang Xiang, Hao Deng, Hai-Lian Luo, Li-Jiang Liu

Chun-Xiang Xiang, Hao Deng, Hai-Lian Luo, Li-Jiang Liu, Tumor Institute of Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Supported by: The Key Item from Science and Technology Program of Wuhan City, No. 20025007170 and the Chengguang Project for Youth of Wuhan City, No. 20045006071-7
Correspondence to: Pro. Li-Jiang Liu, Tumor Institute of Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com
Received: 2007-04-05 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To discuss the relationship between signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and apoptotic factor caspase 8, to elucidate the possible mechanism of apoptosis in the human gastric cancer cell line SGC7901.

METHODS: SGC7901 cells were treated with IFN- γ and STAT1 antisense oligonucleotides (ASONS). The mRNA expression for STAT1, NF- κ B p65 and caspase 8 was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: When SGC7901 cells were treated with IFN- γ 1000 U, at 0.5, 3 and 24 h, the mRNA levels for STAT1 and NF- κ B p65 expression were up-regulated; there was also a positive cor-

relation between STAT1 and NF- κ B p65 expression ($r = 0.403$, $P = 0.009$). With STAT1 ASONS, STAT1 expression was down-regulated, while NF- κ B p65 expression was up-regulated; in the mRNA levels, there was a negative correlation between STAT1 and NF- κ B p65 ($r = -0.556$, $P = 0.015$). There was no significant correlation between caspase 8 and STAT1 or NF- κ B p65. When SGC7901 cells were treated with IFN- γ 1000 U and STAT1 ASONS, there was a negative correlation between mRNA levels of STAT1 and NF- κ B p65 ($r = -0.783$, $P < 0.05$). IFN- γ up-regulated caspase 8 expression; there was a negative correlation with STAT1 ($r = -0.783$, $P = 0.002$), but a positive correlation with NF- κ B p65 ($r = -0.667$, $P = 0.002$).

CONCLUSION: IFN- γ can up-regulate the mRNA levels of STAT1, NF- κ B p65 and caspase 8. mRNA levels of STAT1 and NF- κ B p65 were negatively correlated. Caspase 8 had a negative correlation with STAT1, but a positive correlation with NF- κ B p65.

Key Words: Gastric cancer; SGC7901 cells; Nuclear factor- κ B p65; Signal transducer and activator of transcription 1; Caspase 8; Reverse transcription polymerase chain reaction

Xiang CX, Deng H, Luo HL, Liu LJ. Relationship of signal transduction and activators of transcription 1, nuclear factor κ B p65 and caspase 8 in gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2194-2200

摘要

目的: 探讨信号转导子与转录活化因子1 (STAT1)、核因子 κ B(NF- κ B) p65和凋亡因子 caspase 8在胃癌细胞SGC7901中的关系。

方法: SGC7901细胞经IFN- γ 及STAT1反义寡核苷酸(STAT1ASON)处理后, 应用RT-PCR方法检测STAT1, NF- κ B p65和caspase 8在mRNA水平的改变。

结果: IFN- γ (1000 U)处理SGC7901细胞, 在

0.5, 3和24 h, STAT1和NF- κ B p65在mRNA水平出现先下降后上升的变化, 二者呈正相关关系($r = 0.403, P = 0.009$); 使用不同浓度的STAT1ASON处理SGC7901细胞24 h, 在mRNA水平, STAT1和NF- κ B p65呈负相关关系($r = -0.556, P = 0.015$); IFN- γ 和不同浓度的STAT1ASON联合作用处理SGC7901细胞24 h, 在mRNA水平, STAT1和NF- κ B p65呈负相关($r = -0.783, P = 0.002$), caspase 8呈上升趋势, 与STAT1呈负相关关系($r = -0.667, P = 0.002$), 与NF- κ B p65呈正相关关系($r = 0.594, P = 0.021$).

结论: IFN- γ 能促进STAT1, NF- κ B和caspase 8的表达, STAT1和NF- κ B p65在mRNA水平上呈负相关; caspase 8与STAT1呈负相关关系, 与NF- κ B p65呈正相关关系。

关键词: 胃癌; SGC7901细胞; 信号转导子与转录活化因子1; 核因子 κ B p65; caspase 8; 逆转录酶链式反应

向春香, 邓昊, 罗海莲, 刘丽江. 胃癌细胞SGC7901中STAT1, NF- κ B和caspase 8的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2194-2200
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2194.asp>

0 引言

胃癌是全球第2大常见的恶性肿瘤, 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率高^[1-3], 严重危害人类的健康. 但无论是在预防、早期发现以及治疗方面均没有取得突破性的进展^[4]. 胃癌细胞凋亡率较低, 为1.9%-2.8%^[5]. 和其他恶性肿瘤一样, 原癌基因的激活、抑癌基因的突变是胃癌形成的重要分子基础之一, 但胃癌的基因异常大多缺乏特异性, 因此胃癌发生的分子机制仍然模糊不清. 近年研究发现, 细胞凋亡与细胞增殖平衡失调在胃癌发生中具有重要意义. JAK/STAT1和NF- κ B信号通路是机体内的2条重要的信号通路, 均可在IFN- γ 作用下对细胞凋亡进行调控. 在胃癌中关于他们的研究较少, Beppu *et al*^[6]研究发现, IFN- γ 可同时促进胃癌MK-1和GCTM细胞中STAT1(促凋亡)和NF- κ B(抑凋亡)的表达上调, 当IFN- γ 和环孢菌素A(CsA, 抑制NF- κ B活性)同时使用时, 凋亡明显增加, 继而使用STAT1反义寡核苷酸抑制STAT1活性时, 胃癌细胞凋亡率下降, 证实IFN- γ 主要通过JAK-STAT1途径促进胃癌凋亡, Zhang *et al*^[7]的研究也证实了此点. Fulda *et al*^[8]发现IFN- γ 作用于神经纤维瘤细胞后, 通过STAT1/IRF1途径上调caspase 8的表达, 诱导凋亡

发生.

NF- κ B在胃癌细胞和组织中过表达, 通过使其靶基因COX-2^[9], ICAM-1^[9], uPA^[9], IL-8^[10-11]等的mRNA及蛋白水平上调, 从而与胃癌形成, 浸润转移密切相关并在某种程度上决定着患者的预后. Sasaki *et al*^[10]研究发现在胃癌肿瘤细胞中RelA的核转位明显高于癌旁上皮细胞. 研究报道, 抑制NF- κ B的活性可促进细胞凋亡^[12]. Beppu *et al*^[6]发现使用CsA抑制NF- κ B的活性, 胃癌细胞MK-1和GCTM凋亡显著增加. Wang *et al*^[13]报道IFN- γ 作用后可活化NF- κ B, 抑制caspase 8的表达, 阻断凋亡通路抑制凋亡发生. 在胃癌细胞中STAT1与NF- κ B的关系及他们是否可通过caspase 8调控凋亡并不清楚, 也未见相关文献报道. 我们拟通过细胞生物学和分子病理学的方法, 观察胃癌SGC7901细胞在IFN- γ 及不同浓度STAT1反义寡核苷酸处理下, STAT1, NF- κ B p65及caspase 8在mRNA水平的变化, 研究3者间的相关性以及可能存在的分子通路.

1 材料和方法

1.1 材料 SGC7901细胞系^[14]由本实验室保存, 在37°C 50 mL/L CO₂、饱和湿度条件下用含100 mL/L小牛血清(Gibco)的RPMI1640(Gibco)培养基培养, 细胞传代采用0.25 g/L的胰酶+0.02 g/L的EDTA, 每3-5 d传代1次. IFN- γ 购自Peprotech EC公司; TRIzol购自Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒(TaKaRa)购自大连宝生物工程有限公司; Transfection转染试剂购自Tiangen公司; 反义寡核苷酸及引物序列由赛百胜生物技术有限公司合成. 使用Primer 5.0引物设计软件分别设计NF- κ B p65, STAT1, caspase 8和 β -actin的上游和下游引物(表1).

1.2 方法 (1)使用IFN- γ 1000 U^[15]处理胃癌SGC7901细胞, 实验分4组: 空白对照组, IFN- γ 1000 U处理0.5, 3, 24 h; (2)STAT1ASON处理胃癌SGC7901细胞24 h, STAT1反义寡核苷酸序列为: 5'-CCACTGAGACATCCTGCCACC-3'^[16], 全程硫代修饰, 使用FAM标记, 在蓝色激发光下发绿色荧光, 分5组: 空白对照组, IFN- γ 1000 U处理组, STAT1ASON 200, 400, 600 nmol/L处理组; (3)IFN- γ 1000 U联合STAT1ASON处理胃癌SGC7901细胞24 h, 分5组: 空白对照组, IFN- γ 1000 U处理组, IFN- γ 1000 U+STAT1ASON 200, 400, 600 nmol/L处理组.

1.2.1 反义寡核苷酸的转染 转染前1 d, 胰酶消

■ 研发前沿

本文首次从理论上提出了STAT1和NF- κ B是胃癌细胞凋亡调控中可能存在的分子路径, 并首次提出两者在胃癌凋亡调控中存在交汇点. 本研究重点阐述了胃癌细胞系SGC7901中STAT1, NF- κ B和caspase 8的关系, 对胃癌细胞的凋亡调控机制提供了有价值的信息. 尚需从人体组织材料和临床病理层面, 开展更为深入的研究.

■创新盘点

本研究分别和同时使用IFN- γ 及不同浓度STAT1反义寡核苷酸(STAT1ASON)处理胃癌细胞(SGC7901),应用RT-PCR方法检测胃癌细胞中STAT1, NF- κ B p65和caspase 8在mRNA水平的变化,以探讨STAT1, NF- κ B p65及二者与凋亡因子caspase 8的相互关系及可能存在的分子机制。研究发现, IFN- γ 可上调胃癌细胞STAT1, NF- κ B p65和caspase 8的表达; STAT1和NF- κ B p65呈负相关; caspase 8与STAT1呈负相关,与NF- κ B p65呈正相关。上述结果未见相关文献报道。

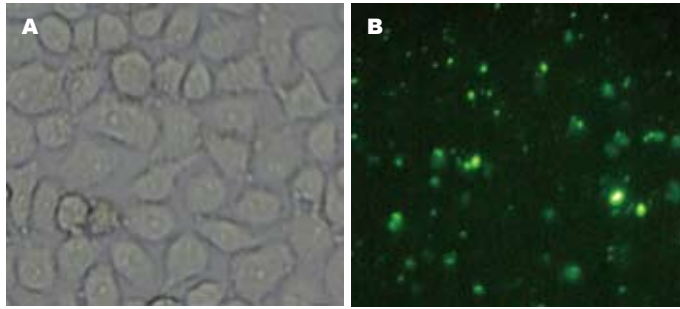


图1 STAT1ASON 400 nmol/L转染的SGC7901细胞。A: SGC7901细胞($\times 200$); B: STAT1ASON转染后($\times 100$)。

表1 引物序列及产物长度

名称	正义	反义	产物长度
β -actin	5'-TGCTGTCCCTCTACGCCTCT-3'	5'-GCTTCTCCTTGATGTCGC-3'	234 bp
STAT1	5'-CATGCGGTTGAACCTACA-3'	5'-TTCTACAGAGCCCACTATCC-3'	342 bp
NF- κ B p65	5'-GGGGACTACGACCTGAATG-3'	5'-GGGCACGATTGTCAAAGAT-3'	475 bp
caspase 8	5'-AAGAGGAAATCTCCAATGC-3'	5'-TCAAAGGTCGTGGTCAAAGC-3'	356 bp

化细胞并计数,取 $(1-5) \times 10^5$ 细胞传于6孔板,在无血清0.5 mL,不含抗生素的RPMI1640培养基中培养,转染细胞密度约为 1×10^6 。分别用50 μ L无血清培养基稀释STAT1ASON Transfection试剂,温和混匀,室温放置5 min;混合STAT1ASON和Transfection试剂(两者比例为1:2.5),室温20 min;以每孔100 μ L将混合物加入6孔板,轻轻混匀。CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C培养4-6 h后,更换正常含血清培养基培养至24 h。

1.2.2 RT-PCR及灰度分析 用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA,样品纯度和浓度经核酸测定仪测定, $A_{260/280}$ 在1.8-2.0之间。cDNA合成步骤如下: MgCl₂ 2 μ L, 10 \times RT Buffer 1 μ L, dNTP混合液(各10 mmol/L) 1 μ L, RNase抑制剂0.25 μ L, AMV逆转录酶0.5 μ L, Olig dT 0.5 μ L, RNA 1 μ L(≤ 500 ng), RNase Free dH₂O 3.75 μ L, 总体积10 μ L, 离心后混匀, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。从上述反应体系中取2 μ L, 加5 \times PCR Buffer 4 μ L, TaKaRa Taq酶(83.35 nkat/L) 0.1 μ L, 50 mmol/L上游、下游引物各0.5 μ L, 灭菌蒸馏水12.9 μ L, 总体积为20 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min后开始循环, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 目的引物与 β -actin用一管法进行PCR。PCR产物经1.5 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测, 使用Biostep Photoimpact软件分析各组目的基因与 β -actin条带的平均光密度值, 计算两者的比值, 进行相对定量。

统计学处理 使用SPSS13.0统计软件, 通过双样本成对 t 检验及Spearman等级相关分析各组

表2 STAT1和NF- κ B p65各組间差异成对 t 检验(P 值)

	空白对照	0.5 h	3 h	24 h
STAT1				
空白对照		<0.0001 ^b	0.0030 ^b	0.0100 ^b
0.5 h			<0.0001 ^b	0.0030 ^b
3 h				0.0100 ^b
NF- κ B p65				
空白对照		<0.0001 ^b	<0.0001 ^b	<0.0001 ^b
0.5 h			<0.0006 ^b	0.0001 ^b
3 h				0.0001 ^b

^b $P < 0.01$ 。

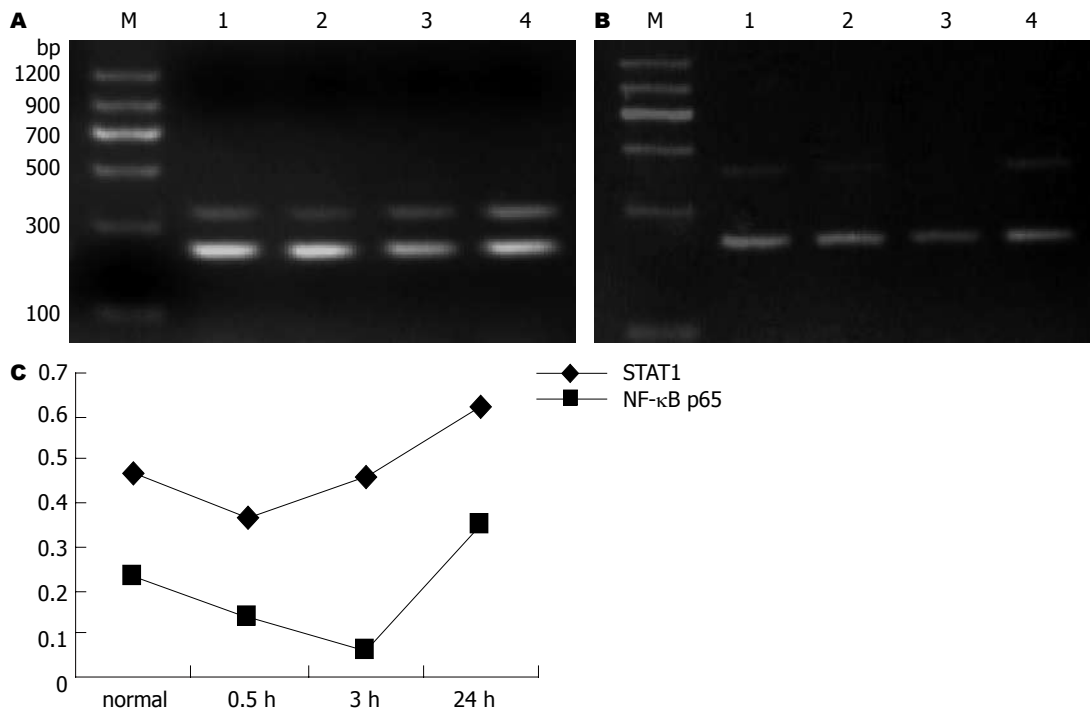
平均光密度值的比值, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

培养的SGC7901细胞贴壁生长,在倒置显微镜下观察细胞呈不规则多边形,折光性较强,透明度高。经STAT1ASON转染,倒置荧光显微镜观察,使用FAM标记的STAT1ASON在蓝色激发光下发绿色荧光(图1)。

2.1 IFN- γ 对胃癌细胞SGC7901的作用 IFN- γ 1000 U处理SGC7901细胞0.5, 3, 24 h, STAT1和NF- κ B p65 mRNA水平的表达先下降后上升(图2),二者呈正相关关系($r = 0.403$, $P = 0.036$, 表2)。

2.2 STAT1ASON对胃癌SGC7901细胞的作用 STAT1ASON处理胃癌SGC7901细胞24 h后,随STAT1ASON浓度的加大,STAT1的表达逐渐下降(图3A)。NF- κ B p65的表达比空白对照组低,随着STAT1ASON浓度加大, NF- κ B p65的表达呈



应用要点
 本文通过分子病理学的方法, 探寻NF-κB和STAT1在胃癌细胞凋亡调控中的作用, 发现在mRNA水平, IFN-γ能促进STAT1, NF-κB和caspase 8的表达; STAT1和NF-κB在mRNA及蛋白水平呈负相关; 并指出了二者与凋亡因子caspase 8之间存在一定的关系, 可望为胃癌个体化治疗提供新的思路和干预靶点.

图 2 不同时间点IFN-γ 1000 U刺激SGC7901细胞. A: STAT1; B: NF-κB p65; 1: 空白对照组24 h; 2-4: IFN-γ 0.5, 3, 24 h.

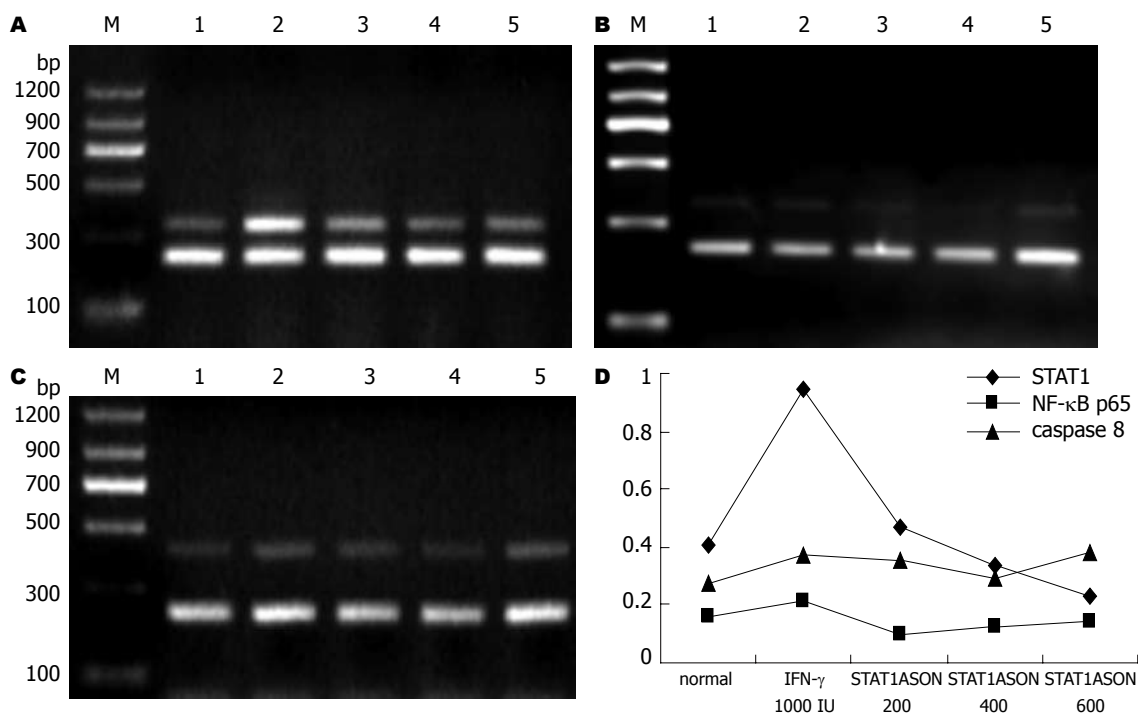


图 3 STAT1ASON处理SGC7901细胞RT-PCR结果. A: STAT1; B: NF-κB p65; C: caspase 8; 1: 空白对照组; 2: IFN-γ 1000 U处理组; 3-5: STAT1ASON 200, 400, 600 nmol/L.

现逐渐升高的趋势(图3B). 二者呈负相关关系($r = -0.556, P = 0.019$); caspase 8与STAT1, NF-κB p65无显著相关性(图3C, 表3).

2.3 IFN-γ联合STAT1ASON对胃癌细胞株SGC7901的作用 IFN-γ 1000 U处理SGC7901细

胞后, STAT1, NF-κB p65和caspase 8的表达升高, 使用IFN-γ 1000 U的同时, 使用STAT1ASON在200 nmol/L时, STAT1的表达比单独IFN-γ 1000 U作用时要高, NF-κB p65表达略有降低, 但随着STAT1ASON浓度的加大, STAT1的表达逐渐

■名词解释

1 信号转导子和转录活化子(STAT1): 参与调节细胞内的许多正常功能活动, 如: 分化、增殖、生存、凋亡和血管发生等.

2 核因子-κB(NF-κB): 在机体免疫应答、炎症反应等多种生理、病理过程中发挥重要作用, 并控制着大量基因的转录, 涉及到细胞的生长分化、凋亡的调节、细胞因子产生、肿瘤转归等.

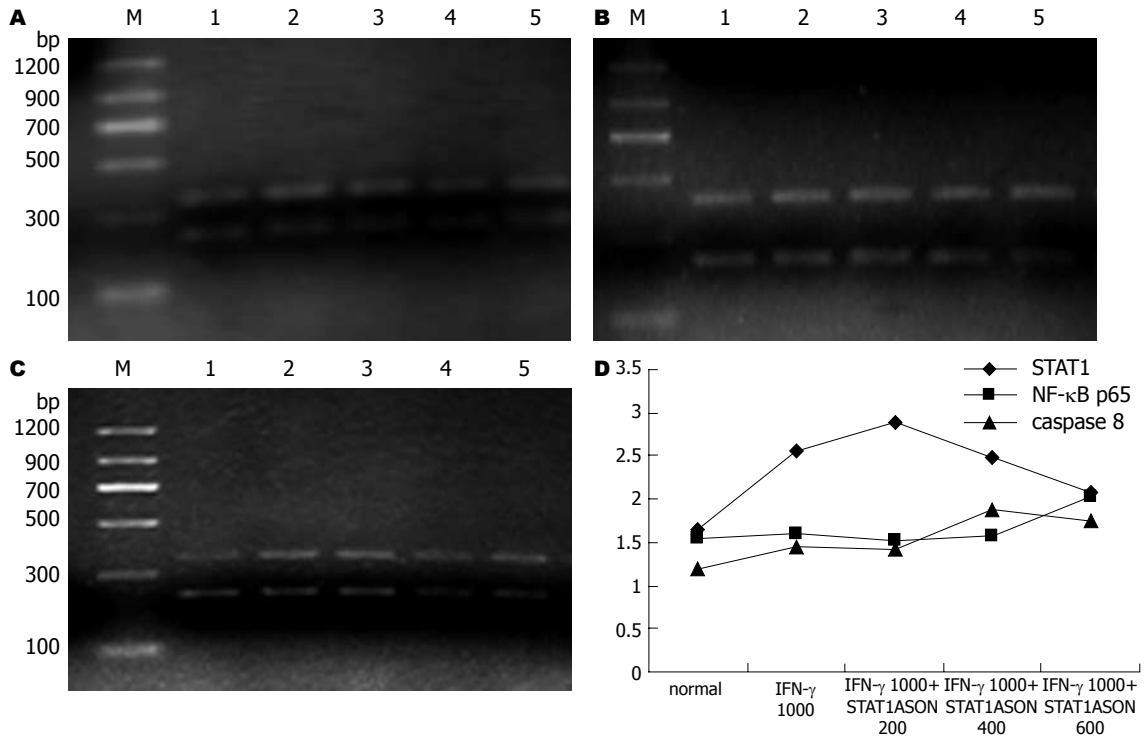


图 4 STAT1ASON联合IFN-γ处理SGC7901细胞. A: STAT1; B: NF-κB p65; C: caspase 8; 1: 空白对照组; 2: IFN-γ 1000 U处理组; 3-5: IFN-γ 1000 U联合STAT1ASON 200, 400, 600 nmol/L.

下降, NF-κB p65表达逐渐增强, 而caspase 8的表达始终高于空白对照组(图4). 统计学分析显示STAT1与NF-κB p65呈负相关关系($r = -0.775, P = 0.002$); STAT1与caspase 8呈负相关关系($r = -0.769, P = 0.002$); NF-κB p65与caspase 8呈正相关关系($r = 0.594, P = 0.021$, 表4).

3 讨论

STAT1和NF-κB是分布和作用均十分广泛的转录调节因子, 在机体免疫应答、炎症反应等多种生理、病理过程中发挥重要作用, 并控制着大量基因的转录, 涉及到细胞的生长分化、凋亡的调节、肿瘤转归、细胞因子产生等, 在受到多种刺激因素的激活后他们能入核内发挥其转录调节因子的功能^[17]. STAT1是信号转导子和转录活化子家族中的重要成员. 许多肿瘤中STAT1高表达, 他是肿瘤血管发生、生长和转移的负性调节因子, 被认为是潜在的肿瘤抑制因子, 现多认为其可促进肿瘤细胞凋亡^[18]. 研究表明, STAT1在IFN-γ诱导的凋亡中起重要作用, 他的活化能上调促凋亡分子的表达, 包括IL-1β转换酶, caspase 8和Fas/Fas受体等^[19-22]. 然而, 几项研究都表明尽管STAT1活化, 肿瘤细胞仍会对IFN-γ产生抵抗^[23], 对IFN-γ耐受的分子间作用机制并不清楚. Zhou *et al*^[24]发现, IFN-γ对细胞的生

表 3 各组间差异成对/检验结果(P值)

	空白对照	1000	200	400	600
STAT1					
空白对照		<0.0001 ^b	0.1300	0.0600	0.0020 ^b
1000			0.0040 ^b	0.0010 ^b	0.0002 ^b
200				0.0040 ^b	0.0060 ^b
400					0.0100 ^b
NF-κB p65					
空白对照		0.0100 ^b	0.0100 ^b	0.0200 ^a	0.0300 ^a
1000			0.0100 ^b	0.0200 ^a	0.0200 ^a
200				0.0020 ^b	0.0020 ^b
400					0.0500 ^a
caspase 8					
空白对照		0.0700	0.0900	0.3600	0.0700
1000			0.0030 ^b	<0.0001 ^b	0.0030 ^b
200				0.0002 ^b	0.0020 ^b
400					0.0001 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01.

长和生存有双重作用, 这两种作用是相反的, 这种生物学现象可能取决于IFN-γ诱导的多条通路间的平衡. 事实上, IFN-γ能同时启动JAK/STAT介导的凋亡途径和钙激活的NF-κB抗凋亡途径^[6].

NF-κB是B细胞核提取物中一种能与

免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B序列(GGGACTTCC)特异结合的核蛋白因子,在哺乳动物细胞中共有5种NF- κ B/Rel家族成员,他们是c-Rel, NF- κ B1(p50/p105), NF- κ B2(p52/p100), RelA(p65), RelB. 通常情况下, NF- κ B与本家族成员结合成同源或异源二聚体存在于胞质中,最常见的形式是RelA(p65)/p50异源二聚体. 在无信号刺激时, NF- κ B与I κ B在胞质中结合成复合物,阻止其转位进入细胞核内发挥激活功能. 他可以被细菌、病毒、免疫刺激和炎症细胞因子及可破坏细胞的很多物质所激活. 他的活化与肿瘤的侵袭、临床病理特征诸如: 淋巴转移, 浸润深度, 腹膜转移及肿瘤大小等相关联^[9], 并与凋亡密切相关. 肿瘤细胞中高表达活化的NF- κ B可以上调FLIP(Fas相关死亡区域蛋白样白介素1 β 转化酶抑制蛋白)的表达, 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自身结构和caspase 8酶原、FADD相似, 含有DD区域, 但是缺乏关键的催化基元, 故其可以竞争性结合FADD, 阻止后者和caspase 8酶原结合形成死亡诱导信号复合物(DISC), 抑制caspase 8酶原的激活, 从而阻止caspases家族中效应因子caspase 3, 6, 7的活化, 阻断凋亡过程^[25]. 在胃癌细胞中也存在此种机制^[26-27]. FLIP的基因编码序列中存在 κ B位点故NF- κ B活化可以上调FLIP的表达, 使肿瘤细胞逃脱FAS介导的凋亡. 我们发现, 在IFN- γ 的作用下, STAT1和NF- κ B p65在mRNA水平表达均上调, 这与Beppu *et al*报道的结果是一致的, 他们发现在24, 48, 72 h STAT1的表达与IFN- γ 作用呈时间依赖性, 但在0.5, 3, 24 h我们观察到STAT1, NF- κ B p65在mRNA水平的变化是先下降后上升的, 未见相关文献报道. 使用STAT1ASON抑制STAT1表达, 发现STAT1 mRNA水平表达降低后, NF- κ B p65 mRNA水平表达也降低, 但随着STAT1反义寡核苷酸浓度的加大, NF- κ B p65表达逐渐增强, 呈负相关关系, 与Wang *et al*^[28]在蛋白水平的研究结果一致. 当IFN- γ 联合STAT1ASON作用时, STAT1和NF- κ B p65也呈负相关关系.

Caspase 8是caspase家族中的重要成员之一, 在细胞凋亡及增殖中起重要作用. caspase 8基因与c-FLIP(cellular FLICE inhibitor protein)基因、caspase 10基因共同位于染色体2q33-34, 由于mRNA的差异剪接, caspase 8至少存在8种不同的异构体, 他们在凋亡中起着不同的作用.

表 4 各组间差异成对/检验结果

	空白对照	1000	200	400	600
STAT1					
空白对照		0.0008 ^b	0.0004 ^b	0.0008 ^b	0.0001 ^b
1000			<0.0000 ^b	0.0008 ^b	0.0040 ^b
200				0.0000 ^b	0.001 ^b
400					0.005 ^b
NF- κ B p65					
空白对照		0.0040 ^b	0.2000	0.0700	0.0200 ^a
1000			0.0060 ^b	0.2300	0.0200 ^a
200				0.0300 ^a	0.0100 ^b
400					0.0100 ^b
caspase 8					
空白对照		0.0010 ^b	0.0030 ^b	0.0170 ^b	0.0010 ^b
1000			0.0100 ^b	0.0400 ^a	0.0020 ^b
200				0.0400 ^a	0.0010 ^b
400					0.2300

^aP<0.05, ^bP<0.01.

在正常条件下, caspase 8可能参与增殖, 且存在非凋亡信号转导功能. 最近研究发现caspase 8, caspase 10和c-FLIP能够利用2个完整的死亡效应域(DED)介导NF- κ B活化. 蛋白酶活性丧失的caspase 8、野生型caspase 8以及只含前结构域的caspase 8均有这一特性, 他们可能通过RIP(receptor interacting protein), NIK(NF- κ B inducing kinase)和IKK α (I κ B kinase α)导致NF- κ B活化. IFN- γ 1000 U处理细胞后, caspase 8表达显著升高; 单独使用STAT1ASON时, 在mRNA水平caspase 8与STAT1, NF- κ B p65无显著相关性, 但在STAT1ASON联合IFN- γ 处理细胞时, 与STAT1负相关, 与NF- κ B p65正相关, 这与Chin *et al*^[19]及Wang *et al*^[13]在蛋白水平的报道是一致的. 因caspase 8自身结构和作用机制较复杂, SGC7901细胞中STAT1, NF- κ B与caspase 8的关系仍有待进一步研究.

本项研究结果显示, 在胃癌SGC7901细胞中, IFN- γ 1000 U能上调STAT1, NF- κ B p65及caspase 8的表达, 在mRNA水平上STAT1和NF- κ B p65呈负相关, caspase 8与STAT1负相关, 与NF- κ B p65正相关.

4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- 2 Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric

同行评价

本文论述了胃癌细胞凋亡调控的机制, 其结果可能为从凋亡的调控方面进行胃癌的治疗提供了有价值的信息, 立题新颖, 设计较完整, 严密, 逻辑性较强, 资料的收集, 分析均全面、系统, 有很好的参考价值.

- cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1415-1425
- 3 刘丽江, 张应天. 胃癌淋巴结微转移的组织学诊断及间质反应的研究. *中华病理学杂志* 2000; 29: 339-341
 - 4 Sung NY, Choi KS, Park EC, Park K, Lee SY, Lee AK, Choi IJ, Jung KW, Won YJ, Shin HR. Smoking, alcohol and gastric cancer risk in Korean men: the National Health Insurance Corporation Study. *Br J Cancer* 2007
 - 5 Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/ CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4347-4353
 - 6 Beppu K, Morisaki T, Matsunaga H, Uchiyama A, Ihara E, Hirano K, Kanaide H, Tanaka M, Katano M. Inhibition of interferon-gamma-activated nuclear factor-kappa B by cyclosporin A: A possible mechanism for synergistic induction of apoptosis by interferon-gamma and cyclosporin A in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 797-805
 - 7 Zhang H, Fang DC, Lan CH, Luo YH. Helicobacter pylori infection induces apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1051-1056
 - 8 Fulda S, Debatin KM. IFN-gamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2295-2308
 - 9 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by Helicobacter pylori. *Mol Pathol* 2002; 55: 286-293
 - 10 Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4136-4142
 - 11 Isomoto H, Miyazaki M, Mizuta Y, Takeshima F, Murase K, Inoue K, Yamasaki K, Murata I, Koji T, Kohno S. Expression of nuclear factor-kappaB in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa detected with southwestern histochemistry. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 247-254
 - 12 Voboril R, Weberova-Voborilova J, Rychterova V, Ambrus M, Horak L, Fanta J. NF-kappaB, colorectal carcinoma and radiotherapy: results of a clinical and experimental study. *Rozhl Chir* 2007; 86: 268-272
 - 13 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5923-5929
 - 14 李莹, 韩炯, 王立峰, 林树新, 药立波, 俞强, 刘新平. 人胃癌细胞株抗脱落凋亡特性的分析. *第四军医大学学报* 2003; 24: 485-488
 - 15 Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19: 2468-2473
 - 16 Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998; 93: 827-839
 - 17 Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 1998; 102: 1385-1392
 - 18 Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 2004; 14: 64-69
 - 19 Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5328-5337
 - 20 Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998; 58: 2832-2837
 - 21 Lee KY, Anderson E, Madani K, Rosen GD. Loss of STAT1 expression confers resistance to IFN-gamma-induced apoptosis in ME180 cells. *FEBS Lett* 1999; 459: 323-326
 - 22 Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Lopez-Rivas A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 2000; 60: 5673-5680
 - 23 Morisaki T, Matsunaga H, Beppu K, Ihara E, Hirano K, Kanaide H, Mori M, Katano M. A combination of cyclosporin-A (CsA) and interferon-gamma (INF-gamma) induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 3363-3373
 - 24 Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* 2003; 278: 45406-45413
 - 25 Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA, Evers BM. Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 56-65
 - 26 Nam SY, Jung GA, Hur GC, Chung HY, Kim WH, Seol DW, Lee BL. Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 1066-1073
 - 27 Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B, Tu SP, Yang Y, Liu XG, Lam SK, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 541-546
 - 28 Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4505-4512

编辑 何燕 电编 张敏

抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 陆茵, 李璘, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静, 南京中医药大学第三附属医院, 全国肛肠医疗中心, 江苏省南京市 210001

陆茵, 李璘, 南京中医药大学海洋药物研究所 江苏省南京市 210029

刘秀芳, 南京中医药大学研究生, 主要从事肿瘤遗传学方面的研究。国家自然科学基金资助课题, No. 30572447

南京市医学发展重点项目资助课题, No. ZKX05028

通讯作者: 金黑鹰, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院, 全国肛肠医疗中心。

jinheiying@yahoo.com.cn

电话: 025-86626137-6217 传真: 025-86627364

收稿日期: 2007-03-08 接受日期: 2007-04-21

Inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on a mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line

Xiu-Fang Liu, Hei-Ying Jing, Yi-Jiang Ding, Yin Lu, Lin Li, Shu-Qing Ding, Fei Liu, Min Ni, Jing Wang

Xiu-Fang Liu, Hei-Ying Jing, Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding, Fei Liu, Min Ni, Jing Wang, National Center of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Yin Lu, Lin Li, the Ocean Drug Institute of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572447 and the Key Project of Medicine Development of Nanjing City, No. ZKX05028

Correspondence to: Hei-Ying Jing, National Center of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, No. 1 Jingling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiying@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-08 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To study the inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on the mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line.

METHODS: Fourteen Chinese herbs were used to treat the hMSH2-deficient colorectal cancer Lovo cell line and mismatch-repair-gene-deficient colorectal SW480 cell line, and growth

rate was evaluated by the MTT method. The microsatellite instability change was examined by multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: Tea polyphenols, orindonin, baicalin and andrographolide had obvious inhibition effects on colorectal cancer cell lines. The effects of orindonin, tea polyphenols and baicalin on the Lovo cell line were better than on SW480 cells. In particular, the effect of baicalin on Lovo cells was five times better than that on SW480 cells, but the effect of andrographolide on SW480 cells was better than that on Lovo cells. The proliferation rate of the two cell lines was low after resveratrol, aloin, tanshinone IIA and curcumin treatment, and increasing drug concentration had no effect. These results demonstrated that epimedium brevicornum and the other five drugs had no inhibitory effect on the two cell lines, but they did have a proliferative effect. The microsatellite instability had no changes in the different drug group concentrations.

CONCLUSION: Chinese herbs with anti-mutation effects, such as orindonin, tea polyphenols and baicalin, exert an inhibitory effect on mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell lines. These effects are independent of the dose and duration of exposure. The mechanism may result from some yet unknown factors.

Key Words: Chinese herbs; Anti-mutation effect; Colorectal cancer; Mismatch repair; MTT assay; Multiplex fluorescent polymerase chain reaction; *In vitro*

Liu XF, Jing HY, Ding YJ, Lu Y, Li L, Ding SQ, Liu F, Ni M, Wang J. Inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on a mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2201-2204

摘要

目的: 研究抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用。

背景资料

HNPCC即遗传性非息肉性结直肠癌, HNPCC发生的分子遗传学基础是由于错配修复基因的生殖系突变, 当携带突变的等位基因体细胞的另一个等位基因发生突变, 导致该细胞中错配修复功能缺失, DNA复制时错配增加, 基因组DNA微卫星序列发生延长或缩短, 即发生微卫星不稳定(MSI), 从而使该细胞向肿瘤细胞发展。

■ 相关报道

目前国外报道,非甾体类药物如阿司匹林作用于错配修复基因缺失细胞可通过修复其错配修复功能而诱导肿瘤细胞凋亡,本文出发点在于从部分具有抗突变作用的中草药中筛选可以诱导错配修复基因缺失细胞(Lovo细胞株)凋亡的单体成分,从而为下一步的研究作基础。

方法: 使用具有抗突变作用的14种中药(冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷等)处理hMSH2缺失结肠癌细胞株Lovo细胞和错配修复基因正常的结肠癌细胞株SW480细胞,采用MTT法观察细胞的增殖情况。多重荧光聚合酶链式反应(PCR)方法检测各浓度时Lovo细胞微卫星不稳定变化。

结果: 冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷对Lovo细胞和SW480细胞有明显的抑制作用。冬凌草甲素、茶多酚和黄芩苷对Lovo细胞的抑制作用优于SW480细胞,特别是黄芩苷对Lovo细胞作用为SW480细胞的5倍,差异有显著意义。穿心莲内酯对SW480细胞的作用优于Lovo细胞,差异具有有显著意义。白藜芦醇、芦荟苷、丹参酮IIA、姜黄素4种中药成分作用于这2种细胞后,增殖抑制率较低,且加大药物浓度,增殖抑制率也无明显变化。仙灵脾等6种单味中药对2种细胞不但无明显抑制作用,反而显示有生长促进作用。另在各浓度,Lovo细胞微卫星均没有明显改变。

结论: 茶多酚和黄芩苷等具有抗突变作用的中药具有抑制错配修复基因缺失结直肠癌细胞的作用,其作用与剂量无关。

关键词: 中药; 抗突变作用; 结肠癌; 错配修复; MTT法; 多重荧光聚合酶链式反应; 体外实验

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 陆茵, 李璘, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静. 抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2201-2204

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2201.asp>

0 引言

结直肠癌根据其分子病理的不同可以分为微卫星不稳定结直肠癌(MSI)和染色体不稳定结直肠癌(CIN)。MSI结直肠癌是由于错配修复基因体细胞突变或种系突变导致的结直肠癌,其典型的遗传学模型为遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC); CIN结直肠癌是由于APC基因体细胞突变或种系突变导致的结直肠癌,其典型的遗传学模型为家族性腺瘤性息肉病(FAP)。MSI结直肠癌发生是由于错配修复基因发生缺失或功能下降,导致DNA复制错误增加,微卫星不稳定而使肿瘤发生。因此MSI结直肠癌发生的始动因素是DNA复制错误增加,导致机体中功能基因、特别是抑癌基因的功能缺失,MSI结直肠癌发生的最突出的特征为基因突变的增加^[1-2]。因此我们推论,抗突变药物具有抗结直肠癌肿瘤

的活性。许多中药具有抗基因突变的作用。在本试验中,我们观察了14种在文献报道中具有抗突变功能中药单体成分或水煎剂对错配修复基因缺失细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Lovo细胞(hMSH2缺失结肠癌细胞株)、SW480细胞(错配修复基因正常的结肠癌细胞株)购自南京中医药大学细胞库。白藜芦醇、穿心莲内酯、冬凌草甲素、黄芩苷、芦荟苷、丹参酮IIA、茶多酚和姜黄素购自中国药品生物制品鉴定所标准品。仙灵脾、白术、半枝莲、生地,仙鹤草由本院提供。常规方法培养细胞,2-3 d传代。

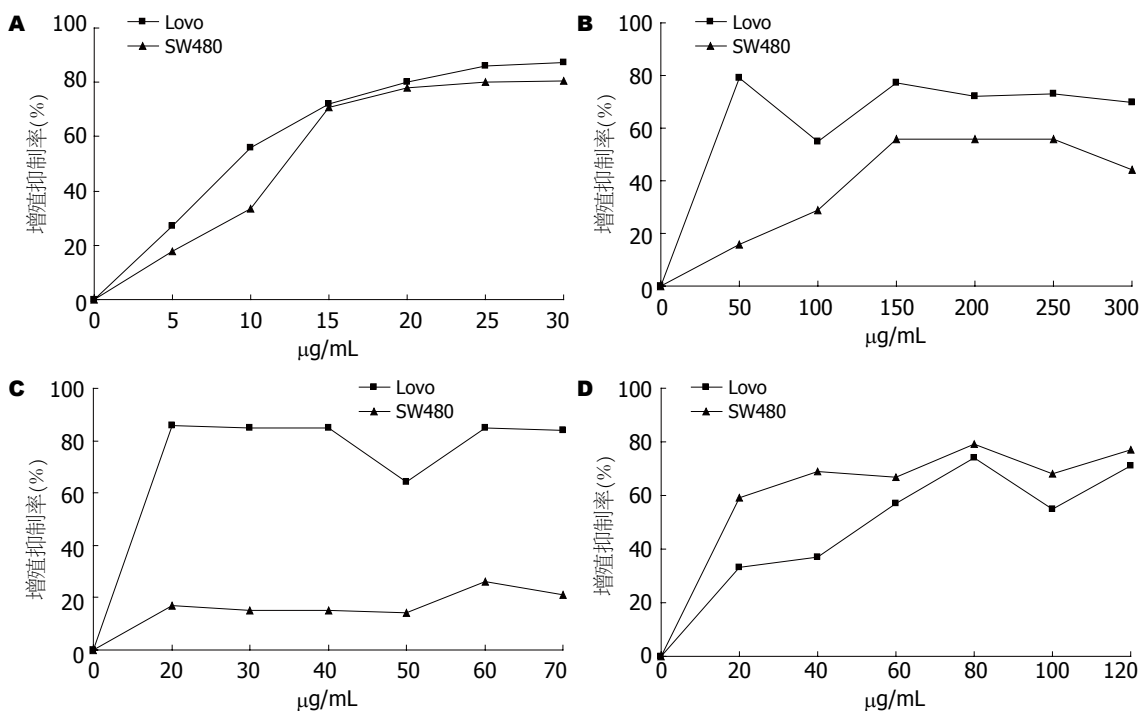
1.2 方法 取对数生长期细胞调整细胞密度至 5×10^4 个/L,加入96孔细胞培养板,每孔200 μ L,置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养24 h,弃培养基,加入含不同浓度药物的培养基,另设培养基空白对照,每组4个重复,继续培养24 h,培养终止前4 h,每孔加5 g/L的MTT 20 μ L,培养终止,弃上清,每孔加100% DMSO 200 μ L,振荡器振荡10 min,酶标仪490 nm读取A值,计算细胞增殖抑制率 = (1-加药孔A值/对照孔A值) \times 100%,另Lovo细胞微卫星不稳定变化按第一部分实验方法抽提培养细胞的DNA,以多重荧光PCR方法检测各浓度时Lovo细胞微卫星不稳定变化。

2 结果

中药单体成分中,冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷对Lovo细胞和SW480细胞有明显的抑制作用。冬凌草甲素、茶多酚和黄芩苷对Lovo细胞的抑制作用优于SW480细胞,特别是黄芩苷对Lovo细胞作用为SW480细胞的5倍,差异有显著意义。穿心莲内酯对SW480细胞的作用优于Lovo细胞,差异均有显著意义(图1)。白藜芦醇、芦荟苷、丹参酮IIA、姜黄素4种中药成分作用于这2种细胞后,增殖抑制率较低,且加大药物浓度,增殖抑制率也无明显变化。仙灵脾、白术、半枝莲、白菊花、生地,仙鹤草作用于Lovo和SW480两种细胞株后不但无明显抑制作用,反而显示有生长促进作用。另在各浓度,Lovo细胞微卫星均没有明显改变。

3 讨论

多基因的突变是错配修复基因缺失结直肠癌的重要特征,通过调节错配修复基因表达可以



同行评价
 本文以MTT观察14种中药对结肠癌Lovo细胞和SW480细胞的抑制作用, 内容较重要, 有一定的创新性, 提供了一些有意义的信息, 有一定的参考价值。

图 1 4种中药单体对结肠癌细胞的增殖抑制率. A: 冬凌草甲素; B: 茶多酚; C: 黄芩苷; D: 穿心莲内酯.

抑制错配修复基因缺失细胞的生长, 诱导细胞凋亡. 通过在HCT-116细胞和Lovo细胞中转入hMLH1或hMSH2基因的cDNA质粒可以提高hMSH2和hMLH1基因的表达, 导致该细胞发生凋亡, 减少细胞中的MSI及降低细胞自发性突变的效果. Ruschoff *et al*^[3]用阿司匹林对HCT-116细胞(hMLH1缺失)和Lovo细胞(hMSH2缺失)进行干预, 发现阿司匹林可以降低这2株细胞的微卫星不稳定, 导致细胞凋亡. 但是研究发现70% HNPCC结肠癌中COX-2基因呈低表达. Goel *et al*^[4]在HCT-116细胞、HCT-116+chr3细胞和SW480细胞加入阿司匹林, 发现这3株细胞在48和72 h可以发生凋亡, 而且这3株细胞hMLH1, hPSM2, hMSH6和hMSH2基因表达均提高, 作者认为阿司匹林抑制MMR结肠缺失的结直肠癌细胞是通过提高错配修复基因的表达诱导错配修复基因缺失的结直肠癌细胞的凋亡. 因此我们推论, 通过抗突变可以抑制错配修复基因缺失结直肠癌、诱导细胞凋亡.

中药的抗突变作用研究目前已取得重要的进展. 赵泽贞 *et al*^[5]对22种可食用中药进行研究发现蜂蜜、蜂王浆、蜂采花粉、柳芽、槐豆、桂圆、白菊花、山药及菱角9种显示对丝裂霉素C引起的致突变作用有拮抗效应, 而且均无致畸变作用. 用Ames试验平板掺入法研究75种中药, 发现椿根皮、石菖蒲、大黄有强烈的抗

突变作用, 甘草有抗移码型和置换型基因突变作用, 而椿根皮、大黄、地鳖虫等有抗移码型突变力^[6-7]. 赵浩如 *et al*研究显示从白花蛇舌草水溶液提取物可以显著抑制S-180实体瘤的生长, 且抑瘤率超过40%^[8]. 本试验选取抗突变作用强、同时具有抗肿瘤作用的14味中药作为研究对象. 其中白藜芦醇, 穿心莲内酯, 冬凌草甲素, 黄芩苷, 芦荟苷, 丹参酮II A, 茶多酚, 姜黄素等采用中药单体成分进行研究, 而仙灵脾、白术、半枝莲、白菊花、生地和仙鹤草等中药采用中药水煎剂进行研究. 研究模型采用hMSH2缺失的Lovo细胞作为研究对象, 以错配修复功能正常的SW480结肠癌细胞作为对照组以比较在治疗结果之间的差异. 对结直肠癌细胞的抑制作用采用MTT方法, 该方法是由Mosmann^[9]于1983年建立, 基本原理是黄色的四甲基偶氮唑盐(MTT)能被活细胞线粒体上的琥珀酸脱氢酶转化成兰紫色的甲赞颗粒, 颗粒溶解后, 其浓度可用分光光度计测定出吸光度值(A值), A值的大小与活细胞数呈正相关. 本研究发现, 冬凌草甲素对Lovo细胞和SW480细胞均有抑制作用, 且其抑制率可以达到80%以上, 当其浓度超过20 mg/L后其抑制率不在随浓度的上升而提高. 冬凌草甲素对Lovo细胞抑制作用略高于对SW480细胞, 但差异无显著意义. 提示冬凌草甲素可能通过Lovo细胞和SW480细胞共同的作用靶点发

挥作用, 目前研究认为冬凌草甲素可能通过影响细胞凋亡基因诱导细胞凋亡^[10].

茶多酚对Lovo细胞的作用明显高于对SW480细胞作用, 特别在50 mg/L的浓度即达到80%左右的抑制率, 而且其效果不随浓度的升高而升高. 而对SW480细胞的研究中发现, 其抑制率较低, 最高抑制率为59%, 与Lovo相比差异有显著意义. 提示茶多酚可能通过Lovo细胞特殊途径发挥作用. 与茶多酚类似的还有黄芩苷, 该药物在20 mg/L的浓度即对Lovo细胞达到85%以上的抑制率, 而且随药物浓度增加抑制率无明显升高. 提示茶多酚和黄芩苷可能是通过相同的作用途径作用于MSI结直肠癌. 但是我们对茶多酚和黄芩苷作用的细胞进行微卫星不稳定检测, 均无明显变化. 可能与本组研究的相对时间较短有关. Ruschoff *et al*^[3]研究观察微卫星不稳定状态, 其细胞处理时间为112 d, 但本组曾尝试进行长时间的培养, 但是药物处理组细胞不易长时间存活, 因此拟在下一步动物实验时来进行进一步的研究和分析.

穿心莲内酯对SW480细胞的影响高于对Lovo细胞的影响, 其差异有显著意义. 提示穿心莲内酯可能是通过SW480细胞所特有的信号转导途径抑制结直肠癌细胞的生长. 文献报道穿心莲对结直肠癌细胞有抑制作用, 但是其机制目前尚不清楚. 白藜芦醇, 芦荟苷, 丹参酮IIA, 姜黄素4个中药单体对2种细胞作用的抑制率较低, 与其他一些文献的报道有一定差异. 本组将进一步对其进行研究, 特别是丹参酮IIA在水中溶解度较低, 目前研制的丹参酮IIA磺酸盐其水溶性, 将进一步进行研究.

本研究中的仙灵脾, 白术, 半枝莲, 白菊花, 生地, 仙鹤草等6味中药进行研究均对Lovo细胞和SW480细胞无抑制作用, 而且部分中药对结直肠癌细胞有促进增殖的作用, 通过加大处理浓度其抑制率无明显增加. 与文献[11-14]报道和中医临床有一定的差异. 特别是半枝莲、仙鹤草、白术等是中医临床常用的抗肿瘤药物,

但是在本研究中其无明显的抑制肿瘤增殖的作用, 其机制尚需要进一步研究. 单味中药在中医临床中较少使用, 在中医临床中强调复方的相互作用, 而单味中药并不符合中医方剂配伍的理论. 下一步的研究中, 我们拟使用在临床中以确实有效的抗肿瘤的复方药进行细胞学的研究, 以观察其价值.

4 参考文献

- 1 金黑鹰, 严宏利. 遗传性非息肉病性结直肠癌. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 79-99
- 2 Olschwang S, Laurent-Puig P, Eisinger F, Millat B. An alternative to prophylactic colectomy for colon cancer prevention in HNPCC syndrome. *Gut* 2005; 54: 169
- 3 Ruschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, Bocker T, Brockhoff G, Hofstadter F, Fishel R. Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11301-11306
- 4 Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 383-390
- 5 赵泽贞, 魏丽珍. 22种可食性中药材的抗突变和致突变同步快速试验报告. *癌变·畸变·突变* 2000; 12: 87-89
- 6 张世敏. 中药抗突变实验研究进展. *中国中医药信息杂志* 2003; 10: 83-85
- 7 赵凤鸣, 邵山, 王明艳, 许冬青. 中药抗突变作用机制研究概况. *安徽中医学院学报* 2003; 22: 59-60
- 8 崔健, 施松善, 王顺春, 王峥涛, 林景超. 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
- 9 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
- 10 杨胜利, 韩绍印, 张巧, 宋爱云, 丁兰萍, 宫亚欧, 张覃沐. 冬凌草甲素抗突变性研究. *癌变·畸变·突变* 2001; 13: 8-9
- 11 王锦菊, 王瑞国. 白术及其复方抗肿瘤研究进展. *中国中医药信息杂志* 2004; 11: 927-928
- 12 彭伟文, 吴惠妃, 曾聪彦, 张瑜, 钟希文. 半枝莲的药理及临床应用研究概况. *时珍国医国药* 2003; 14: 428-429
- 13 张东, 邬国栋, 张述禹. 仙鹤草的药理和临床研究新进展. *中国药业* 2004; 13: 79-80
- 14 王春霞. 菊花化学成分的研究进展. *中药材* 2004; 27: 224-226

编辑 何燕 电编 张敏

白细胞介素6对豚鼠离体近端结肠平滑肌收缩的影响

吕晓光, 余保平, 徐龙, 吴志轩

吕晓光, 余保平, 徐龙, 吴志轩, 武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060

吕晓光, 2005年武汉大学人民医院消化内科硕士, 主要从事胃
肠动力学研究

通讯作者: 余保平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院
消化内科. yubp62@163.com

电话: 027-68759391

收稿日期: 2007-04-04 接受日期: 2007-04-28

Effects of interleukin-6 on the contraction of colonic smooth muscle

Xiao-Guang Lv, Bao-Ping Yu, Long Xu, Zhi-Xuan Wu

Xiao-Guang Lv, Bao-Ping Yu, Long Xu, Zhi-Xuan Wu,
Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan
University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Pro. Bao-Ping Yu, Department of
Gastroenterology, Renmin hospital, Wuhan University, Wu-
han 430060, Hubei Province, China. yubp62@163.com

Received: 2007-04-04 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To investigate the effects and mechanism of interleukin-6 on the contraction of colonic smooth muscle.

METHODS: Smooth muscle segments with mucosa were removed from the proximal colon of guinea pigs, and were divided into three groups: group A [interleukin-6 (IL-6) was added to Tyrode's solution], group B (tetrodotoxin and IL-6 added), and group C (interstitial cells of Cajal were specially destroyed by methylene blue incubation and intensive illumination).

RESULTS: The amplitude and frequency of contractions were upregulated by IL-6 in a dose-independent manner. The frequency and amplitude of contractions were decreased when the enteric nerve was blocked by tetrodotoxin (0.206 ± 0.027 g vs 0.300 ± 0.039 g; 9.770 ± 1.711 s vs 8.483 ± 1.113 s; $P < 0.01$, $P < 0.05$). Addition of IL-6 (80 μ g/L) after blocking with tetrodotoxin increased amplitude and frequency of smooth muscle contraction ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The contraction of smooth muscle was nearly abolished when interstitial cells of cajal were destroyed by methy-

lene blue incubation and intensive illumination ($P < 0.01$). Although IL-6 was administered, there was no significant difference in the amplitude and frequency of the contraction of smooth muscle segments when interstitial cells of cajal were destroyed by methylene blue and intensive illumination.

CONCLUSION: IL-6 was able to promote the contraction of colon smooth muscle. The effects of IL-6 on contraction are mainly induced by the enteric nervous system. Interstitial cells of Cajal play an essential role in the activation of smooth muscle contraction by IL-6.

Key Words: Interleukin-6; Tetrodotoxin; Colon muscle; Enteric nerve; Interstitial cell of cajal

Lv XG, Yu BP, Xu L, Wu ZX. Effects of interleukin-6 on the contraction of colonic smooth muscle. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2205-2209

摘要

目的: 研究白细胞介素6(IL-6)对豚鼠近端结肠平滑肌的影响及其机制。

方法: 观察IL-6对结肠收缩的影响;用河豚毒素(TTX)阻断肠神经后观察不同浓度IL-6对结肠平滑肌收缩的影响;损伤Cajal间质细胞(ICC)后观察IL-6对结肠平滑肌收缩的影响。

结果: 在带有ICC的近端结肠纵行肌加入IL-6后,结肠平滑肌的收缩振幅增加和频率加快,呈浓度依赖性;加入TTX后,收缩的幅度和频率,同拮抗前相比分别降低和减慢(0.206 ± 0.027 g vs 0.300 ± 0.039 g; 9.770 ± 1.711 s vs 8.483 ± 1.113 s; $P < 0.01$, $P < 0.05$); TTX阻断后加入IL-6(80 μ g/L),振幅增加和频率加快($P < 0.01$, $P < 0.05$);破坏结肠ICC,收缩幅度和频率分别与损伤ICC后加入IL-6无显著性差异(80 μ g/L),而与正常结肠收缩振幅和频率有显著性差异($P < 0.01$)。

结论: IL-6对豚鼠近端结肠平滑肌的收缩活动有兴奋作用,其兴奋效应主要是通过肠神经

■背景资料

肠易激综合征是一种以腹痛和腹部不适伴有排便异常为特征的肠道功能紊乱性综合征。胃肠动力异常是该综合征重要的病理生理特点。

■应用要点

目前研究发现胃肠道免疫反应和炎症常常伴有动力异常. 因此探讨炎症因子对胃肠动力的影响对于阐明肠易激综合征等胃肠动力障碍性疾病可能的病理生理机制具有现实的意义.

元介导. ICC是IL-6对平滑肌兴奋途径的一个不可缺少的中间环节.

关键词: 白细胞介素6; 河豚毒素; 结肠平滑肌; 肠神经; Cajal间质细胞

吕晓光, 余保平, 徐龙, 吴志轩. 白细胞介素6对豚鼠离体近端结肠平滑肌收缩的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2205-2209

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2205.asp>

0 引言

胃肠道平滑肌运动受神经内分泌的支配和调节, 同时也受到免疫系统的影响^[1]. 在腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS), 术后胃肠动力障碍等患者的血清和消化道中IL-6等炎症因子表达增强. 尤其是在无病理学改变的区域同样出现动力障碍伴炎症因子表达增强^[2-3]. 这些研究提示, IL-6可能对胃肠功能失调有直接的影响. 我们观察IL-6对豚鼠近端结肠平滑肌收缩的影响, 并探讨IL-6在肠神经系统, Cajal间质细胞, 平滑肌细胞3个不同的层次的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康豚鼠, 体质量250-300 g, 雌雄不拘, 由湖北省疾病预防控制中心提供, 喂自来水, 普通颗粒饲料. IL-6购自Research Diagnostics, Inc, 河豚毒素购自中国大连瑞芳公司, 亚甲基蓝(methylene blue)购自中国湘中地质实验研究所. Tyrode液成份包括(mmol/L): NaCl 147.0, KCl 4.0, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.05, Na₂HPO₄ 1.81, NaH₂PO₄ 0.42, 葡萄糖5.5, pH用NaOH调至7.35-7.4. 5.50 mmol/L亚甲基蓝采用Tyrode液配制. 张力换能器, RM6240多道生理信号采集处理系统购自成都仪器厂.

1.2 方法 本实验共分3组, 前后自身对照: (1)IL-6生理剂量组: IL-6浓度分别为20, 40, 80 μg/L; (2)TTX 10⁻⁵ mol/L组+IL-6(20, 40, 80 μg/L); (3)ICC破坏组+IL-6(80 μg/L), 每组18只. 将豚鼠击头放血处死, 剖腹截取距离回盲部3 cm远的近端结肠, 置于Tyrode液中. 漂洗干净, 剪去肌条的黏膜层. 在此过程中持续往Tyrode液通入950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂的混合气体. 肌条的规格: 8 mm×10 mm. 肌条分为2种: (1)带有ICC的近端结肠肌条; (2)破坏ICC的近端结肠肌条. 将肌条与张力换能器相连, 浸没于37℃ Tyrode液中孵育1 h, 待肌条收缩稳定后记录机械性收

缩信号. 用化学药物亚甲基蓝50 mmol/L+光照50 mW/cm²选择性破坏ICC. 光源采用可调聚光灯, 为可见光. 光波长532.0 nm, 照射在距光源3-5 cm的组织表面, 照射时间5 min. 光照强度用数字测光表测出. 该方法只破坏ICC结构而不破坏肌间神经网络及平滑肌细胞^[4]. 将豚鼠击头放血死后取近端结肠. 用Tyrode液清洗后将组织平铺于滤纸, 随后将其放入25 g/L戊二醛固定2 h. 切成2 mm×10 mm的肌条, 用1 g/L磷酸缓冲漂洗3次. 随后将其浸入浓度梯度序列酒精中脱水, 通过环氧树脂进行包埋. 1 μm切片使用甲苯胺蓝进行染色, 在光镜下观察黏膜层, 肌层和浆膜层. 超薄切片使用20 mL/L醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色20 min. 使用日立H-600透射电镜进行观察.

统计学处理 收缩振幅和周期用mean±SD表示, 采用SPSS统计软件进行分析, 对所得数据采用配对t检验分析, 双侧概率P<0.05, 即有统计学意义.

2 结果

2.1 IL-6对带有ICC的近端结肠收缩的平滑肌影响 在带有ICC的近端结肠纵行肌(n = 18)孵育后1 h出现稳定的收缩活动. 加入20, 40, 80 μg/L IL-6后结肠平滑肌的收缩振幅分别增加了4.0%(t = -1.116, P>0.05), 24.4%(t = -2.129, P<0.05), 67.3%(t = -10.722, P<0.01). 收缩频率分别加快了6.9%(t = 1.888, P>0.05), 12.2%(t = 2.948, P<0.01), 26.0%(t = 3.715, P<0.01)(表1, 图1).

2.2 TTX阻断肠神经后IL-6对结肠平滑肌收缩的影响 加入10⁻⁵ mol/L TTX阻断肠神经系统前结肠平滑肌(n = 18)收缩的幅度和频率分别为0.300±0.039 g和8.483±1.113 s, 阻断后为0.206±0.027 g, 9.770±1.711 s. 收缩振幅和频率分别下降了31.3%(t = 4.236, P<0.01), 15.2%(t = -2.765, P<0.05). 在TTX阻断肠神经后加入IL-6, 结肠平滑肌的收缩振幅分别增加了-9.7%(t = 1.666, P>0.05), -3.9%(t = 0.289, P>0.05), 13.1%(t = -2.693, P<0.05), 收缩频率增快了3.6%(t = 1.262, P>0.05), 10.3%(t = 1.590, P>0.05), 20.5%(t = 2.974, P<0.01)(表1, 图1).

2.3 损伤ICC对IL-6对结肠收缩兴奋作用的影响 正常ICC电镜下胞内含有大量的线粒体, 内质网, 细胞膜穴样内陷. 在亚甲基蓝孵育45 min, 光照10 min后, 电镜下ICC形态变化为胞核肿胀, 染色质均质化; 内质网扩张, 线粒体几乎无法辨认; 细胞膜穴样凹陷减少(提示细胞膜可能受到

表 1 正常和TTX阻断肠神经元后IL-6对近端结肠纵行肌收缩活动的影响(mean ± SD, n = 18)

	ρ (IL-6, μg/L)			
	0	20	40	80
正常 收缩				
振幅(g)	0.303 ± 0.033	0.315 ± 0.041	0.377 ± 0.061 ^a	0.507 ± 0.039 ^b
周期(s)	8.109 ± 1.532	7.546 ± 1.330	7.123 ± 1.361 ^b	6.000 ± 1.463 ^b
处理 收缩				
TTX 振幅(g)	0.206 ± 0.027	0.186 ± 0.036	0.198 ± 0.091	0.233 ± 0.022 ^a
周期(s)	9.770 ± 1.711	9.415 ± 1.844	8.673 ± 1.623	7.770 ± 1.156 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

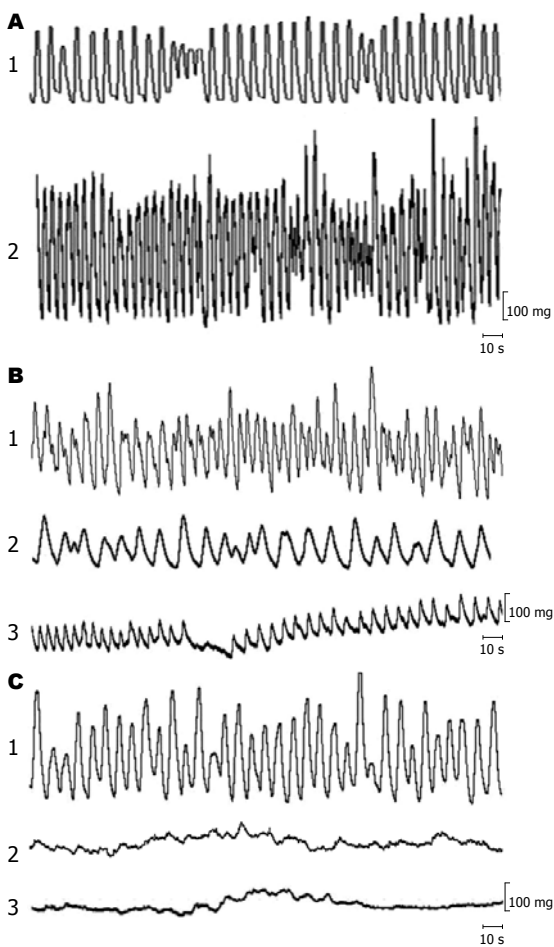


图 1 豚鼠游离结肠纵行肌收缩波形. A: 1正常, 2加IL-6 80 μg/L; B: 1加TTX前, 2加TTX 10⁻⁵ mol/l后, 3 TTX阻断肠神经加IL-6 80 μg/L后结肠收缩波形; C: 1 ICC破坏前, 2 ICC破坏后, 3 ICC破坏后加IL-6 80 μg/L后.

损害), 胞膜不完整. 而在光照后的结肠中平滑肌细胞几乎没有受到损害. 破坏的ICC通过连续的基质和细胞质特点(线粒体数量)以及和最内层肌细胞之间的联系进行鉴定(图2). 带有ICC的结肠肌条收缩的振幅和频率分别为0.324 ± 0.017 g, 8.541 ± 0.797 s; 用亚甲基蓝孵育加光照特异

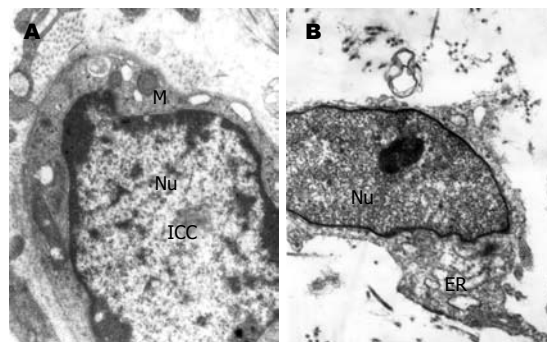


图 2 正常豚鼠结肠黏膜下层Cajal间质细胞. A: 正常(× 15 000); B: 亚甲基蓝孵育后光照(× 17 000).

表 2 ICC损伤后IL-6对近端结肠纵行肌收缩活动的影响

收缩	ρ (IL-6, μg/L)		
	ICC损伤前	ICC损伤后	ICC损伤+ IL-6 80 μg/L
振幅(g)	0.324 ± 0.017	0.080 ± 0.048 ^b	0.072 ± 0.020
周期(s)	8.541 ± 0.797	30.830 ± 5.917 ^b	30.167 ± 6.559

^bP<0.01 vs ICC损伤前.

性破坏结肠ICC使结肠(n = 18)收缩幅度和频率分别为0.080 ± 0.048 g和30.830 ± 5.917 s, 分别下降了75.3%(t = 3.792, P<0.01), 72.3%(t = -9.774, P<0.001). 损伤ICC后加入IL-6(80 μg/L)结肠平滑肌收缩振幅和周期分别为0.072 ± 0.020 g和30.167 ± 6.559 s, 与损伤ICC后肌条收缩活动无显著性差异(表2, 图1).

3 讨论

在部分胃肠动力障碍性疾病中, 消化道组织学的改变主要表现为免疫细胞浸润. 这些炎性细胞释放的炎性介质和细胞因子可能介导胃肠动力的改变. 目前研究发现, IBD, IBS, 术后胃肠动

同行评价

本文观察了IL-6对近端结肠平滑肌收缩的影响, 并进一步探讨了其作用机制. 研究内容较新颖, 实验设计较合理, 结果可信, 统计处理较正确, 讨论客观, 有一定的参考价值.

力障碍性疾病, 以及轮状病毒感染性腹泻消化道组织均有IL-1 β , TNF- α , IL-6等炎症因子的增高. 值得关注的是在部分伴发动力障碍的区域, 无病理学改变却伴有IL-6等增高^[2,3,5,6]. 这些研究提示, IL-6对胃肠动力失调可能存在直接的影响. IL-6对胃肠动力的影响及影响机制至今尚未阐明. 目前研究主要针对IL-6对神经细胞兴奋性的影响. Xia *et al*^[7]研究发现, IL-1 β , IL-6具有抑制快速型兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential, EPSP)和去甲肾上腺素型抑制性突触后电位(inhibitory postsynaptic potential, IPSP)的作用, 从而导致交感神经末梢去甲肾上腺素的释放减少. 而去甲肾上腺素是肠道分泌运动性神经元控制的关键, 推测IL-6等炎症因子增高, 引起肠道腺体分泌和运动亢进, 可能是腹泻型IBS发病基础. 我们发现, IL-6对近端结肠的收缩有直接的兴奋作用. 这一结果提示, IL-6不仅参与了肠道的炎症反应, 而且可能对腹泻型IBS, 分泌性运动性腹泻, 轮状病毒感染性腹泻中肠道运动功能失调有直接的影响.

IL-6对胃肠动力的兴奋机制尚不明确. 李改丽 *et al*^[8]通过免疫组化证实在中枢神经系统中广泛存在着IL-6R, 提示IL-6可能在肠神经元中也存在着相应的受体. 我们研究发现, 在加入TTX阻断肠神经元后, 高浓度的IL-6对结肠收缩的兴奋作用显著下降. 这一结果说明, IL-6的兴奋作用主要是通过兴奋肠神经元来完成的; IL-6可能除了影响兴奋性肠神经元的突触后电位以外还有可能导致肠神经递质的释放或者使相应受体上调而引起胃肠功能紊乱.

ICC不仅是慢波电位起搏细胞, 同时还是重要的信号传导枢纽. 目前研究发现, ICC的主要功能包括产生起搏电流以及介导神经递质对胃肠平滑肌的影响. 我们发现, IL-6对ICC遭特异性破坏的豚鼠结肠的兴奋作用几乎消失, 初步证实了ICC是炎症介质IL-6对平滑肌的兴奋途径中一个中间环节. ICC与神经元和平滑肌之间的信号传导机制目前尚未明了. Horiguchi *et al*^[9]在电镜研究中发现, ICC与肠神经元存在着突触联系, 与平滑肌细胞之间也存在着广泛的缝隙连接. 这为肠神经元与ICC之间的联系提供了形态学的依据. 最近Daniel *et al*^[10]发现, 在阻断缝隙连接以后, 犬的小肠和结肠的收缩幅度下降. 这提示肠神经对消化道收缩强度调节是通过ICC介导的. 目前研究发现, ICC存在着乙酰胆碱, NO, NK1等受体. 这几种神经递质可以调节ICC起搏

电流从而影响胃肠的收缩活动^[11,12]. 这提示IL-6可能通过影响神经递质的释放, 进而通过调节ICC起搏电流从而影响结肠平滑肌的收缩活动.

本研究尚存在一定的局限性. 主要是研究IL-6对豚鼠离体肌条的急性期作用. IL-6对活体的效应以及对机体的长期作用还未明了. 此外上述的胃肠动力障碍性疾病中通常有多种炎症因子的增高^[3,13]. 炎症因子之间的相互关系以及多因子对胃肠动力的综合作用尚待进一步研究. 总之, IL-6可以增强豚鼠近端结肠平滑肌的收缩, 其对平滑肌的兴奋效应主要是通过肠神经元介导. ICC是IL-6对平滑肌兴奋途径的一个中间环节. 深入探讨炎症介质IL-6对胃肠动力的影响机制对阐明胃肠动力障碍发病机制有重要意义.

致谢: 余国萍教授以及吕莉, 尹太郎, 黄杏, 曾彬, 艾耀伟的帮助.

4 参考文献

- 1 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 2005: 369-392
- 2 Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Speidel N, Grandis JR, Billiar TR, Bauer AJ. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 2004; 126: 159-169
- 3 Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006; 130: 304-311
- 4 Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD. Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am J Physiol* 1994; 266: G485-496
- 5 Gustot T, Lemmers A, Louis E, Nicaise C, Quertinmont E, Belaiche J, Roland S, Van Gossum A, Deviere J, Franchimont D. Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 488-495
- 6 Nakao A, Moore BA, Murase N, Liu F, Zuckerbraun BS, Bach FH, Choi AM, Nalesnik MA, Otterbein LE, Bauer AJ. Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility. *Gut* 2003; 52: 1278-1285
- 7 Xia Y, Hu HZ, Liu S, Ren J, Zafirov DH, Wood JD. IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* 1999; 103: 1309-1316
- 8 李改丽, 王百忍, 段晓莉, 鞠躬. L-6受体的多抗制备及其在正常大鼠脑内的分布. *神经解剖学杂志* 2004; 20: 281-286
- 9 Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric

- 10 antrum. *Cell Tissue Res* 2003; 311: 299-313
- 10 Daniel EE, Thomas J, Ramnarain M, Bowes TJ, Jury J. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 297-307
- 11 Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117
- 12 Huizinga JD, Golden CM, Zhu Y, White EJ. Ion channels in interstitial cells of Cajal as targets for neurotransmitter action. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 106-111
- 13 Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, Sato K, Ohama T, Momotani E, Ozaki H. Role of TNF-alpha in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF-alpha-deficient mice. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 578-588

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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论坛会议改期及征文通知(第二轮)

本刊讯 原定于2007-09-21/25在山东济南召开的第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术论坛因故提前一周改在2007-09-15/18举行。

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术论坛的主要议题是卫生部“十年百项”适宜技术推广和上海市重大医学成果转化项目内容。是继上海、河北、宁夏、黑龙江、江苏和浙江举办六届研讨会议的延续。本次会议由上海同仁医院、山东省省立医院和山东省医学影像研究所联合主办。山东省省立医院具体承办。世界华人消化杂志、中华介入放射学杂志、中华消化内镜杂志以及介入放射学杂志共同参与协办。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,拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化道病变、门静脉高压、胆道结石等的消化内镜、介入放射、外科及化学治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议中还将安排手术演示,演示内容非常丰富。相信通过本次会议,与会者代表必将获益匪浅。

热忱期待全国各地的同仁来到美丽的山东济南做客。我们诚挚邀请您前来参会,并衷心感谢您的支持和参与。继教学分:本次会议属国家级继续医学教育,参会者可获得国家一类继续教育学分12分。

1 征文内容

(1)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。(2)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。(3)消化病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件。

2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿,也可自荐,需全文。(2)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。(3)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。(4)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)。(5)截稿日期:2007-08-15。

3 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:张春清 250021 济南市经五路纬七路324号 山东省立医院消化科 电话:0531-85186350,0531-86701337 传真:0531-87902348 手机:0531-86701339 Email:zhchqing@medmail.com.cn。

利多卡因对造影剂及胰管结扎所致兔胰腺炎动物模型的影响

许良璧, 黄永辉, 李俐佳, 车筑萍

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是逆行胰胆管造影术(ERCP)和内镜下括约肌切开术(EST)后常见的并发症,在一定程度上制约该技术在临床上的推广和应用。然而,有关ERCP术后胰腺炎这一疾病的确切发病机制目前尚不清楚。本文就如何有效的预防该疾病发生及其所涉及的机制进行一系列基础研究。

许良璧, 车筑萍, 贵阳医学院附属医院内镜中心 贵州省贵阳市 550001
李俐佳, 贵阳市第一人民医院检验科 贵州省贵阳市 550001
黄永辉, 北京大学第三医院消化内科 北京市 100001
许良璧, 2005年贵阳医学院硕士, 主治医师, 主要从事消化内镜的诊断及治疗。
通讯作者: 许良璧, 550001, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院内镜中心. gzxlb@sina.com
电话: 0851-6855119-3173
收稿日期: 2007-02-26 接受日期: 2007-05-22

Effects of lidocaine in an experimental model of acute pancreatitis induced by contrast medium and pancreatic duct ligation

Liang-Bi Xu, Yong-Hui Huang, Li-Jia Li, Zhu-Ping Che

Liang-Bi Xu, Zhu-Ping Che, Digestive Endoscopy Center, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China
Li-Jia Li, Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Guiyang City, Guiyang 550001, Guizhou Province, China
Yong-Hui Huang, Department of Gastroenterology, The Third Hospital of Peking University, Beijing 100001, China
Correspondence to: Liang-Bi Xu, Digestive Endoscopy Center, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. gzxlb@sina.com
Received: 2007-02-26 Accepted: 2007-05-22

Abstract

AIM: To explore the effects of lidocaine in an experimental model of acute pancreatitis induced by contrast medium and pancreatic duct ligation, as well the rabbits' pancreatic sphincter pressure.

METHODS: Twenty-four rabbits were randomly divided into four groups, each containing six animals. The rabbit model of acute pancreatitis was set up by retrograde injection of 300 g/L Urografin in biliopancreatic duct and pancreatic duct obstruction. Before operation, lidocaine or distilled water was locally sprayed on the pancreatic duct distal sphincter in the I or II group, respectively. Then the pancreatic sphincter pressure was determined and pancreas pathologi-

cal changes were observed after 24 hours. The group III rabbits only underwent manometry of pancreatic duct sphincter, and group IV underwent sham operation.

RESULTS: The histopathological score of pancreas in rabbits showed that sprayed with lidocaine before operation, the head of the pancreas exhibited very mild edema and inflammatory cell infiltration, and the amounts of edema, inflammatory cell infiltration, necrosis and hemorrhage were significantly decreased compared with those in rabbits sprayed with distilled water (edema, 0.83 ± 0.75 vs 2.83 ± 0.41 ; inflammatory cell infiltration, 1.33 ± 0.52 vs 3.00 ± 0.00 ; hemorrhage, 0.00 ± 0.00 vs 0.67 ± 0.52 ; necrosis, 0.17 ± 0.41 vs 1.50 ± 0.55 ; all $P < 0.05$); and the pancreatic sphincter pressure was significantly reduced in group I compared with that in groups II and III (19.98 ± 6.47 vs 34.77 ± 8.36 , 32.67 ± 7.79 ; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Before operation, topical application of lidocaine significantly can reduce pancreatic sphincter pressure, and can also prevent pancreatitis induced by contrast medium and pancreatic duct ligation.

Key Words: Lidocaine; Acute pancreatitis; Pressure of pancreatic duct distal sphincter; Rabbit

Xu LB, Huang YH, Li LJ, Che ZP. Effects of lidocaine in an experimental model of acute pancreatitis induced by contrast medium and pancreatic duct ligation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2210-2214

摘要

目的: 探讨利多卡因对兔胰管括约肌压力和造影剂及胰管结扎相关胰腺炎的影响。

方法: 日本大耳兔24只随机分为4组, 每组6只。采用300 g/L的泛影葡胺0.5 mL/kg经兔胰管内逆行注射+胰管阻塞的方法造模。I, II组造模前分别用利多卡因或蒸馏水在胰管远端括约肌处进行局部喷洒, 观察其对于兔胰管括

约肌压力的影响及术后24 h胰腺病理形态学研究. III组只进行胰管括约肌测压, IV组为对照组, 只做开腹术.

结果: 术前利多卡因乳头局部喷洒组与蒸馏水喷洒组相比, 术后24 h胰头部分的病理组织学评分结果表明胰腺的病理改变主要表现为轻微的水肿和炎细胞浸润, 其水肿、炎细胞浸润、出血以及坏死的程度显著减轻(水肿: 0.83 ± 0.75 vs 2.83 ± 0.41 ; 炎细胞浸润: 1.33 ± 0.52 vs 3.00 ± 0.00 ; 出血: 0.00 ± 0.00 vs 0.67 ± 0.52 ; 坏死: 0.17 ± 0.41 vs 1.50 ± 0.55 , 均 $P < 0.05$). 利多卡因乳头局部喷洒组与蒸馏水喷洒组及单纯测压组相比, 利多卡因可显著降低胰管括约肌压力, 差异有统计学意义(19.98 ± 6.47 vs 34.77 ± 8.36 , 32.67 ± 7.79 , 均 $P < 0.05$).

结论: 利多卡因在胰管远端括约肌的乳头喷洒, 可以明显降低括约肌压力, 有效预防造影剂及胰管结扎所致胰腺炎.

关键词: 利多卡因; 急性胰腺炎; 胰管远端括约肌压力; 兔

许良璧, 黄永辉, 李俐佳, 车筑萍. 利多卡因对造影剂及胰管结扎所致免胰腺炎动物模型的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2210-2214

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2210.asp>

0 引言

急性胰腺炎(AP)是逆行胰胆管造影术(ERCP)和内镜下括约肌切开术(EST)后常见的并发症, 有关ERCP术后胰腺炎这一疾病的确切发病机制目前尚不清楚, Cosen-Binker *et al*^[1]和Tiscornia *et al*^[2]研究发现, 急性胰腺炎的最初激发因素可能在胰腺外, 关键在于激发位于十二指肠的Vater壶腹周围的自主性反射弧(autonomous arc reflexes, AAR), 以及肠胰间的负反馈环被破坏. 因此根据上述涉及到的发病机制, 我们通过激发自主性反射弧和破坏正常的肠胰间负反馈环, 而模仿临床ERCP术后胰腺炎的发生. 我们假设阻断自主性反射弧, 可以阻止或缓解急性胰腺炎的发生. 因此采用利多卡因喷洒在主胰管位于十二指肠的开口周围, 通过局麻药的神经阻滞作用, 了解自主性反射弧的抑制与急性胰腺炎之间的关系, 以及该药对于ERCP术后胰腺炎的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 日本大耳兔24只, 雌雄各半, 体质量

2.5-3 kg, 术前可自由饮水, 但术前常规禁食16-24 h. 随机分为4组, 每组6只. I组术前利多卡因5 mL乳头局部喷洒+胰管括约肌测压+胰管内注射300 g/L泛影葡胺0.5 mL/kg+胰管阻塞; II组术前蒸馏水5 mL乳头局部喷洒+胰管括约肌测压+胰管内注射300 g/L泛影葡胺0.5 mL/kg+胰管阻塞; III组单纯胰管括约肌测压组; IV组为正常对照, 只做开腹术.

1.2 方法 予30 g/L戊巴比妥钠1 mL/kg经兔耳缘静脉麻醉. 兔仰卧位放置在兔台上. 剪去腹部兔毛, 常规消毒铺敷后, 在腹正中经剑突下两横指切开腹部10 cm, 游离出胃幽门部, 沿十二指肠上段往下, 寻找主胰管进入十二指肠的位置(图1A兔胰腺呈粉红色, 散在于十二指肠“U”形弯曲部的肠系膜上, 仅有一条胰管开口位于十二指肠升支开始的5-7 cm处, 兔胰管开口远离胆管开口, 这是兔的一大特点). 剪开该部位对侧的肠壁约1 cm, 可以清楚的显示主胰管开口部的乳头括约肌(图1B). 经括约肌以50 mmHg的压力逆行灌注300 g/L泛影葡胺0.5 mL/kg(上海旭东海普药业有限公司生产)用7-0丝线结扎主胰管远端, 术毕关腹^[3-5]. 整个手术过程采用加热灯加热腹腔, 使腹腔温度下降不超过1-1.5℃, 避免因温度下降过多造成测压结果不可靠. 胰管括约肌压力测定管用Terumo公司生产的3Fr.130 cm的脑血管造影管自行改制. 导管改制成为长60 cm, 外径0.8 mm, 将尖端封闭, 在位于尖端4 mm处打一侧孔, 直径0.6 mm. 在测压管表面, 距测压孔每隔1 mm共有15个标记, 作为牵拉测压的标记. 测压仪器: BL-410生物机能实验系统(成都泰盟公司生产), HY-4型生理压力传感器(北京航天医学工程研究所生产), WZ-50微量灌注泵(浙江医科大学医学仪器实验厂), 灌注水流速度恒定于0.07 mL/min, 测压系统经校准. 经上述手术处理后, 暴露主胰管远端在十二指肠开口的乳头括约肌. 经乳头逆行插入测压导管至胰管, 稳定2 min后开始测压, 采用定点牵拉法, 每次向后牵拉约1 mm, 每点测压时间0.5-1 min, 直至测压孔完全进入十二指肠, 连续描记压力曲线, 胰管下段括约肌测压以十二指肠压力为“零”, 测定胰管远端括约肌的基础压^[6]. 每次测压时间不超过10 min. 于术后24 h, 经耳缘静脉快速推注过量的30 g/L戊巴比妥钠将动物处死. 开腹取出胰腺组织, 放置在中性福尔马林中, 室温下保存. 取胰头组织进行石蜡包埋、切片和HE染色. 请病理科2位资深专家进行双盲的病理组织学评分.

■ 相关报道

国内外研究报道利多卡因在乳头局部喷洒可以有效地防止治疗性ERCP术后淀粉酶的增高, 对胰腺炎的发生有明显预防作用, 并且可以方便插管. 大鼠的急性坏死性胰腺炎的动物模型, 采用盐酸利多卡因凝胶喷洒在十二指肠Vater壶腹周围, 可以明显减轻胰腺组织的损害, 血淀粉酶和脂肪酶也较病理组明显的减低.

■创新盘点

本论文从基础研究的角度,通过对动物模型的胰管括约肌压力测定,并结合胰腺病理损伤的情况,阐述利多卡因减轻胰腺损伤的机制。

表 1 胰腺病理组织学评分

分组	水肿	炎细胞浸润	坏死	出血	总分
I	0.83 ± 0.75	1.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41	0.00 ± 0.00	2.17 ± 1.33
II	2.83 ± 0.41	3.00 ± 0.00	1.5 ± 0.55	0.67 ± 0.52	8.00 ± 0.89
III	0.67 ± 0.52	0.11 ± 0.63	0.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41	4.50 ± 0.84
IV	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

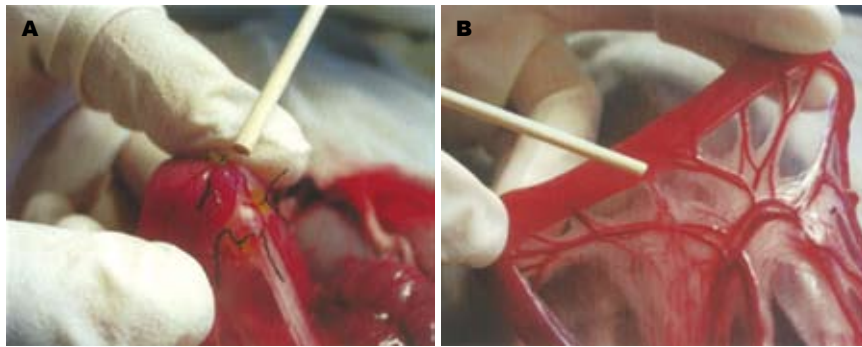


图 1 主胰管及胰腺和乳头括约肌。A: 主胰管及胰腺; B: 乳头括约肌。

胰腺组织的病变分为水肿、出血、炎性细胞浸润、腺泡和脂肪坏死,按损害程度不同分为0-3分不等。胰腺组织正常记为0分;病变范围轻,占30%以下记为1分;病变范围较重,超过30%但尚未达到50%记为2分;病变范围很重,超过50%记为3分^[3]。

统计学处理 全部数据录入计算机,采用SPSS11.5进行统计学分析。所有结果采用mean ± SD表示。术后24 h的病理结果进行比较,采用完全随机设计的单因素方差分析(ANOVA);如果差异有统计学意义,再进行组内两两比较,采用SNK-*q*检验;其他各组与IV组(对照组)比较,采用Dunnett-*t*检验;生理盐水或利多卡因喷洒乳头后括约肌的压力变化,以及基础状态下胰管括约肌的压力比较,采用单因素方差分析(ANOVA),如果差异有统计学意义,再进行组内两两比较,采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 病理组织学分析 胰腺组织病理损伤的程度在II组最重,主要表现为明显的水肿和炎细胞浸润;有轻微的出血和坏死,病变范围一般不超过50%,多数在30%以内,仍然是以水肿型胰腺炎的表现为主。而I组,胰腺主要表现为轻微的水肿和炎细胞浸润,在部分病例见散在的点状坏死,病变范围 $< 30\%$,而且没有明显的胰腺出血,仅表现为非常轻微的水肿性胰腺炎,部分病例甚至只有轻微的炎细胞浸润,而没有明显的

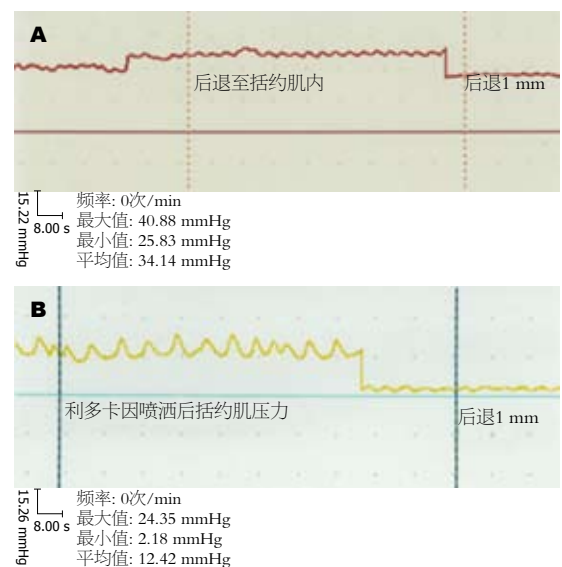


图 2 乳头局部喷洒后测胰管括约肌压力。A: 蒸馏水基础压为36.6 mmHg; B: 利多卡因基础压为15.56 mmHg。

胰腺水肿和坏死(图3)。胰头部水肿程度按严重程度由低到高IV-(I, III)-II ($P < 0.05$);炎细胞浸润按严重程度由低到高IV-(I, III)-II ($P < 0.05$);坏死按严重程度由低到高(IV, I, III)-II ($P < 0.05$);出血按严重程度由低到高(IV, I, III)-II ($P < 0.05$);胰腺病理组织损害总分由低到高IV-(I, III)-II ($P < 0.05$)(表1)。

2.2 胰管远端括约肌压力 I, II, III组括约肌测压结果分别为: 19.98 ± 6.47 , 34.77 ± 8.36 , 32.67 ± 7.79 。利多卡因在胰管远端括约肌的乳头部喷洒(图2B),与蒸馏水乳头部喷洒(图2A)及单纯测

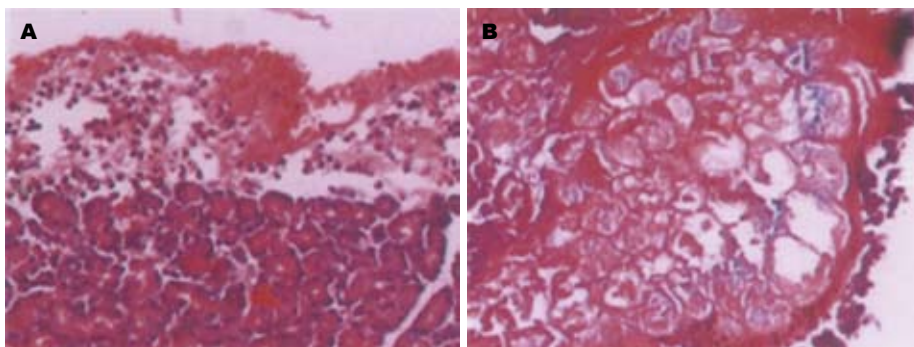


图 3 胰腺组织病理学. A: 轻度水肿及炎细胞浸润; B: 胰腺组织坏死.

■应用要点
利多卡因十二指肠乳头局部喷洒, 可以降低局部括约肌的压力, 并减轻胰腺的损害程度, 该方法简便、药物价格低廉、药源充沛, 可以作为预防ERCP术后胰腺炎的方法.

压比较, 括约肌压力的改变差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 II 组与 III 组比较, 括约肌的压力没有显著差异.

3 讨论

本次实验中, 选用兔为动物模型, 主要是考虑其独特的解剖特点, 兔的胰、胆管分别开口于十二指肠, 避免插管导致胆汁逆流入胰腺, 加重胰腺的损害, 以及引起括约肌功能异常, 从而影响括约肌的测压结果及胰腺病理形态学研究; 而且胰管远端括约肌明显, 其开口位于十二指肠, 一方面有利于我们插管测压, 另一方面便于我们了解利多卡因对于胰管括约肌的影响, 从而帮助解释利多卡因在十二指肠乳头局部喷洒, 能有效缓解 ERCP 术后胰腺炎的程度以及其降低 ERCP 术后胰腺炎的发病率的原因. 通过对 3 组胰管括约肌的基础压研究, 我们用利多卡因喷洒乳头后测压结果提示, 胰管括约肌的压力明显减低. 这与 Klein *et al*^[7] 观察的一致. 在这 3 组动物模型中, 我们都进行胰管括约肌测压术, 但测压结果都只发现胰管括约肌的基础压, 多数动物未见明显的收缩幅度及频率变化. 这可能与每一部位的测压时间不够长有关, 也可能与压力传感器等测压仪器的敏感度有关. 但鉴于长时间测压以及测压过程中灌注的生理盐水过多, 可以引起实验结果可靠性下降, 因此本实验采用的测压时间一般不超过 10 min. 即使这样, 我们仍在少数动物中发现胰管括约肌有收缩活动存在, 并描计下收缩幅度及频率. 我们相信若能改善测压技术, 采用液氮灌注; 或提高压力传感器的敏感性, 可以更加清楚的描计出完整的压力变化情况.

关于利多卡因降低 Oddi 括约肌的张力的机制, 既往的一系列慢性试验研究发现, 在清醒狗的 Vater 壶腹周围喷洒利多卡因可抑制胆碱能神经的张力, 松弛主胰管的出口, 以及减慢十二

指肠运动^[2]. 在近期通过免疫组化研究发现, 兔的胰岛、腺泡、胰管、神经节以及血管上分布着广泛的胆碱能 (AChE) 神经网络, 兔胰腺的所有神经组织化学染色都是 AChE 阳性的, 分布在胰头连结十二指肠肌间神经丛的是 AChE 和 NADPH-d 阳性的神经纤维, 利多卡因引起胰管远端括约肌压力减低可能与他抑制钠通道、阻止钠离子内流, 从而抑制胆碱能神经的张力^[8]. 因此, 我们认为 ERCP 术前乳头部喷洒利多卡因减少术后胰腺炎的发作, 可能是通过对局部胆碱能神经的抑制, 从而降低 Oddi 括约肌的张力, 改善胆胰液的引流, 解除梗阻这一不利因素而实现的.

III 组胰头部组织病理分析提示胰管的插管测压可以造成有很轻微胰腺的损害, 多数表现为轻微的水肿和炎细胞浸润. 其中 1 例仅表现为轻微的水肿, 面积小于 30%. 另 1 例仅有轻微的炎细胞渗出, 范围小于 30%. 这可能与测压这一过程扩张胰管远端括约肌, 刺激其周围的自主性反射弧感受器, 激发自主反射弧, 造成神经源性的炎症有关. 在 I 组模型中, 采用造模前乳头局部喷洒利多卡因, 术后 24 h 的胰腺水肿、炎性细胞浸润、出血、坏死的情况较 II 组明显减低, 这说明利多卡因能有效缓解胰腺的损害程度. 经过统计学研究发现, 利多卡因乳头局部喷洒后胰腺的出血及坏死情况较单纯测压组及对照组比较没有明显差异, 这进一步说明单纯测压对胰腺的损坏很轻微, 而利多卡因对胰腺的保护作用也就显而易见了. 利多卡因是如何改善胰腺损伤的呢? 一系列的研究使我们相信, 利多卡因局部浸润麻醉可以有效的抑制自主性反射弧的毒性作用, 抑制胰腺内胆碱能神经的张力; 从而有效的防止或减弱十二指肠壶腹周围的自主性反射弧的强度, 松弛主胰管的出口和减慢十二指肠运动^[9-10]. 近期, 黄永辉 *et al*^[9] 研究发现利多卡因在乳头局部喷洒可以有效地防止治疗

■同行评价

本文应用造影剂及胰管结扎来模拟临床ERCP的实际操作,分析应用利多卡因后括约肌压力及胰腺炎严重程度的关系,有较好的创新性。研究证实利多卡因术前应用可以明显减轻胰腺炎发生,其机制与降低括约肌压力有关,对于临床应用有一定指导意义,有较好的学术价值。

性ERCP术后淀粉酶的增高,对胰腺炎的发生有明显预防作用,并可以方便插管。

另外,由于测压过程可以引起胰液引流不畅,肠胰间的负反馈环遭到破坏,十二指肠黏膜分泌大量的胆囊收缩素(CCK),使血中CCK浓度升高。而CCK受体广泛存在于Oddi括约肌及其节后副交感神经纤维,不同动物对CCK的反应不同,CCK可兴奋兔的Oddi括约肌收缩^[11];而且可使胰腺外分泌增加,胰腺的酶以及各种蛋白分泌增加,胰液的黏稠度加大,胰管内压力进一步增高,腺泡破裂,胰酶进入间质被组织液激活引起炎症。Louie *et al*^[12]用大鼠进行实验发现,利多卡因十二指肠内灌注,可以明显减低由于胆胰分流造成的CCK水平升高。因此,利多卡因局部喷洒能减少ERCP术后胰腺炎的发生,可能与胰管远端括约肌的压力降低,以及胰腺的外分泌受抑制有关。目前,也有一些研究证实,利多卡因具有抗炎作用。Portiansky *et al*^[13]利用口蹄疫病毒感染大鼠,可以诱发急性坏死性胰腺炎;利多卡因腹腔内注射可以明显的减轻胰腺坏死和炎细胞的浸润。这是由于利多卡因可以抑制巨噬细胞的黏附、趋化、吞噬、脱颗粒以及呼吸爆发,减少吞噬作用引起的氧耗增加和超氧阴离子形成,并且可以减少炎症介质和多形核白细胞黏附分子的形成。这说明利多卡因局部喷洒,可能会通过其抗炎作用减轻胰腺的损坏。

本次实验中,通过利多卡因在乳头局部的喷洒,能明显减轻胰腺的炎症。这可能与抑制乳头周围分布的自主性反射弧有关;也与抑制胆碱能神经,减少CCK分泌和松弛胰管下断括约肌有关;另外,利多卡因的抗炎作用可能也与炎症的缓解有关。因此,我们认为ERCP术前喷洒利多卡因可以减少术后胰腺炎的发生,同样也可以缓解术后胰腺炎的严重程度。但是,近期Schwartz *et al*^[14]进行大规模人群研究的结果却与之相反,他们认为ERCP术前喷洒利多卡因并不能减少术后胰腺炎的发生,这是否与他们选择的利多卡因的剂型以及浓度和用量有关,还

有待于进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Cosen-Binker LI, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. Acute pancreatitis possible initial triggering mechanism and prophylaxis. *Pancreatol* 2003; 3: 445-456
- 2 Tiscornia OM, Hamamura S, Lehmann ES, Otero G, Waisman H, Tiscornia-Wasserman P, Bank S. Biliary acute pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 157-168
- 3 Hackert T, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Effects of heparin in experimental models of acute pancreatitis and post-ERCP pancreatitis. *Surgery* 2004; 135: 131-138
- 4 He ZJ, Winston JH, Yusuf TE, Micci MA, Elfert A, Xiao SY, Pasricha PJ. Intraductal administration of an NK1 receptor antagonist attenuates the inflammatory response to retrograde infusion of radiological contrast in rats: implications for the pathogenesis and prevention of ERCP-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: e13-17
- 5 许良璧, 黄永辉, 车筑平, 李利佳. ERCP术后胰腺炎的动物模型制备. *胰腺病学* 2006; 6: 105-107
- 6 杜凡, 魏经国. 高胆固醇血症兔胆道口括约肌动力功能与一氧化氮合酶关系. *第四军医大学学报* 2002; 21: 148-151
- 7 Klein ES, Grateron H, Toth L, Dreiling DA. Pancreatic intraductal pressure: II. Effects of autonomic denervation. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 510-512
- 8 Love JA, Szebeni K. Morphology and histochemistry of the rabbit pancreatic innervation. *Pancreas* 1999; 18: 53-64
- 9 黄永辉, 常玉英, 王于锦, 车筑萍, 孙诚谊. 利多卡因乳头局部喷洒对逆行胰胆管造影术后胰腺炎的预防作用. *中国内镜杂志* 2003; 9: 44-46
- 10 Tiscornia OM. The neural control of exocrine and endocrine pancreas. *Am J Gastroenterol* 1977; 67: 541-560
- 11 陈宝莹, 魏经国, 王耀程. Oddi括约肌解剖生理及其运动功能. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 226-229
- 12 Louie DS, May D, Miller P, Owyang C. Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am J Physiol* 1986; 250: G252-259
- 13 Portiansky EL, Gonzalez PH. Protective effect of lidocaine in the experimental foot-and-mouth disease pancreatitis. *Experientia* 1995; 51: 1060-1062
- 14 Schwartz JJ, Lew RJ, Ahmad NA, Shah JN, Ginsberg GG, Kochman ML, Brensinger CM, Long WB. The effect of lidocaine sprayed on the major duodenal papilla on the frequency of post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 179-184

编辑 程剑侠 电编 张敏

半枝莲黄酮类化合物对体外肿瘤血管生成的影响

徐敏, 卜平, 李瑶瑶

徐敏, 卜平, 李瑶瑶, 扬州大学医学院中医系 江苏省扬州市 225001

徐敏, 2003年扬州大学医学院本科毕业, 2006年扬州大学医学院硕士研究生毕业, 医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2001149

通讯作者: 卜平, 225001, 江苏省扬州市淮海路11号, 扬州大学医学院中医系. boping@yzu.edu.cn

电话: 0514-7978801

收稿日期: 2007-04-08 接受日期: 2007-04-28

Effects of an extract from *Scutellaria barbatae* D.DON on tumor angiogenesis *in vitro*

Min Xu, Ping Bu, Yao-Yao Li

Min Xu, Ping Bu, Yao-Yao Li, Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2001149

Correspondence to: Ping Bu, Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, 11 Huaihai Road, Jiangsu Province, China. boping@yzu.edu.cn

Received: 2007-04-08 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To explore the effects of the extract flavonoid A06 from *Scutellaria barbatae* D.DON on tumor angiogenesis *in vitro*.

METHODS: Human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) were treated with different concentrations of the flavonoid A06 (25, 50 and 100 mg/L). The effect of flavonoid A06 on the formation and migration of tubules in cultured HUVECs was evaluated by tube formation assay and Transwell chambers. The effect of flavonoid A06 on protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in human cervical carcinoma Hela cells was detected by enzyme-linked immunosorbent assay and the nitrate reductase method.

RESULTS: Flavonoid A06 extract from *Scutellaria barbatae* D.DON at two concentrations (50 and 100 mg/L) effectively inhibited migration ($37.7\% \pm 10.7\%$, $13.7\% \pm 6.0\%$ vs $68.0\% \pm 8.2\%$, both $P < 0.01$) and tubule formation in HUVECs (9.7%

$\pm 4.5\%$, $1.8\% \pm 1.2\%$ vs $30.2\% \pm 5.4\%$, both $P < 0.05$) after 24 h. Flavonoid A06 also decreased the protein expression of VEGF and NO in Hela cells after 24 h (VEGF, 135.6 ± 14.6 ng/L, 108.3 ± 7.7 ng/L vs 231.1 ± 6.4 ng/L, both $P < 0.01$; NO, 42.3 ± 2.3 $\mu\text{mol/L}$, 25.9 ± 5.2 $\mu\text{mol/L}$ vs 70.1 ± 8.1 $\mu\text{mol/L}$, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Flavonoid A06 inhibits tumor angiogenesis *in vitro*. Its mechanism may be related to the inhibition of the expression of VEGF and NO, endothelial cell migration and tubule formation.

Key Words: *Scutellaria barbatae* D.DON; Flavonoid; Angiogenesis; Human umbilical vein endothelial cells; Hela cells; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide; Enzyme-linked immunosorbent assay

Xu M, Bu P, Li YY. Effects of an extract from *Scutellaria barbatae* D.DON on tumor angiogenesis *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2215-2219

摘要

目的: 探讨中药半枝莲黄酮类化合物A06对体外肿瘤血管生成的影响。

方法: 分别采用小管形成实验、Transwell小室、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、硝酸还原酶法检测半枝莲黄酮类化合物A06对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)小管形成、迁移及人宫颈癌Hela细胞血管内皮细胞生长因子(VEGF)、一氧化氮(NO)表达的影响。

结果: 与对照组相比, 半枝莲黄酮类化合物A06(50和100 mg/L)都能有效抑制HUVEC细胞的迁移($37.7\% \pm 10.7\%$, $13.7\% \pm 6.0\%$ vs $68.0\% \pm 8.2\%$, 均 $P < 0.01$), 减少小管样结构形成($9.7\% \pm 4.5\%$, $1.8\% \pm 1.2\%$ vs $30.2\% \pm 5.4\%$, 均 $P < 0.05$), 以及降低24 h后Hela细胞VEGF和NO的表达(VEGF: 135.6 ± 14.6 ng/L, 108.3 ± 7.7 ng/L vs 231.1 ± 6.4 ng/L, 均 $P < 0.01$; NO: 42.3 ± 2.3 $\mu\text{mol/L}$, 25.9 ± 5.2 $\mu\text{mol/L}$ vs 70.1 ± 8.1 $\mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.01$).

结论: 半枝莲黄酮类化合物A06有抑制体外肿

■背景资料

临床上半枝莲是具有清热解毒、散瘀活血作用的常用中药, 在抗癌方中常配伍使用, 但对其抗肿瘤有效成分及作用机制, 目前仍缺乏清楚的认识. 本文从抗肿瘤血管生成的角度, 研究了半枝莲中的黄酮类化合物对血管内皮细胞迁移、形成管样结构及对肿瘤细胞分泌血管生成相关因子的影响。

■ 研发前沿

血管生成是近年来研究抗肿瘤方面的热门项目,肿瘤生长需要血管供应营养,因此阻断肿瘤血管生成,切断肿瘤组织获得营养的途径已经成为新的抗肿瘤治疗的靶点而且也成为抗肿瘤治疗中热门的研究内容。

瘤血管生成的作用,可能与抑制肿瘤细胞血管生成相关因子的表达,抑制内皮细胞迁移、形成管样结构有关。

关键词: 半枝莲; 黄酮类化合物; 血管生成; 人脐静脉内皮细胞; 人宫颈癌Hela细胞; 血管内皮细胞生长因子; 一氧化氮; 酶联免疫吸附测定法

徐敏, 卜平, 李瑶瑶. 半枝莲黄酮类化合物对体外肿瘤血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2215-2219
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2215.asp

0 引言

半枝莲为唇形科植物半枝莲*Scutellaria barbata* D. Don的干燥全草,药性辛、苦、寒,归肺、肝、肾三经。具有清热解毒、散瘀活血之功效。分布在我国大部分地区,资源极其丰富。民间用于肝癌、肺癌、肾癌等的治疗。有文献报道,半枝莲提取物对多种肿瘤细胞如S180, W256, 艾氏腹水瘤等具有生长抑制作用。在临床上,半枝莲可治疗肝癌、肺癌、乳腺癌、绒毛膜癌等^[1]。目前已经从半枝莲中分离出了一些化合物,主要是生物碱和黄酮类,这些化合物表现出促进细胞免疫、抗病毒、解热、保肝、抗肿瘤^[2]等作用。但是对于半枝莲抗肿瘤的药理作用机制、作用方式、有效部位和活性成分等方面的报道极少。我们前期研究发现,半枝莲含药血清能够抑制Matrigel栓内微血管的形成,阻断内皮细胞迁移,抑制血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达^[3]。现对半枝莲提取物中黄酮类化合物A06对肿瘤血管生成的作用机制进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、宫颈癌Hela细胞株由扬州大学医学院中医系实验室提供;半枝莲提取物黄酮类化合物A06由扬州大学医学院中药实验室提供;成纤维生长因子(bFGF)和Matrigel分别购自Sigma和BD公司;人VEGF的ELISA试剂盒购自武汉博士德公司;NO试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Annexin-V联合PI双染试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。将A06用二甲基亚砜(DMSO)、M199及DMEM培养基配置成1 g/L的母液,抽滤后-20℃保存,实验当天取出稀释成实验所需浓度。HUVEC和Hela细胞均在孵箱中常规培养,以胰蛋白酶消化后进行传代,取对数生长期细胞用于实验。在预实验中通过MTT比色法确定

半枝莲提取物A06的IC₁₀为104.08 mg/L,选择与IC₁₀接近的整数浓度并倍数递减作为实验的浓度。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞小管形成实验 将24孔板每孔加预先置4℃过夜的Matrigel 300 μL,在37℃,50 mL/L CO₂培养箱中聚合1 h,将HUVEC用胰酶消化后用培养液调为2×10⁸/L浓度的细胞悬液,并添加10 μg/L bFGF和分别25, 50, 100 mg/L的A06,另设空白组(孔内加细胞不加药)和溶媒对照组(培养液中含有0.1 g/L DMSO),混匀放入37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养6 h后在100倍Olympus倒置显微镜下观察小管形成的情况,每孔取5个视野计数小管形成数,取平均值。

1.2.2 内皮细胞迁移实验 将内皮细胞消化后以1×10⁸/L种入24孔板,在培养基中加入A06,药物终浓度为25, 50, 100 mg/L,终体积2 mL,并设阴性对照组和溶媒对照组共5组。37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h后消化,并用无血清M199培养基调整密度为1×10⁸/L。在Transwell上室的聚碳酸酯膜上加入3 mg/L的Matrigel 20 μL,37℃聚合30 min,在Transwell的下室加入600 μL Hela细胞条件培养液,同时上室分别种入用无血清M199稀释的内皮细胞,每孔100 μL。培养18 h后取出小室,用棉签拭去滤膜上层未迁移的内皮细胞,固定,染色,用刀片取下滤膜,中性树脂固定于载玻片上,在显微镜下随机计数中间和周围共5个视野细胞数,各组计数4个样本,求出平均值。

1.2.3 对Hela细胞VEGF和NO表达的影响 将Hela细胞消化后以3×10⁸/L种植6孔板,培养24 h后,用PBS清洗2次,加入100 mL/L NBS的DMEM培养基和药物,终浓度为25, 50, 100 mg/L,终体积2 mL。37℃,50 mL/L CO₂培养箱中分别培养24和48 h后收集培养上清,12 000 g离心10 min,取上清0.22 μm滤膜抽滤后,用ELISA和NO试剂盒测定上清中VEGF和NO含量。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件分析,实验结果以mean±SD表示,行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 A06对HUVEC内皮细胞小管形成及迁移的影响 低浓度(25 mg/L)A06作用后对小管形成数无明显影响。当A06浓度达到50 mg/L时对小管形成有明显影响,不仅小管数目减少,而且管腔不完整,与空白组相比有差异($P<0.05$),浓度达

■ 相关报道

半枝莲临床上多用于治疗肝癌、肺癌等,许多报道表明半枝莲提取物能够抑制多种肿瘤细胞如S180、W256等的生长,其提取出的生物碱和黄酮类的一些化合物具有促进细胞免疫、抗病毒、抗肿瘤的作用。

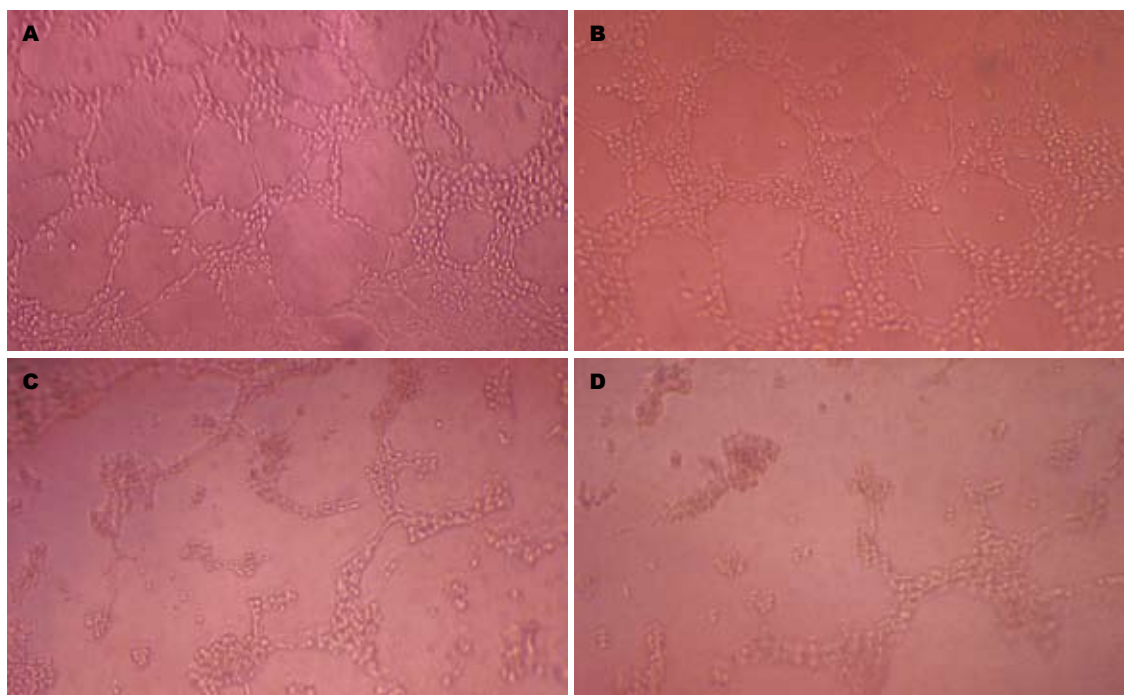


图 1 A06对HUVEC内皮细胞小管形成的影响. A: 对照; B-D: 25, 50, 100 mg/L A06.

到100 mg/L时, 很少有完整小管形成(表1, 图1). HUVEC经50, 100 mg/L A06作用后, 内皮细胞的迁移数明显减少($P < 0.01$)且迁移的内皮细胞数随着A06浓度的增加而减少(表1, 图2).

2.2 A06对Hela细胞分泌VEGF和NO的影响 A06作用24, 48 h后能抑制Hela细胞VEGF的表达($P < 0.01$), 但是作用24 h后各组之间比较没有差异, 作用48 h后, 中、高浓度组(50, 100 mg/L)之间比较有差异, 且经中、高浓度组作用后的Hela细胞VEGF表达24和48 h之间比较有差异($P < 0.05$). 50, 100 mg/L A06作用细胞24 h后能明显抑制肿瘤细胞的NO的表达, 具有显著差异($P < 0.01$), 且各浓度组之间比较有差异; 作用48 h后各浓度均能抑制Hela细胞NO的表达, 有显著差异($P < 0.01$). 各组同一浓度体系, 24与48 h相比在50, 100 mg/L时对NO表达影响具有显著差异($P < 0.01$), 其他浓度相比没有显著差异(表2).

3 讨论

血管生成是指从组织中既存的成熟血管形成新的毛细血管网络的过程. 1970年代, Folkman *et al*^[4-6]通过一系列实验证实了实体瘤的生长必须要有血管供应, 并提出了实体瘤生长时相(无血管期和血管期)的概念和血管生成开关机制学说. 大量实验证明, 多种肿瘤的生长、转移、复发和预后均与肿瘤血管生成密切相关, 与传统的肿瘤治疗相比, 抗肿瘤血管生成治疗的最大

■创新盘点

目前对于中药抗肿瘤作用的研究多停留在粗提物的水平, 缺乏对其确切成分和抗癌机制的深入研究. 本文采用半枝莲提取出的黄酮类化合物在研究抗血管生成的环节上进行深入, 研究了药物对于血管生成的一系列过程, 包括细胞迁移, 形成管样结构的影响, 以及产生这些影响的可能机制, 具有一定的新意.

表 1 A06对HUVEC小管形成及迁移的影响(mean \pm SD, $n = 4$)

分组	小管数/视野(%)	迁移(cell/视野)(%)
对照	30.2 \pm 5.4	68.0 \pm 8.2
溶媒对照	30.4 \pm 6.4	63.3 \pm 13.1
A06 25 mg/L	27.3 \pm 8.1	52.3 \pm 14.3
A06 50 mg/L	9.7 \pm 4.5 ^a	37.7 \pm 10.7 ^b
A06 100 mg/L	1.8 \pm 1.2 ^a	13.7 \pm 6.0 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

特点在于他不但具有良好的特异性, 而且克服了药物达到肿瘤组织的不足和肿瘤耐药性等问题. 因此, 以肿瘤血管生成成为靶点开发血管生成抑制剂, 在抗肿瘤研究中形成了一个十分活跃的研究领域.

VEGF是在促进肿瘤血管生成中起主要作用的细胞因子, 促肿瘤血管生成的其他因子如人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 血小板源性生长因子(PDGF), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 表皮生长因子(EGF)等, 这些生长因子其作用主要通过诱导VEGF表达实现促进肿瘤生长、浸润和转移的作用. 另外部分癌基因和抑癌基因也影响VEGF的表达, 如野生型p53能够抑制VEGF的表达, 而p53突变或缺失则通过引起VEGF的上调, 促进肿瘤血管生成; c-fos蛋白等也是通过上调VEGF的蛋白表达来促进肿瘤生长的. 此外,

应用要点

本研究发现半枝莲黄酮类化合物A06能够抑制内皮细胞迁移和小管样结构形成,实验表明其作用机制可能与A06能抑制肿瘤细胞分泌VEGF、NO这些血管生成促进因子有关,这将为进一步探讨半枝莲在肿瘤治疗方面的作用提供重要的实验依据,使后期实验有据可依。

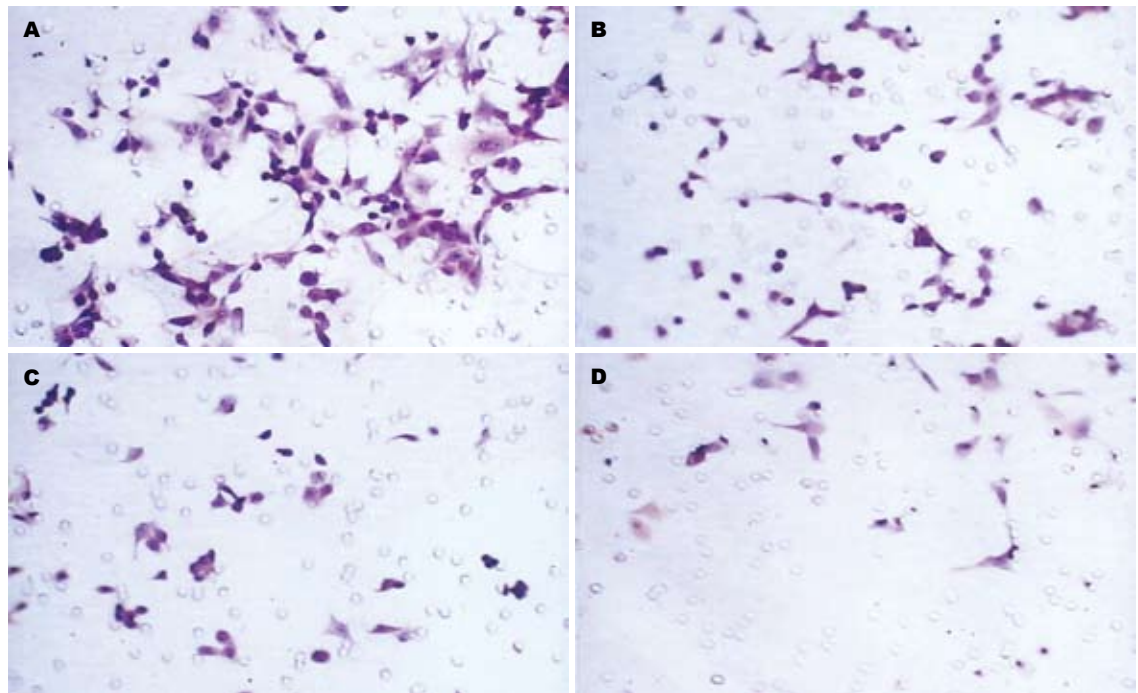


图2 A06对HUVEC内皮细胞迁移的影响. A: 对照; B-D: 25, 50, 100 mg/L A06.

表2 A06对Hela细胞分泌VEGF和NO的影响(mean ± SD, n = 4)

分组	VEGF(ng/L)		NO(μmol/L)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	231.1 ± 6.4	232.2 ± 9.6	70.1 ± 8.1	68.0 ± 3.9
溶媒对照	225.8 ± 21.3	225.0 ± 11.0	71.2 ± 3.8	66.0 ± 3.8
A06 25 mg/L	169.5 ± 12.5 ^b	147.1 ± 15.5 ^b	60.2 ± 5.2	51.1 ± 3.2 ^b
A06 50 mg/L	135.6 ± 14.6 ^b	114.3 ± 15.8 ^b	42.3 ± 2.3 ^b	28.3 ± 3.5 ^b
A06 100 mg/L	108.3 ± 7.7 ^b	77.8 ± 10.8 ^b	25.9 ± 5.2 ^b	14.7 ± 5.6 ^b

^bP < 0.01 vs 对照组.

在肿瘤生长过程中NO也起到重要的作用. Chin *et al*^[7]报道VEGF与其受体结合可增加细胞内NO的生成. 而NO又可促进VEGF的表达, 并增进其血管通透和扩血管作用, 从而起到促进肿瘤血管生成的作用.

传统中药有着几千年的实际应用经验, 因而从中寻找新药和先导化合物有着更高的命中率, 特别是与现代分子生物学的进展结合起来, 有着良好的应用前景. 近年来对中药在血管生成抑制方面的研究逐渐兴起, 如姜黄素能抑制CAM血管生成, 并能诱导肿瘤细胞凋亡^[8]; 人参皂甙Rg3可通过下调肿瘤VEGF的mRNA及蛋白的表达量来抑制肿瘤生长和转移^[9]; 薏苡仁注射液能抑制大鼠动脉环上的新生血管生成, 加快血管进入衰退期^[10]等. 半枝莲是传统的活血化瘀

类中药, 临床上常用于治疗肺癌, 消化系统癌症, 乳腺癌等, 取得较好的疗效, 但是其作用机制鲜见相关报道. 我们将半枝莲提取出的黄酮类化合物A06作用于HUVEC及肿瘤细胞中, 观察半枝莲黄酮类化合物A06对内皮细胞迁移、形成小管样结构的影响, 并观察了A06对于肿瘤细胞分泌血管生成相关因子VEGF和NO的影响, 初步探讨其抑制血管生成的机制. 研究表明, 半枝莲黄酮类化合物A06能抑制内皮细胞小管样结构形成和肿瘤细胞条件培养液刺激下的内皮细胞迁移, 实验表明其作用机制可能与A06能抑制肿瘤细胞分泌VEGF、NO这些血管生成促进因子有关, 为进一步探讨半枝莲在肿瘤治疗方面的前景奠定基础, 使后期实验有据可依.

尽管中药在抑制肿瘤血管生成方面的研究

工作起步较晚, 在具体机制等方面的研究与已进入临床实验的西药相比也有一定的差距, 但中药的毒副作用较小, 且有一定程度的辅助治疗作用(调节机体的免疫功能等), 相信随着研究的深入, 中药半枝莲的抗肿瘤血管生成作用将会逐渐受到重视, 其作用机制也会不断的被挖掘出来。

4 参考文献

- 1 叶健, 徐锡坤, 周建伟. 复方半枝莲体外抗癌作用及其机理的实验研究. *江苏医药* 1999; 25: 604-605
- 2 谭永红, 王诗华, 梁容梅. 中药半枝莲的研究进展. *西南国防医药* 2002; 12: 152-153
- 3 张妮娜, 卜平, 朱海杭, 沈维干. 半枝莲抑制肿瘤血管生成的作用及其机制研究. *癌症* 2005; 24: 1459-1463
- 4 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31
- 5 Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763
- 6 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190: 330-337
- 7 Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 1997; 15: 437-442
- 8 丁志山, 高承贤, 陈妮妮, 梁冰冰, 袁巍, 沃兴德. 姜黄素具有抑制血管生成与诱导肿瘤细胞凋亡双重作用. *中国药理学通报* 2003; 19: 171-173
- 9 潘子民, 叶大风, 谢幸, 陈怀增, 吕卫国. 人参皂甙Rg3对荷卵巢瘤的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究. *中华妇产科杂志* 2002; 37: 227-230
- 10 姜晓玲, 张良, 徐卓玉, 郭成浩. 薏苡仁注射液对血管生成的影响. *肿瘤* 2000; 20: 313-314

■同行评价

本文就中药半枝莲提出物黄酮类化合物A06对体外肿瘤血管生成的影响进行研究, 课题的切入点新颖, 对进一步阐明中药对肿瘤的作用机制有一定的意义。

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation
10 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007
15-18 October 2007
Kobe
apdw@convention.co.jp

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology
11-12 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

15th United European Gastroenterology Week, UEGW
27-31 October 2007
Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
12-17 October 2007
Pennsylvania Convention Center
Philadelphia, PA

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
2-6 November 2007
Boston - MA
www.aasld.org

人类SUZ12基因实时荧光定量PCR检测方法的建立

陈凤花, 胡丽华, 王琳, 李一荣, 周志明

■背景资料

PcG基因首先作为同源盒基因(homobox, Hox)的抑制因子在果蝇中被发现, 迄今为止已发现30-40种PcG基因, 统称为PcG基因家族. PcG家族蛋白不仅结构高度保守, 而且通过参与不同的信号通路, 调节不同的分子事件如自我更新/增殖、衰老/永生化的命运, 参与恶性肿瘤的发生、发展.

陈凤花, 胡丽华, 王琳, 李一荣, 周志明, 华中科技大学附属协和医院检验科 湖北省武汉市 430022
陈凤花, 2006年华中科技大学同济医学院博士毕业, 主治医师, 主要从事肿瘤的实验诊断研究.
湖北省科技攻关项目, No. 2005AA304B08
通讯作者: 陈凤花, 430022, 湖北省武汉市, 武汉协和医院检验科. chfh100@126.com
电话: 027-85726367
收稿日期: 2006-11-01 接受日期: 2007-01-01

Quantification of human SUZ12 with SYBR Green I real-time fluorescent polymerase chain reaction

Feng-Hua Chen, Li-Hua Hu, Lin Wang, Yi-Rong Li, Zhi-Ming Zhou

Feng-Hua Chen, Li-Hua Hu, Lin Wang, Yi-Rong Li, Zhi-Ming Zhou, Laboratory Department and Institute of Immunology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: The Key Program of Science and Technology Foundation of Hubei Province, No. 2005AA304B08

Correspondence to: Feng-Hua Chen, Department & Institute of Immunology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. chfh100@126.com

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

Abstract

AIM: To establish a real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) for quantifying human SUZ12.

METHODS: The SUZ12 fragment in pure form from classical RT-PCR was cloned to pGEM-T vector, and recombinant plasmid pGEM-SUZ12 was purified and quantified by spectrophotometry. A standard curve was established using a serial dilution of quantified plasmids to measure SUZ12, using SYBR Green I real-time fluorescent PCR, and the characteristics of the specific SUZ12 amplicon were analyzed by the melting curve.

RESULTS: The method could detect as few as 14.2 copies. Good linearity was found from 14.2 to 1.42×10^8 copies/reaction, and the correlation coefficient was -1.00. The intra- and interassay variation of 1.42×10^4 copies/reaction was 1.8%

and 2.8%, respectively. Melting curve analysis showed a single peak, and melting temperature (T_m) was $(81.37 \pm 0.16)^\circ\text{C}$.

CONCLUSION: SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR is rapid, specific, sensitive and accurate, and can be used for research on human SUZ12.

Key Words: SUZ12; SYBR Green I; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

Chen FH, Hu LH, Wang L, Li YR, Zhou ZM. Quantification of human SUZ12 with SYBR Green I real-time fluorescent polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2220-2224

摘要

目的: 建立SYBR Green I实时荧光PCR定量检测人类SUZ12基因的方法.

方法: 将SUZ12 RT-PCR扩增片段克隆入载体pGEM-T后, 经测序鉴定正确后, 进行纯化和定量及系列稀释, 应用SYBR Green I实时荧光定量PCR检测SUZ12, 建立标准曲线, 溶解曲线分析产物的特异性.

结果: 该法检测的最低拷贝数为14.2, 线性范围为 1.42×10^1 - 1.42×10^8 拷贝, 相关系数 r 为-1.00, 1.42×10^7 拷贝/L标本的批内变异系数(CV)和日间CV分别为1.8%和2.8%. 溶解曲线分析显示单一的峰, 溶解温度(melting temperature, T_m)为 $(81.37 \pm 0.16)^\circ\text{C}$.

结论: 实时荧光定量PCR方法检测SUZ12基因, 快速有效、灵敏度高、特异性好.

关键词: SUZ12; SYBR Green I; 实时荧光定量PCR

陈凤花, 胡丽华, 王琳, 李一荣, 周志明. 人类SUZ12基因实时荧光定量PCR检测方法的建立. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2220-2224

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2220.asp>

0 引言

人类SUZ12(suppressor of zeste 12, SUZ12)是

PcG(polycomb group, PcG)基因家族中的一员, 在胚胎发育、细胞周期、细胞增殖和分化的调控中起着极其重要的作用. PcG家族是在进化中高度保守的、防止细胞表型发生改变而记忆转录状态的细胞记忆系统的重要组成部分, 参与细胞一致性的保持、细胞周期的调节以及肿瘤发生、发展^[1-10]. 最近的研究发现SUZ12在不同的人类肿瘤包括结肠癌、乳腺癌和肝癌中表达明显上调^[9], 因此可能是一种新的肿瘤基因治疗的分子靶点. 在本研究中, 我们建立了SYBR Green I实时荧光定量PCR检测人类SUZ12基因的方法, 以期SUZ12的进一步研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌*E.coli* DH5 α 由本室保存, pGEM-T和T4 DNA连接酶购自Promega公司, 胶回收试剂盒和质粒小量抽提纯化试剂盒购自上海华舜公司, 氨苄青霉素为华北制药公司产品, 胰蛋白酶和酵母提取物购自英国Oxoid公司, dNTP购自MBI公司, Taq Gold为ABI公司产品, 20 \times SYBR Green I for Real-time PCR购自上海开放科技发展有限公司, 引物及测序由上海博亚公司完成, 上游引物: 5'-AAACGAAATCGTGAGGATGG-3'; 下游引物: 5'-CCATTTCCTGCATGGCTACT-3', 其他各种化学试剂均为国产分析纯产品. 荧光定量PCR仪LightCycler和毛细管均为Roche公司产品. 以人类乳腺癌细胞系MCF-7总RNA所逆转录合成的cDNA为模板, 以上述引物进行普通RT-PCR, 产物克隆入pGEM-T载体, 送上海博亚公司测序证实后, 小量抽提纯化质粒pGEM-SUZ12, 紫外分光光度计测定质粒浓度0.485 g/L, 根据公式[质粒浓度(g/ μ L)]/(660 \times 质粒长度bp) \times 6.022 \times 10²⁶(copies/L)换算出质粒DNA浓度为1.42 \times 10¹⁴ copies/L, 进行梯度稀释, 依次为1.42 \times 10¹¹-1.42 \times 10⁴ copies/L.

1.2 方法 20 μ L定量PCR反应体系包括: 10 \times PCR缓冲液2 μ L、dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ L、20 \times SYBR Green I液 1 μ L、Taq Gold (1000 U/L) 1 μ L、上游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L、下游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L、质粒DNA模板1 μ L、MgCl₂(20 mmol/L) 4 μ L、牛血清白蛋白BSA (1 g/L) 2 μ L. 阴性对照用1 μ L灭菌蒸馏水代替质粒DNA模板. 定量PCR扩增条件则为: 先94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 接着进行40个循环, 包括94 $^{\circ}$ C变性5 s, 53 $^{\circ}$ C退火5 s, 72 $^{\circ}$ C延伸10 s后进行荧光检测, 其检测温度为78 $^{\circ}$ C; 然后进行熔解曲线分析, 由70 $^{\circ}$ C以0.1 $^{\circ}$ C/s

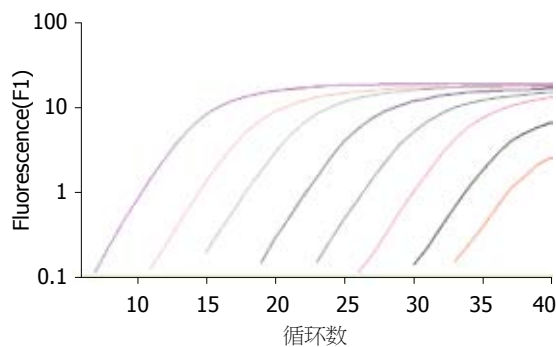


图1 SUZ12扩增荧光强度曲线图. 从左至右质粒DNA浓度为1.42 \times 10¹¹, 1.42 \times 10¹⁰, 1.42 \times 10⁹, 1.42 \times 10⁸, 1.42 \times 10⁷, 1.42 \times 10⁶, 1.42 \times 10⁵, 1.42 \times 10⁴ copies/L.

■ 相关报道

SUZ12参与胚胎发育、细胞周期调控、胚胎干细胞的分化等. SUZ12是PcG家族中的EED-SUZ12复合体发挥其内在的组蛋白甲基转移酶活性所必需的成分之一. SUZ12在不同的人类肿瘤包括结肠癌、乳腺癌和肝癌中表达明显上调, 可能是肿瘤基因治疗的分子靶点.

上升至95 $^{\circ}$ C; 最后冷却至40 $^{\circ}$ C. 为了进一步确认PCR反应的特异性, 将SUZ12扩增产物在25 g/L的琼脂糖凝胶中进行电泳. 一旦PCR产物的长度确认是正确的, 就只应用SYBR Green I实时荧光PCR的熔解曲线中T_m监测反应的特异性. 将1.42 \times 10⁷ copies/L的标准品平行操作8次或在8 d内分别测定, 获取其批内变异系数(CV)和日间CV.

2 结果

普通RT-PCR扩增SUZ12基因片段的产物长度为115 bp, 克隆入pGEM-T载体, 经测序证实, 与基因库序列一致.

2.1 SUZ12标准曲线 当质粒DNA浓度在1.42 \times 10⁴-1.42 \times 10¹¹ copies/L范围时, 曲线为一组典型的倒S型曲线(图1). 模板浓度越高, 可检测到荧光信号的循环数越少, 即其循环阈值(C_t)越小, C_t表示PCR循环过程中, 每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数; 随着循环数的增加, 荧光信号逐渐增强, 而当循环数达到一定程度时, 荧光强度达到平台. 标准曲线的横坐标为DNA浓度对应的Log值, 纵坐标为对应的C_t值. SUZ12的标准曲线为: C_t_{SUZ12} = -3.68 log(DNA concentrate)+37.05, 其相关系数r为-1.00(图2), 保证了C_t值和DNA浓度对应的Log值之间的线性相关, 即模板浓度与可检测的荧光信号的循环数之间呈负相关.

2.2 PCR产物的特异性 SUZ12特异性扩增产物对应的T_m为81.37 \pm 0.16 $^{\circ}$ C, 而SUZ12引物二聚体的T_m为76.54 \pm 0.51 $^{\circ}$ C, 因此我们将荧光检测温度定于两者之间为78 $^{\circ}$ C, 以排除非特异性荧光的干扰. 熔解曲线分析(图3)和25 g/L琼脂糖凝胶电泳(图4)双重确认PCR产物的特异性, SUZ12

■创新盘点

SYBR Green I 实时PCR定量检测SUZ12, 快速有效、灵敏度高、特异性好、重复性佳、定量检测范围宽。

表 1 标准品 1.42×10^7 copies/L批内和日间精密检测检测结果

批内	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct6	Ct7	Ct8	mean ± SD	CV
	21.80	21.69	21.81	22.37	21.82	22.81	21.78	21.78	21.98 ± 0.39	1.8%
日间	Ct 1 d	Ct 2 d	Ct 3 d	Ct 4 d	Ct 5 d	Ct 6 d	Ct 7 d	Ct 8 d	mean ± SD	CV
	21.8	22.3	23.2	22.3	21.8	22.6	21.9	23.4	22.47 ± 0.60	2.8%

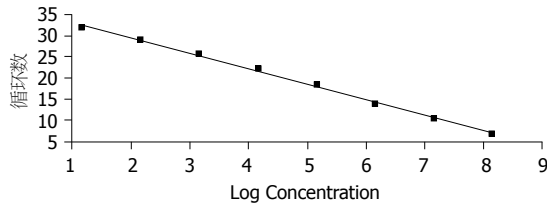


图 2 SUZ12标准曲线(斜率 = -3.68, 截距 = 37.05, r = -1.00).

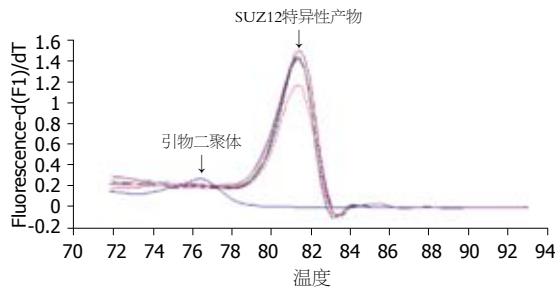


图 3 SUZ12熔解曲线(SUZ12特异性产物 T_m 为81.39°C, 引物二聚体 T_m 为76.32°C).

扩增产物的 T_m $81.37 \pm 0.16^\circ\text{C}$ 对应25 g/L琼脂糖凝胶电泳中的115 bp.

2.3 重复性与精密度 SYBR Green I实时定量PCR检测SUZ12, 1.42×10^7 copies/L标本的批内CV和日间CV分别为1.8%和2.8%(图5, 表1).

3 讨论

SUZ12又称为KIAA0160, JJAZ1和ChET9, 是PcG基因家族中的EED-EZH2复合体中的一员, 后者参与HOX基因沉默、X染色体灭活和肿瘤转移等[1-10]. SUZ12是EED-SUZ12复合体发挥其内在的组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMTase)活性所必需的成分之一[7,10]. 研究发现SUZ12基因是受双重启动子调控, 功能具有双向性; 其上游基因包括E2Fs, β -catenin等[9]. 在结肠癌、乳腺癌和肝癌的组织标本中SUZ12 mRNA的表达水平显著高于其对应的正常组织; 而在结肠癌细胞系中, 应用siRNA沉默SUZ12的表达, 发现一系列基因的表达发生改变[9], 提示SUZ12可能通过改变基因表

■应用要点

本研究中所建立的SYBR Green I 实时PCR定量检测SUZ12的方法, 用于研究SUZ12在肿瘤发生、发展、诊断、治疗以及预后中的作用具有重要的价值。

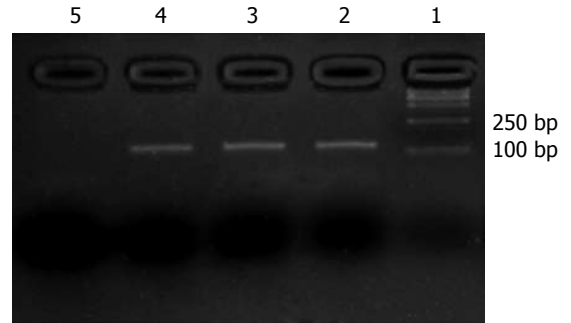


图 4 SUZ12产物电泳图. 1: DNA Marker DL2000; 2-4: SUZ12产物115 bp; 5: 阴性对照.

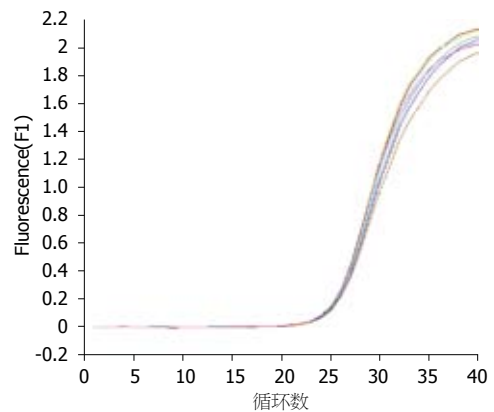


图 5 批内精密检测荧光强度曲线图.

达轮廓而调节肿瘤的表现型. 因此, SUZ12可能参与肿瘤的发生、发展, 而实时荧光定量PCR检测SUZ12方法的建立无疑为其在肿瘤中的进一步研究奠定基础.

目前最简单、经济、有效的实时荧光PCR方法就是通过嵌入双链DNA(dsDNAs)的荧光试剂如SYBR Green I 等来检测PCR扩增产物[11-13]. 在游离状态下, SYBR Green I 不发出荧光; 而在PCR的延伸阶段, SYBR Green I 与dsDNAs相结合而发出荧光, 随着反应的进行, 荧光信号逐渐增强. 荧光信号的强度依赖于反应体系中现有的dsDNAs(包括特异性扩增产物和引物二聚体等)的量. 因此, 一旦PCR反应体系中出现非特异扩增, 就会影响到定量结果的可靠性与重复性. 在本研究中, 我们参考Ball et al[14]的建议, 在每

一个PCR循环中延伸步骤后增加了一步, 即将温度提高后再检测反应体系中的荧光, 这个温度(78℃)大于引物二聚体的 T_m $76.54 \pm 0.51^\circ\text{C}$ 而小于特异性扩增产物的 T_m $81.37 \pm 0.16^\circ\text{C}$, 因而此时引物二聚体都变性成单链, 只检测到与特异性PCR产物结合的SYBR Green I所发出的荧光, 消除了引物二聚体的干扰, 降低了非特异性荧光, 有助于目标基因的准确定量。另外, 为了进一步验证PCR反应的特异性, PCR产物同时进行熔解曲线分析和凝胶电泳双重确定。在熔解曲线分析中, 温度由70℃缓慢上升(0.1℃/s)到95℃, 连续检测荧光; 在开始时, 所有DNA均退火结合成双链, 荧光信号最强; 而在产物 T_m 附近, 荧光信号则急剧下降。不同序列或长度的PCR产物在不同的温度下溶解, 因此可观察到不同的峰值。当只有特异性的PCR产物形成时, 在熔解曲线图中只可见单一的峰。 T_m 主要依赖于片段长度、序列组成、GC含量和反应中 Mg^{2+} 浓度等因素。在本研究中, SUZ12的PCR产物长115 bp, 其对应的 T_m 为 $81.37 \pm 0.16^\circ\text{C}$, 溶解温度均一, 峰的形状也较锐利; 而引物二聚体的 T_m 为 $76.54 \pm 0.51^\circ\text{C}$, 两者显著分开。

对于实时荧光PCR, 最为简单、准确的定量方法就是标准曲线法^[15-16], 即用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线, 在同等条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较, 从而得到目的基因的量。标准曲线是以起始拷贝数的对数为横坐标、Ct值为纵坐标; 理论上, 依次10倍稀释标准品所得的标准曲线, 其斜率应该接近-3.3。在实际应用中, 当相关系数 >0.95 , 斜率在-3.0至-3.9之间的标准曲线都被认为是可行的^[17]。由于质粒大量制备方便、稳定、浓度高、定量准确, 还可应用于实验室内或不同实验室之间的定量分析, 故一般采用质粒作为标准品。在本研究中, 我们应用重组质粒pGEM-SUZ12连续10倍稀释后得到的标准曲线为 $\text{Ct}_{\text{SUZ12}} = -3.68 \log(\text{DNA Concentrate}) + 37.05$, 相关系数 r 为-1.00, 都在公认的可接受范围内。我们建立的SYBR Green I实时PCR检测SUZ12的方法, 能够检测低至14.2个拷贝的目的基因, 并最终产生可高达8个数量级(1.42×10^1 - 1.42×10^8)的动态检测范围; 在此范围内, 模板浓度与Ct之间的相关性良好。重复性是判断实验结果优劣的另一种重要指标, 其主要判断指标之一为CV。SYBR Green I实时定量PCR检测SUZ12, 1.42×10^7 copies/L标本的批内CV和日间CV分别为

1.8%和2.8%, 均小于5%, 重复性较好。

因此, 本研究中所建立的SYBR Green I实时PCR定量检测SUZ12是一种快速有效、灵敏度高、特异性好、重复性佳、定量检测范围宽的方法, 用于研究SUZ12在肿瘤发生、发展、治疗以及预后中的作用具有重要的价值。

4 参考文献

- de la Cruz CC, Kirmizis A, Simon MD, Isono K, Koseki H, Panning B. The polycomb group protein SUZ12 regulates histone H3 lysine 9 methylation and HP1 alpha distribution. *Chromosome Res* 2007; 15: 299-314
- Pasini D, Bracken AP, Hansen JB, Capillo M, Helin K. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3769-3779
- Squazzo SL, O'Geen H, Komashko VM, Krig SR, Jin VX, Jang SW, Margueron R, Reinberg D, Green R, Farnham PJ. Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* 2006; 16: 890-900
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 301-313
- de la Cruz CC, Fang J, Plath K, Worringer KA, Nusinow DA, Zhang Y, Panning B. Developmental regulation of Suz 12 localization. *Chromosoma* 2005; 114: 183-192
- Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 2006; 20: 1123-1136
- Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzarini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 2004; 23: 4061-4071
- Lessard J, Sauvageau G. Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol* 2003; 31: 567-585
- Kirmizis A, Bartley SM, Farnham PJ. Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 113-121
- Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2004; 15: 57-67
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* 2002; 303: 95-98
- Schrader AJ, Lauber J, Lechner O, Heidenreich A, Hofmann R, Buer J. Application of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in urological oncology. *J Urol* 2003; 169: 1858-1864
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter

■名词解释

循环阈值(Ct)表示PCR循环过程中, 每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。Ct值越小, 表示PCR反应体系中的模板浓度越高。

■同行评价

本文建立了测定SUZ12的实时PCR方法,是一篇较好的方法学研究文章,具有潜在的临床应用前景. 研究方案设计合理、简明清晰,研究方法可靠,结果可信,文字流畅,表达简洁准确,质量较高,具有先进性和潜在的实用性.

- JM, Moorman AF. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 2002; 307: 63-69
- 14 Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT. Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 82-86
- 15 Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 127-135
- 16 Vandenbroucke II, Vandensompele J, Paepe AD, Messiaen L. Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E68-68
- 17 van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-1034

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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)

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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.

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在慢性乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用

张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 王雪艳, 丛旭, 魏来, 陈红松

张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 丛旭, 魏来, 陈红松, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044
王雪艳, 北华大学医学院 吉林省吉林市 132000
张恒辉, 2005年北京大学内科学硕士研究生毕业, 研究实习生. 主要研究方向肝炎及肝癌的免疫治疗.
国家自然科学基金资助项目, No. 30640091
北京大学人民医院研究发展基金, No. RDB2006-01
通讯作者: 陈红松, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝病研究所. chen2999@sohu.com
电话: 010-88325726 传真: 010-68318386
收稿日期: 2007-04-09 接受日期: 2007-05-11

Effects of regulatory T cells on anti-viral immune responses impaired by chronic hepatitis B

Heng-Hui Zhang, Fang Guo, Ran Fei, Hui Ma, Xue-Yan Wang, Xu Cong, Lai Wei, Hong-Song Chen

Heng-Hui Zhang, Fang Guo, Ran Fei, Hui Ma, Xu Cong, Lai Wei, Hong-Song Chen, Hepatology Institute, Peking University, People's Hospital, Beijing 100044, China
Xue-Yan Wang, Beihua University Medical College, Jilin 132000, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30640091; Peking University, People's Hospital Research and Development Foundation, No. RDB2006-01
Correspondence to: Hong-Song Chen, Vice Professor, Hepatology Institute, Peking University, People's Hospital, No. 11 Xizhimen South Street, Beijing 100044, China. chen2999@sohu.com

Received: 2007-04-09 Accepted: 2007-05-11

Abstract

AIM: To evaluate the proportion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) in the immunopathogenesis of patients with chronic hepatitis B (CHB), and to evaluate their potential application in CHB immunotherapy.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 34 patients with CHB and 18 healthy donors were evaluated for the CD4⁺CD25⁺ Treg phenotype and the proportion of CD4⁺CD25⁺ Tregs as a percentage of the total number of CD4⁺ cells using flow cytometry with triple-color/fourth-color staining. CD4⁺CD25⁺ Tregs were isolated from CHB patients by magnetic beads. Then PBMCs of Treg-depleted and non-Treg-

depleted CHB patients were stimulated with HBV core18-27 peptide. The percentage of HBV core18-27-specific cytotoxic lymphocytes (CTLs) and interferon (IFN)- γ -secreting CTLs was determined in PBMCs of Treg-depleted and non-Treg-depleted CHB patients by HLA-pentamer and Elispot (enzyme-linked immunospot assay) analysis.

RESULTS: The percentage of CD4⁺CD25⁺ Tregs in CHB patients was reflected by detecting the proportion of CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int} Tregs (4.40% \pm 2.11%) and CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺ Tregs (3.78% \pm 1.87%), which were significantly higher than the proportion of CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int} Tregs (2.11% \pm 1.26%) and CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺ Tregs (1.58% \pm 0.76%) in healthy donors ($P < 0.01$). The frequency and IFN- γ -secreting spots of NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells was higher in CD4⁺CD25⁻depleted PBMCs from CHB patients than in the total PBMC population of all patients tested (0.94% \pm 0.38%, 26 \pm 13 vs 0.20% \pm 0.18%, 119 \pm 30, $t = 5.25$, $t = 9.886$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The proportion of CD4⁺CD25⁺ Tregs in CHB patients seems to be greater than that in healthy donors. The elimination of Tregs can significantly improve the anti-viral CTL responses in CHB patients, compared with stimulation with HBV core18-27 peptide alone. This may contribute to immunotherapy in CHB patients.

Key Words: Regulatory T-Lymphocytes; Hepatitis B; Chronic

Zhang HH, Guo F, Fei R, Ma H, Wang XY, Cong X, Wei L, Chen HS. Effects of regulatory T cells on anti-viral immune responses impaired by chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2225-2230

摘要

目的: 探讨CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T Cell, Treg)在慢性乙型肝炎

■背景资料

最近, Treg细胞尤其是CD4⁺CD25⁺Treg细胞, 在人类肝脏疾病中的作用逐渐得以认识. 目前认为CD4⁺CD25⁺Treg细胞可以控制肝脏炎症的发生及避免肝细胞受到免疫攻击, 但当这种抑制作用发生HBV或HCV感染及肝脏肿瘤发生时, 则有可能导致病毒感染的持续以及肿瘤的进展.

■ 研发前沿

鉴于Treg在肝脏炎症及感染免疫方面的控制作用,关于慢性乙型肝炎患者中Treg表型、功能及作用近年来也是慢性乙型肝炎免疫发病机制方面的研究热点。

(chronic hepatitis B, CHB)患者免疫发病机制中的作用以及其可能在治疗中的应用前景。

方法: 收集未经抗病毒治疗的CHB患者34例和健康对照18例外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)标本,以三色/四色流式分析法对PBMC中CD4⁺CD25⁺Treg的频率及表面分子表达进行分析,并同时通过磁珠分选去除CHB患者PBMC中的CD4⁺CD25⁺Treg,分别以MHC-肽-五聚体法和酶联斑点计数法(enzyme-linked immunospot assay, Elispot)检测HBV core18-27抗原肽刺激的对HBV特异性的CTL(cytotoxic T lymphocyte)频率的升高以及IFN- γ 的分泌。

结果: CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺T细胞群以及CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int}T细胞群所占CD4⁺T细胞群的比例与健康对照相比均明显上升(3.78% \pm 1.87%, 4.40% \pm 2.11% vs 1.58% \pm 0.76%, 2.11% \pm 1.26%; $t = 4.86$, $t = 5.96$; $P < 0.01$)去除CHB患者中CD4⁺CD25⁺Treg后,特异性CTL的频率以及其分泌IFN- γ 的频数与未去除组比出现显著上调(0.94% \pm 0.38%, 26 \pm 13 vs 0.20% \pm 0.18%, 119 \pm 30; $t = 5.25$, $t = 9.886$; $P < 0.01$)。

结论: CHB患者循环中增多的Treg可能参与抑制抗HBV的免疫应答抑制,去除Treg以及联合病毒抗原肽刺激的进一步研究可能为CHB的免疫治疗提供新的思路。

关键词: 调节性T细胞; 乙型肝炎; 慢性

张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 王雪艳, 丛旭, 魏来, 陈红松. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在慢性乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2225-2230
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2225.asp>

0 引言

最近, Treg细胞尤其是CD4⁺CD25⁺Treg细胞,在人类肝脏疾病中的作用逐渐得以认识. 目前认为CD4⁺CD25⁺Treg细胞可以控制肝脏炎症的发生及避免肝细胞受到免疫攻击. 但是当CD4⁺CD25⁺Treg的这种抑制作用在发生HBV或HCV感染及肝脏肿瘤发生时,由于CD4⁺CD25⁺Treg抑制了机体抗HBV或HCV及抗肿瘤免疫应答的能力,则有可能导致病毒感染的持续以及肿瘤的进展. HBV感染的控制与特异性的CD8⁺T细胞介导的细胞毒性T细胞(cytotoxic T

lymphocyte, CTL)及CD4⁺T辅助细胞引起的免疫应答有关. 研究证实,在机体发生一些病原微生物感染时,机体的Treg的数量增多且可抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的活化增殖及细胞因子的分泌,从而影响机体抗感染免疫应答的发生,导致感染的持续^[1-4]. 国内外在慢性HBV感染患者中CD4⁺CD25⁺Treg的研究中,对于慢性HBV感染患者外周血中CD4⁺CD25⁺Treg细胞的比例是否升高并不一致^[5-6],且对于CD4⁺CD25⁺Treg细胞在慢性HBV感染患者免疫发病机制中作用及去除CD4⁺CD25⁺Treg细胞后是否能有效增强HBV抗原肽诱导的抗HBV免疫应答尚不确定. 为了进一步明确上述问题,我们收集了34例CHB患者外周血采用多组CD4⁺CD25⁺Treg特异性标记对其循环中的CD4⁺CD25⁺Treg细胞频率进行确证,同时探讨CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg的体外去除能否增强CHB患者抗病毒免疫应答的能力。

1 材料和方法

1.1 材料 CHB患者34例,诊断符合2005年制定的《慢性乙型肝炎防治指南》. 患者平均年龄41(27-69)岁,全部患者均经ELISA方法检测HBV血清学标志: HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb,并用荧光定量PCR方法检测HBV DNA水平(5.4×10^5 - 2.1×10^8 copies/mL). 排除HCV, HAV, HDV, HEV感染,近3 mo没有接受过抗病毒治疗. 健康对照18例为健康献血员,所有组织标本及血液标本的收集均征得患者及健康献血员本人的书面知情同意. 鼠抗人CD4-PerCP-Cy5.5, CD45RO-APC, CD25-FITC, CTLA-4-PE, CD45RA-PE, HLA-DR-PE, 鼠抗人HLA-A02 mAb均购于美国BD公司; 鼠抗人GITR-FITC购自美国R&D公司; 流式细胞仪为美国BD公司; CD4负选、CD25正选磁珠购于加拿大Stem cell公司; HBV核心肽(HBV core18-27 FLPSDFFPSV)由上海生物医学工程公司合成; HBV core18-27肽五聚体(PE-conjugated HLA-0201/HBV core18-27 pentamer)以及HCV NS3肽五聚体(PE-conjugated HLA-0201/HCV NS3 pentamer)购自英国Proimmune公司. 静脉抽取外周血10 mL,抗凝,小心铺于淋巴细胞分离液10 mL表面,梯度离心20 min(22 $^{\circ}$ C, 450 r/min),细胞悬液和淋巴细胞分离液之间的白膜层即为所分离得到的单个核细胞,小心吸出后,用预冷RPMI 1640稀释,400 r/min离心15 min,去除混杂的淋巴细胞分离液;最后

表 1 CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞占CD4⁺ T细胞比例(means ± SD, %)

分组	n	CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg	CD4 ⁺ CD127 ^{lo}	CD4 ⁺ CD25 ⁺
			CD25 ^{hi-int} Treg	CD45RO ⁺ CTLA4 ⁺ Treg
CHB患者	34	4.12 ± 1.21	4.40 ± 2.11 ^b	3.78 ± 1.87 ^b
健康志愿者	18	3.58 ± 0.86	2.11 ± 1.26	1.58 ± 0.76

^bP<0.01 vs 健康志愿者.

用预冷RPMI 1640悬浮细胞沉淀, 300 r/min离心5 min, 即可分离到外周血单个核细胞.

1.2 方法 取全血100 μL与鼠抗人HLA-A02单抗100 μL室温共孵育15 min, 加入红细胞裂解液2 mL裂解红细胞, PBS洗1遍, 加羊抗鼠IgG-FITC 1 μL, 室温避光反应15 min, 2 mL PBS洗3遍. 最后用10 g/L多聚甲醛300 μL重悬固定, 行流式细胞仪检测. 同时每份标本均设自身阴性对照. 取2×10⁵ PBMC分别与CD-4-PerCP-Cy5.5, CD45RO-APC, CD25-FITC, CTLA-4-PE以及CD127-PE抗体室温共孵育15 min. 以流式细胞仪双色、三色、四色分析法分别分析CD4⁺CD25^{high} Treg细胞、CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int} Treg细胞、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺ Treg细胞占CD4⁺ T细胞的比例. 同时取CD4-PerCP-Cy5.5, CD25-FITC, CD62L-PE, CD45RA-PE, HLA-DR-PE, GITR-FITC标记各份PBMC样本以流式细胞仪三色分析法分析CD4⁺CD25⁻ T细胞, CD4⁺CD25^{low} T细胞, CD4⁺CD25^{high} Treg细胞表面分子CD45RA, HLA-DR, GITR以及CD103的表达. 每份检测标本均设自身阴性对照. 将密度梯度离心法分离的PBMC用CD4负选磁珠分选法去除单个核细胞中的CD4⁻ T细胞; 再使用CD25正选磁珠法分选出CD4⁺CD25⁺ T细胞, 剩余细胞即为CD4⁺CD25⁻的T细胞.

1.2.1 HBV特异性CTL的诱导和HBV core18-27特异性的CTL的检测 将第1次磁珠分离后的CD4⁺ T细胞以及第2次磁珠分离后的CD4⁺CD25⁻ T细胞混合, 在体外进行IL-2 30 kU/L维持培养, 同时给予HBV core18-27多肽(10 mg/L)刺激, 每6 d刺重复刺激. 将去除以及未去除CD4⁺CD25⁺ Treg细胞CHB患者的PBMC体外培养2-3 wk后进行HBV core18-27特异性的CTL的检测. 取CHB患者体外培养2-3 wk的去除以及未去除CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的PBMC, 分别用PBS调节为数量为4×10⁵/管, 加入PE标记HBV core18-27肽五聚体10 μL避光, 室温反应15 min, 用PBS

洗涤细胞2次后加入FITC标记的抗CD8抗体10 μL, 冰上避光孵育15 min, 用PBS洗2遍. 10 g/L多聚甲醛300 μL重悬固定, 行流式检测. 每例患者标本均设各自同型对照. 对于CHB患者, 采用HLA-A0201/HCV NS3五聚体标记作为阴性对照, 该实验每个标本均设平行管, 取2次流式检测结果均值进行统计学处理.

1.2.2 Elispot检测分泌IFN-γ的T细胞频数 采用BD公司IFN-γ Elispot检测试剂盒. 具体操作可详见试剂盒操作说明. 加入细胞组别分别为CHB患者单纯经IL-2维持组、经HBV core18-27刺激并去除CD4⁺CD25⁺ Treg的CHB患者PBMC, 经HBV core18-27刺激的CHB患者PBMC, 加入细胞数2×10⁵/孔. 经孵育、洗板、标记、显色等步骤后采用CTL公司Immunospot分析仪计数每孔斑点数.

统计学处理 用SPSS11.0软件进行统计分析, 对于多组间采用F分析, 两组间比较采用双侧t检验, 相关性分析采用Spearman法, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺ Treg的比例和表型 CHB患者循环中CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int} Treg细胞, CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺ Treg细胞占CD4⁺ T细胞的比例均显著高于健康志愿者循环中上述二群细胞占CD4⁺ T细胞的比例($t = 5.96, t = 4.86, P < 0.01$, 表1). 且对比CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int} Treg细胞、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺ Treg占CD4⁺ T细胞的比例发现, 二群细胞在反映CD4⁺CD25⁺ Treg比例上有很强的正相关性($r = 0.96, P < 0.01$). 以流式细胞仪三色分析法分析发现, 与CD4⁺CD25⁻ T细胞、CD4⁺CD25^{low} T细胞相比CHB患者及健康对照外周血中CD4⁺CD25^{high} T细胞表面分子CD45RA低表达, 而HLA-DR, CTLA-4, CD45RO高表达. 研究还发现, CHB患

■ 相关报道

对于慢性HBV感染患者外周血中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的比例是否升高, 目前仍有争议, 且对于CD4⁺CD25⁺ Treg细胞在慢性HBV感染患者免疫发病机制中作用及去除CD4⁺CD25⁺ Treg细胞后是否能有效增强HBV抗原肽诱导的抗HBV免疫应答尚不确定.

■ 创新盘点

本研究进一步明确了CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg频率的增高且处于抑制功能的活化状态,且体外去除CHB患者PBMC的CD4⁺CD25⁺Treg后,对患者PBMC在体外进行HBV core18-27肽多次负载,发现CD4⁺CD25⁺Treg的去除可显著增强HBV core18-27肽诱导的HBV特异性的CTLs数量的增多和IFN- γ 分泌,从而有效上调CHB患者体外的抗HBV的免疫应答。

者CD4⁺CD25^{high}Treg表面GITR以及CD103分子与健康对照相比均出现明显上调($t = 3.85, t = 4.97, P < 0.01$, 图1)。

2.2 去除CD4⁺CD25⁺Treg细胞的影响 经HLA-A2型别鉴定,34例CHB患者中筛选出12例HLA-A2⁺CHB患者。对于该12例HLA-A2⁺CHB患者,通过磁珠分选可有效去除CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺Treg细胞,去除效率可达到90%以上(数据未显示)。分别对于去除CD4⁺CD25⁺Treg细胞或未去除的CHB患者PBMC在经HBV-core18-27多肽多次刺激后,行HBV core18-27肽五聚体标记与流式检测发现,去除CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg细胞后可显著增强HBV core 18-27肽诱导的CTL频率(Treg未去除0.20% \pm 0.18%, Treg去除后0.94% \pm 0.38%; $t = 5.25, P < 0.01$, 图2A, C)。Elispot检测HBV core18-27特异性的CTL分泌IFN- γ 的T细胞的频数发现,去除CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg细胞后CTL分泌IFN- γ 的频数(119 \pm 30)显著高于未去除Treg的患者(26 \pm 13, $t = 9.886, P < 0.01$, 图2B)。

3 讨论

目前关于CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺Treg细胞频率是否升高存在争议,我们对CHB患者循环中CD4⁺CD25^{high}T细胞、CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int}T细胞、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺T细胞进行比较发现,CHB患者循环中经流式双色分析检测出CD4⁺CD25^{high}T细胞频率与健康对照之间无统计学差异,这一点与Franzese *et al*^[6]结果一致。而经三色及四色流式分析的CHB患者循环中CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int}T细胞、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺T细胞频率则显著高于健康对照,其中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺T细胞频率升高与Stoop *et al*^[5]人报道一致。这些研究中Treg的比例检测的差异可能主要是由于当前对Treg细胞界定及检测方法不同所致。目前多数对于CD4⁺CD25⁺Treg研究主要通过检测CD4⁺CD25^{high}T细胞来反映体内CD4⁺CD25⁺Treg的频率。但CD25虽然可作为鉴定CD4⁺CD25⁺Treg典型标志,但一些活化的T细胞也可表达此分子。故在本研究中我们采用了一些更为特异的标志。通过流式检测HCC及慢性HBV感染患者外周血中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺4种标记物阳性的T细胞来反映Treg细胞。CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen

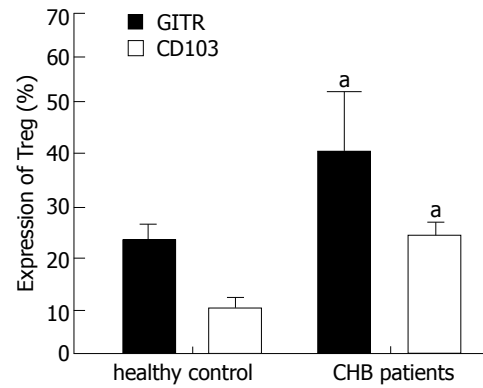
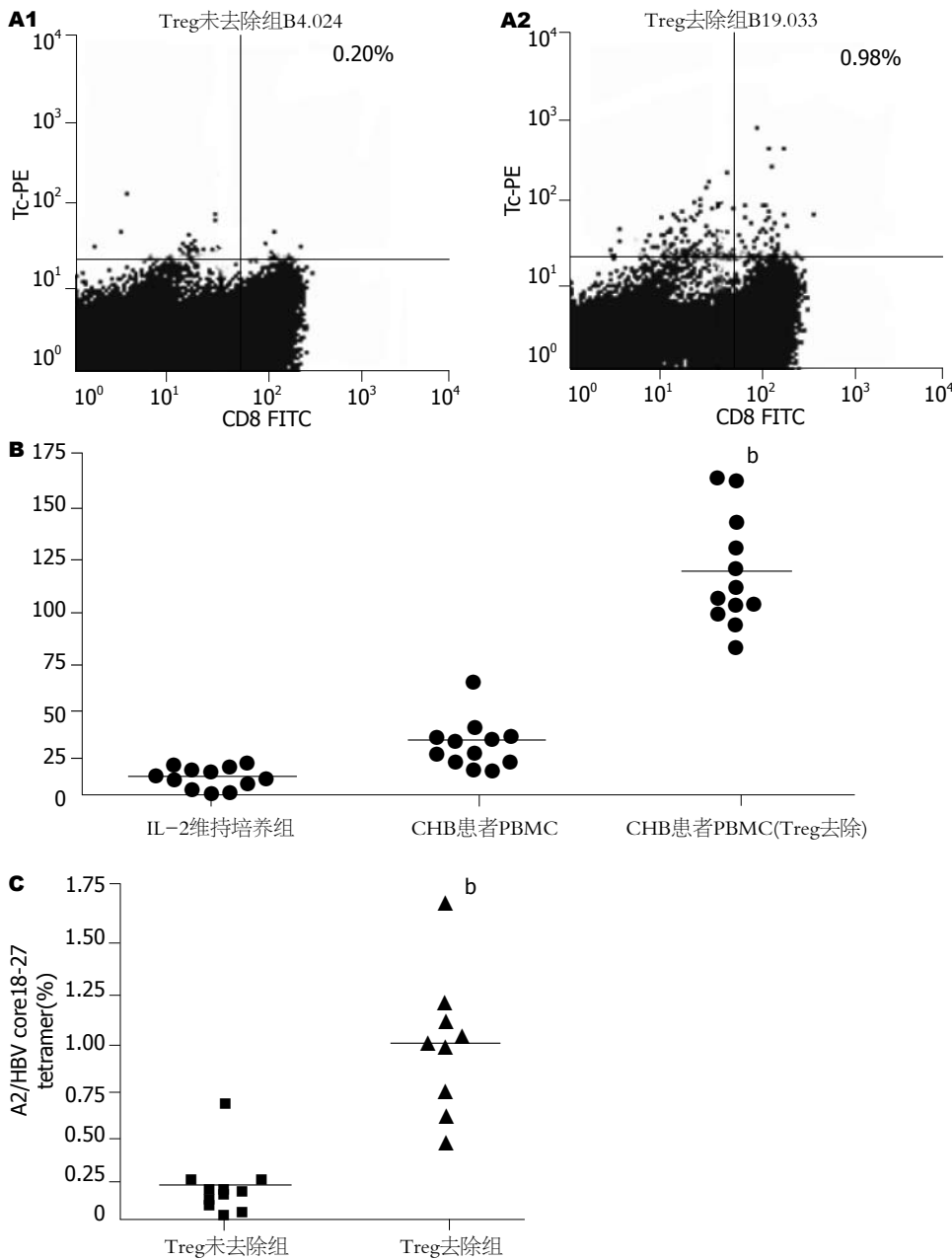


图1 CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg细胞表面GITR, CD103表达。 $P < 0.05$ vs 健康对照。

4)也称细胞毒T细胞相关抗原-4,是T细胞表面重要膜分子^[7-8],CD4⁺CD25⁺T细胞活化后CTLA-4的表达增加,并持续表达,故认为CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺T细胞的频率更能准确的反映体内活化的天然产生的Treg细胞,从而区别于抗原反复刺激诱导产生的获得性Treg细胞^[5]。此外,Foxp3(forkhead/winged helix transcription factor)又称叉状头/翅膀状螺旋转录因子,作为Treg细胞特异性表达的基因和抑制功能维持的主要调节基因是Treg细胞的特异性标志^[9-10]。但Foxp3属于胞内蛋白,检测时的细胞破膜处理过程会影响检测的结果和下游的试验,而最近发现CD127的低表达与Foxp3表达及其一致且与CD25中等-强表达有良好的相关性,故检测CD127^{lo}CD25^{hi-int}T细胞可较好的反映CD4⁺CD25⁺Treg的频率^[11-12]。因此,我们通过上述方法学的比较发现,CHB患者循环中CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi-int}Treg细胞、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CTLA4⁺Treg细胞频率显著高于健康对照,且两种检测方法所得结果有很好的-一致性($r = 0.96, P < 0.01$),上述结果进一步证实了CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg细胞频率升高。

在对CD4⁺CD25⁺Treg细胞表面分子进行研究时,我们发现,CHB患者中CD4⁺CD25⁺Treg细胞表面糖皮质激素诱导的TNFR相关基因(glucocorticoid-induced TNFR-related protein, GITR)的表达与健康对照相比均显著上升。GITR又称TNFRSF18,为TNF受体超家族成员之一,静止T细胞呈低水平表达GITR,而CD4⁺CD25⁺调节性T细胞则呈高水平表达;T细胞一旦激活则GITR的表达水平则会上调。CHB患者CD4⁺CD25⁺Treg细胞表面GITR表达增高反映了



应用要点
本研究对于进一步研究CD4⁺CD25⁺Treg在CHB患者免疫发病机制中的作用, 探讨利用去除或干扰CD4⁺CD25⁺Treg功能作为慢性乙型肝炎免疫治疗策略提供了前期试验证据。

图 2 CHB患者Treg去除后HBV特异性CTL频率及IFN- γ 分泌 ($P < 0.01$ vs Treg未去除组)。A: HBV core18-27肽五聚体细胞; B: IFN- γ 分泌; C: HBV特异性CTL频率。

这些患者CD4⁺CD25⁺Treg处于有抑制功能的活化状态。CD103作为一种黏膜整合素 α Eb7, 主要结合肝细胞以及胆管上皮细胞上表达的上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin), 有研究报道CD103可控制Treg在表达E-cadherin局部组织的停滞, 有助于利什曼原虫慢性感染的发生^[13], 目前还发现, 在肝脏局部发现有大量CD103⁺T细胞的浸润^[14], Xu *et al*^[4]报道在CHB患者肝脏中有大量的CD4⁺CD25⁺Treg浸润, 这可能与CHB患者肝脏局部免疫抑制有关。而我们的研究发现在CHB患者循环中与健康人相比其CD4⁺CD25⁺Treg高表达CD103分子, 提示CD103的高表达可能与

CHB患者肝脏局部CD4⁺CD25⁺Treg浸润有关。

上述的研究明确了CHB患者循环中CD4⁺CD25⁺Treg频率的增高且处于抑制功能的活化状态, 最近也有一些研究证据表明CHB患者中CD4⁺CD25⁺Treg的可抑制HBV患者的CD8⁺T细胞对HBV抗原的免疫应答^[4,6], 我们在研究中通过磁珠分离去除CHB患者PBMC的CD4⁺CD25⁺Treg后, 对患者PBMC在体外进行HBV core18-27肽多次负载, 发现CD4⁺CD25⁺Treg的去除可显著增强HBV core18-27肽诱导的HBV特异性的CTL数量的增多和IFN- γ 分泌, 从而有效上调CHB患者体外的抗HBV的免疫应答。

■同行评价

本文层次清楚, 论证有据, 方法先进, 对慢性乙型肝炎患者免疫发病机制的研究有一定的指导意义。

这一点对于进一步研究CD4⁺CD25⁺ Treg在CHB患者免疫发病机制中的作用, 探讨利用去除或干扰CD4⁺CD25⁺ Treg功能作为慢性乙型肝炎免疫治疗策略提供了前期试验证据。

4 参考文献

- 1 Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis. *J Exp Med* 2002; 196: 505-515
- 2 Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, Sano H. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS* 2005; 19: 879-886
- 3 Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78: 2454-2459
- 4 Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- 5 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
- 6 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 7 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67
- 8 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32
- 9 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336
- 10 Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22: 329-341
- 11 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711
- 12 Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1693-1700
- 13 Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol* 2005; 174: 5444-5455
- 14 Shimizu Y, Minemura M, Murata H, Hirano K, Nakayama Y, Higuchi K, Watanabe A, Yasuyama T, Tsukada K. Preferential accumulation of CD103+ T cells in human livers; its association with extrathymic T cells. *J Hepatol* 2003; 39: 918-924

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

应用磁共振氢谱技术评价中药肝脂消胶囊治疗非酒精性脂肪肝的疗效

董慧, 陆付耳, 王南, 饶晶晶, 魏世超, 徐丽君, 邹欣

董慧, 陆付耳, 徐丽君, 邹欣, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
王南, 饶晶晶, 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科 湖北省武汉市 430030
魏世超, 华中科技大学同济医学院附属同济医院药剂科 湖北省武汉市 430030
董慧, 主治医师, 主要从事内分泌代谢性疾病的研究。
湖北省重点攻关项目, No. 2002AA302B13
通讯作者: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663275
收稿日期: 2007-04-11 接受日期: 2007-04-28

Application of proton magnetic resonance spectroscopy for evaluating the therapeutic effects of Ganzhixiao Capsules in treating nonalcoholic fatty liver disease

Hui Dong, Fu-Er Lu, Nan Wang, Jing-Jing Rao,
Shi-Chao Wei, Li-Jun Xu, Xin Zou

Hui Dong, Fu-Er Lu, Li-Jun Xu, Xin Zou, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Nan Wang, Jing-Jing Rao, Department of Radiology, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Shi-Chao Wei, Department of Pharmacy, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: Key Research Projects of Hubei Province, No. 2002AA302B13

Correspondence to: Dr Fu-Er Lu, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-04-11 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To investigate the application of proton magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) for evaluating the therapeutic effects of Ganzhixiao Capsules in treating nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Twenty-two patients were selected according to the Chinese Medical Association's (CMA) criteria for NAFLD and compared with 20 healthy persons (control group). Body mass index (BMI), waist to hip ratio (WHR), and blood pressure (BP) were examined. The serum hepatic enzyme activity (ALT), the concentration of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and uric acid (UA) were tested simultaneously. The severity of hepatosteatosis was evaluated by $^1\text{H-MRS}$ scans of the liver, and the intrahepatic content of lipid (IHCL) was measured. Patients in the NAFLD group were treated with Ganzhixiao Capsules for eight weeks. All the above parameters were retested after treatment.

RESULTS: The BMI, WHR, serum ALT activity, serum concentration of FBG, TG, UA and IHCL were all significantly elevated in the NAFLD group (BMI: 28.4 ± 2.4 , WHR: 0.91 ± 0.04 , DBP: 80 ± 10 mmHg, ALT: 71.5 ± 24.8 U/L, FBG: 5.67 ± 0.61 mmol/L, TG: 2.48 ± 1.46 mmol/L, UA: 420.7 ± 57.5 $\mu\text{mol/L}$, IHCL: $27.49\% \pm 12.27\%$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared with the control group (BMI: 21.7 ± 2.2 , WHR: 0.83 ± 0.04 , DBP: 72 ± 8 mmHg, ALT: 20.4 ± 10.1 U/L, FBG: 4.72 ± 0.43 mmol/L, TG: 1.05 ± 0.40 mmol/L, UA: 372.1 ± 50.6 $\mu\text{mol/L}$, IHCL: $1.34\% \pm 0.79\%$, respectively). However, there was no correlation between clinical features and IHCL. After eight weeks treatment, serum ALT (54.6 ± 19.9 U/L, $P < 0.01$), TG (2.14 ± 1.38 mmol/L, $P < 0.05$) and IHCL ($19.7\% \pm 12.7\%$, $P < 0.01$) decreased significantly.

CONCLUSION: The intrahepatic content of lipid can be precisely measured by $^1\text{H-MRS}$, and NAFLD can be treated effectively by Ganzhixiao Capsules.

Key Words: Proton magnetic resonance spectroscopy; Nonalcoholic fatty liver disease; Ganzhixiao Capsules

Dong H, Lu FE, Wang N, Rao JJ, Wei SC, Xu LJ, Zou X. Application of proton magnetic resonance spectroscopy

■背景资料

本文采用磁共振波谱技术评价中药肝脂消胶囊治疗脂肪肝的疗效, 属于中药药理学研究, 其目的是在目前临床缺乏有效治疗脂肪肝西药的背景下, 研制有开发前景的特色中药。

■ 研发前沿

肝脂消煎剂在前期动物实验中已经证实具有显著的降脂、降酶、护肝作用,本文采用胶囊剂型进行初步的临床试验进一步研究其疗效。

for evaluating the therapeutic effects of Ganzhixiao Capsules in treating nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2231-2235

摘要

目的: 应用磁共振氢谱($^1\text{H-MRS}$)技术定量评价复方中药肝脂消胶囊治疗非酒精性脂肪肝(NAFLD)的疗效。

方法: 依中华医学会NAFLD诊断标准入选NAFLD患者22例,并与20例健康人对照。两组均进行常规体检,包括体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)、血压(BP)、血清谷丙转氨酶(ALT)、空腹血糖(FBG)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、尿酸(UA)和肝脏 $^1\text{H-MRS}$ 扫描,计算肝内脂质含量(IHCL)。NAFLD组患者服用肝脂消胶囊8 wk,检测治疗前后血清生化指标和IHCL的变化。

结果: NAFLD组BMI, WHR, DBP, ALT, FBG, TG, UA, IHCL分别较正常组(BMI: 28.4 ± 2.4 vs 21.7 ± 2.2 , WHR: 0.91 ± 0.04 vs 0.83 ± 0.04 , DBP: 80 ± 10 mmHg vs 72 ± 8 mmHg, ALT: 71.5 ± 24.8 U/L vs 20.4 ± 10.1 U/L, FBG: 5.67 ± 0.61 mmol/L vs 4.72 ± 0.43 mmol/L, TG: 2.48 ± 1.46 mmol/L vs 1.05 ± 0.40 mmol/L, UA: 420.7 ± 57.5 $\mu\text{mol/L}$ vs 372.1 ± 50.6 $\mu\text{mol/L}$, IHCL: $27.49\% \pm 12.27\%$ vs $1.34\% \pm 0.79\%$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)明显升高,但IHCL和上述指标之间没有明显相关性。经治疗后ALT(54.6 ± 19.9 U/L, $P < 0.01$), TG(2.14 ± 1.38 mmol/L, $P < 0.05$), IHCL($19.7\% \pm 12.7\%$, $P < 0.01$)均明显下降。

结论: 肝脏 $^1\text{H-MRS}$ 扫描可对肝脏内脂质含量进行准确定量,肝脂消胶囊可有效治疗NAFLD。

关键词: 磁共振氢谱; 非酒精性脂肪性肝病; 肝脂消胶囊

董慧, 陆付耳, 王南, 饶晶晶, 魏世超, 徐丽君, 邹欣. 应用磁共振氢谱技术评价中药肝脂消胶囊治疗非酒精性脂肪肝的疗效. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2231-2235

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2231.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(NAFLD)的患病率逐年增长,其发生、发展与胰岛素抵抗(IR)之间有着密不可分的联系,临床上已经从改善IR入手治疗NAFLD并取得显著疗效。目前,临床上常用的无

创性检查方法,如B超、CT及MRI的抑脂序列对脂肪肝的定性诊断有一定价值,但均不能对脂肪肝作出定量诊断。人体组织含氢最多的是水和脂肪,活体磁共振($^1\text{H-MRS}$)检测信号最强的是水和脂肪,因此可以作为脂肪肝的一种新的无创性定性和定量诊断方法。我们用中药肝脂消煎剂治疗脂肪肝多年,取得了满意疗效;在防治大鼠酒精性和NAFLD的实验研究中,该复方也显示出显著的护肝、降脂效果。为进一步推广应用,我们拟进行初步的临床试验以判断其疗效和安全性,并且以 $^1\text{H-MRS}$ 计算出的肝内脂质含量(IHCL)做为疗效评定标准。

1 材料和方法

1.1 材料 我院体检中心采用中华医学会肝病学会脂肪肝酒精性肝病学组2006年修定的NAFLD诊断标准,入选NAFLD患者22例,所有病例均来源于我院体检中心,男20例,女2例,年龄 39.4 ± 15.6 岁。以我院健康职工20人为正常对照组,男18例,女2例,年龄 36.2 ± 16.7 岁。两组病例在年龄、性别上无差异,具有可比性。入选患者纳入本研究:年龄18-65岁,性别不限;入选前2 wk未服用过或已停用降糖、减肥、降酶、保肝、降脂药物和具有类似作用的保健品;患者在完全了解本研究的性质、本人疾病的性质、药物的特性、相关的治疗方法和参加本试验可能承担的风险后,能理解并签署了知情同意书。排除2型糖尿病、胰腺疾病者及高血压患者;除外病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性、结缔组织病、甲状腺疾病、抑郁症患者;严重肝、肾功能不全;严重心脏疾病、癌症及其他严重疾病患者;服用影响疗效观察的药物者(包括降糖、减肥、降酶、保肝、降脂药物和具有类似作用的保健品)、孕妇、哺乳期妇女或准备受孕的育龄妇女。

1.2 方法 NAFLD组和正常对照组均进行常规体检和肝脏 $^1\text{H-MRS}$ 波谱检查,NAFLD组患者给予肝脂消胶囊(主要成分为柴胡,茵陈,虎杖,山楂等)治疗,每次3-4粒,每天3次。饭后半小时用温开水送服,8 wk后再次进行常规体检和肝脏 $^1\text{H-MRS}$ 波谱检查,判定疗效。包括血压(收缩压SBP和舒张压DBP),体质量指数(BMI),腰围、臀围,计算腰臀围比值(WHR)等。实验室检查包括血脂全套(TC, TG)、ALT,空腹血糖(FBG)及尿酸(UA)。肝脏 $^1\text{H-MRS}$ 波谱检查,采用GE公司1.5THD磁共振扫描仪。所有检查均由同一放射

表 1 NAFLD患者临床、生化和IHCL(means ± SD)

指标	正常组(<i>n</i> = 20)	NAFLD组(<i>n</i> = 22)	治疗前(<i>n</i> = 19)	治疗后(<i>n</i> = 19)
BMI (kg/m ²)	21.7 ± 2.2	28.4 ± 2.4 ^b	28.2 ± 2.6	28.1 ± 2.6
腰围(cm)	81.4 ± 6.2	94.5 ± 5.8 ^b	94.3 ± 5.9	93.4 ± 6.1 ^c
WHR	0.83 ± 0.04	0.91 ± 0.04 ^b	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.05 ^c
SBP (mmHg)	110 ± 15	118 ± 13	119 ± 12	116 ± 13
DBP (mmHg)	72 ± 8	80 ± 10 ^a	80 ± 10	79 ± 9
ALT (U/L)	20.4 ± 10.1	71.5 ± 24.8 ^b	73.2 ± 25.2	54.6 ± 19.9 ^d
UA (μmol/L)	372.1 ± 50.6	420.7 ± 57.5 ^b	417.2 ± 54.5	398.9 ± 55.3
FBG (mmol/L)	4.72 ± 0.43	5.67 ± 0.61 ^b	5.68 ± 0.66	5.79 ± 0.60
TC (mmol/L)	4.39 ± 0.59	4.85 ± 1.02	4.86 ± 1.09	4.65 ± 0.85
TG (mmol/L)	1.05 ± 0.40	2.48 ± 1.46 ^b	2.44 ± 1.52	2.14 ± 1.38 ^c
IHCL (100%)	1.34 ± 0.79	27.49 ± 12.27 ^b	27.8 ± 13.2	19.7 ± 12.7 ^d

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 正常组; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs 治疗前。

科医生施行。MRS扫描采用心脏线圈, 加呼吸门控, 扫描序列包括: 肝脏MRI的三平面定位扫描序列, 肝脏T2WI序列和肝脏单体素点分辨表面线圈波谱成像(single voxel point resolved surface coil spectroscopy, PRESS)序列。根据T2WI序列图像, 选择波谱扫描的最佳层面, 所有人均选择在肝右后叶, 感兴趣区大小不限, 范围尽量设定得较大, 以不包含较大胆管及血管为原则。感兴趣区周边设定饱和带, 正式扫描前进行预扫描。PRESS序列主要参数如下: TR 1500 ms, TE 35 ms, Echo = 1, NEX = 8, 扫描采用Research模式, 不应用水饱和技术。对所获得的原始波谱图像采用设备自带的SAGE软件进行后处理和计算, 得到¹H-MRS波谱值(包括水峰峰值、水峰下面积、脂峰峰值和脂峰下面积), 以脂峰下面积/(水峰下面积+脂峰下面积) × 100%表示IHCL。于治疗前后分别记录1次。

统计学处理 实验结果以mean ± SD表示, 应用SPSS软件包进行多因素相关性分析、独立样本*t*检验、配对*t*检验。

2 结果

2.1 NAFLD临床资料和IHCL NAFLD患者体质指数(BMI)、腰围、WHR较正常组明显升高(*P* < 0.01), DBP较正常组明显升高(*P* < 0.05), SBP与正常组无显著性差异。NAFLD患者血清ALT, FBG, TG较正常组明显升高(*P* < 0.01), 血清UA较正常组明显升高, 两组之间有显著性差异(*P* < 0.01), 但是两组之间血清TC无显著性差异(*P* > 0.05); NAFLD患者IHCL较正常组明显升高, 两组之间有显著性差异(*P* < 0.01, 表

1)。通过SPSS软件进行多因素相关性分析, 结果显示, IHCL和BMI, 腰围, WHR, SBP, DBP, ALT, UA, TC, TG, FBG等指标之间均没有相关性。

2.2 肝脂消胶囊治疗后的变化 治疗2 mo之后, 有3例患者依从性差没能完成治疗, 成为脱落病例, 予以剔除。余19例患者均完成2 mo的治疗。疗程中部分患者出现不同程度的腹泻症状, 在2 wk后可自行缓解, 余未诉不适。NAFLD患者治疗后BMI, SBP, DBP和血清UA, TC, FBG与治疗前比较没有显著性差异(*P* > 0.05); 治疗后腰围、WHR、血清TG明显下降(*P* < 0.05); 治疗后血清ALT明显下降(*P* < 0.01); IHCL与治疗前比较明显下降(*P* < 0.01, 表1)。正常对照组及所有病例的磁共振氢谱扫描均获得了成功, 得到了左高右低的原始谱线, 随后采用扫描仪自带的SAGE软件对原始谱线进行后处理, 得到了清晰显示水峰和脂峰的波谱曲线。水峰位置在4.7百万分之一附近, 脂峰位置在1.4百万分之一附近; 正常人中有15人仅见水峰, 而没有脂峰, NAFLD患者波谱图中可见到脂峰, 并且随着脂肪肝严重程度的加重, 脂峰逐渐升高(图1A-D)。通过计算得出的IHCL逐渐升高, 两组之间有显著性差异(*P* < 0.01)。治疗后, NAFLD患者磁共振波谱图上脂峰都得到了不同程度的下降(图1E-F)。

3 讨论

NAFLD的患病率逐年增长, 尤其是在经济快速发展的我国, 虽然中国人素有注重饮食、养生的习惯, 但是随着生活的日趋全球化和都市化, 脂肪肝和相关的肥胖、2型糖尿病、动脉粥

■创新盘点

本文采用的磁共振波谱技术是目前唯一的无创性、准确的、可重复的肝脏脂肪含量检测方法, 有助于我们定量评价药物疗效。

■名词解释

磁共振波谱: 是研究人体组织生化和代谢过程的一种无创性检查方法, 正逐步从实验室走向临床。

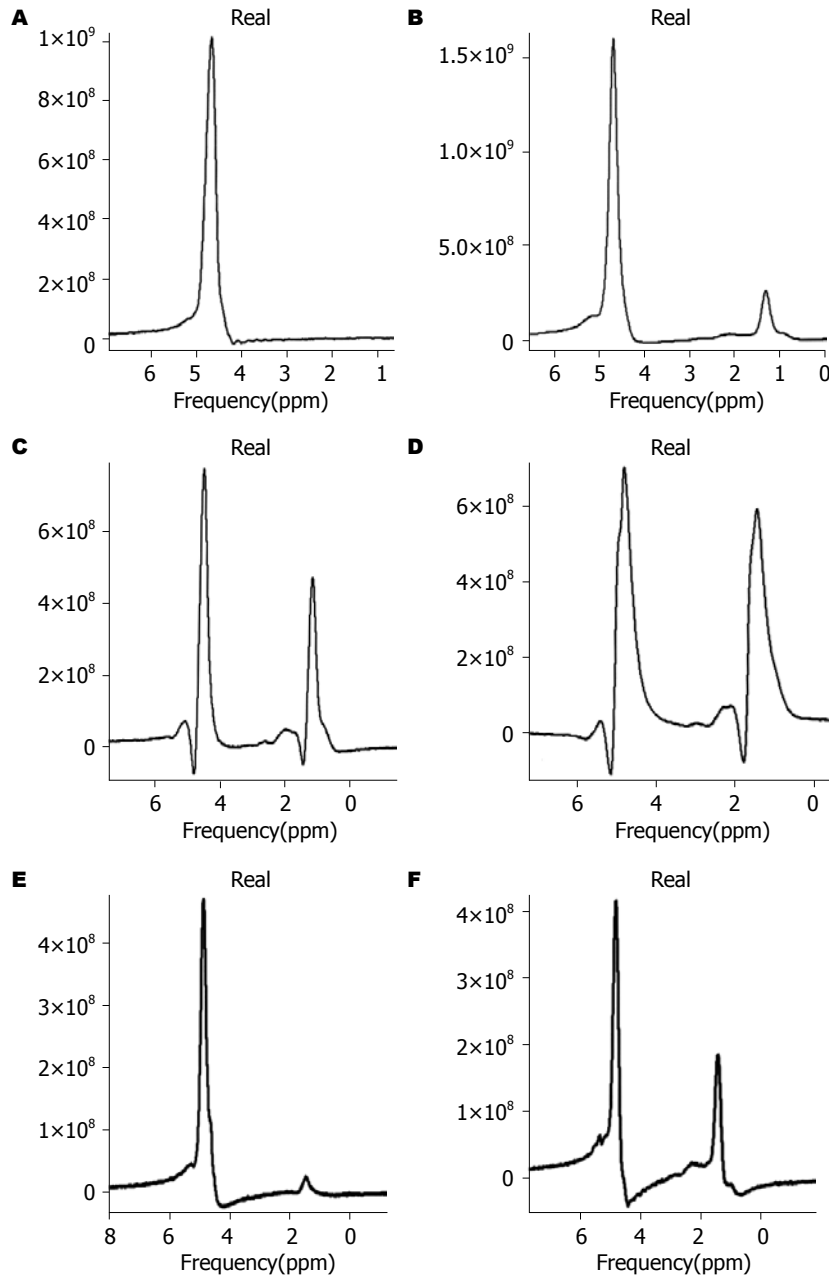


图1 肝脏磁共振氢谱图. A: 正常人(仅见水峰); B: 轻度NAFLD; C: 中度NAFLD; D: 重度NAFLD; E: 轻度NAFLD治疗后; F: 重度NAFLD治疗后。

样硬化等一系列疾病已经对人们的健康造成了严重的威胁. 加强对NAFLD发病机制和防治方法的深入研究已经成为医学领域一个非常迫切的问题. 基于NAFLD的发生、发展与IR之间的关系有着密不可分的联系^[1], 临床上已经从改善IR入手治疗NAFLD并取得显著疗效. 研究表明, 改善IR的药物如二甲双胍^[2]和噻唑烷二酮类^[3]可以有效减轻肝脂肪变性的程度, 这些临床实验的结果进一步提示IR在NASH病理机制中的重要性. 但是如果要将这两类药物作为治疗脂肪肝的药物, 那么他们对肝脏不可忽视的副作用, 使其用于治疗脂肪肝的合理性受到质疑; 此外, 要明确这两类药物治疗脂肪肝这一新的适应症, 仍需要更大规模的多中心临床研究来共同验证.

目前, 临床依然缺乏可用于有效治疗脂肪肝的化学药物.

与此形成鲜明的对照, 某些中药及其提取物对于脂肪肝却显示出独特的令人鼓舞的治疗作用. 中医学认为, 脂肪肝是由于过食肥甘厚味, 伤食碍胃, 或久卧久坐, 体丰痰盛, 或七情内伤致肝疏泄失职, 脾运化无权, 水湿内停, 痰浊内生, 气滞血瘀而形成, 具有“痰、湿、瘀、积”的特性^[4]. 针对此病机, 我们组方肝脂消胶囊(主要成分为柴胡、茵陈、虎杖、山楂等)用于临床治疗脂肪肝, 其水煎剂和有效成分大黄素在前期动物实验中疗效满意^[5-8]; 本结果表明, 肝脂消胶囊能够有效治疗非酒精性脂肪性肝病, 表现在血清ALT, TG的下降. 但是, 经过8 wk的治疗,

患者BMI, WHR等没有明显下降, 可能与疗程短有关, 也说明肝脂消胶囊治疗NAFLD的机制有可能在于调节体内脂肪分布, 减少内脏脂肪堆积, 并不是单纯的减轻体质量。

脂肪肝的传统影像诊断方式有B超和CT两种, 但是二者均不能对脂肪肝做出量化的诊断。此外, 诊断的金标准还有肝脏活检, 但是由于有创伤性而不易被患者接受^[9], 因此, 我们应用了一种新的影像学方法——磁共振氢谱无创性地、实时地、在体地、准确地对肝脏内脂肪含量进行定量, 并且以此来评价药物疗效^[10-11]。结果显示, 正常对照组与脂肪肝组谱线图上均出现水峰, 脂肪肝组除水峰外, 还出现高低不等的脂峰, 我们以脂峰下面积/(水峰下面积+脂峰下面积)×100%表示IHCL。结果显示, 随着脂肪肝严重程度的加重, 波谱图像中的脂肪峰不断升高, 计算出的IHCL也不断增加, 而正常人波谱图像中脂肪峰几乎为0。有研究发现此种计算方法得出的IHCL与病理学检测结果密切相关, IHCL>5.5%即可以诊断脂肪肝。而如果仅仅比较脂峰下面积与水峰下面积比值, 当脂峰下面积与水峰下面积比值大于20%时, 即可诊断为脂肪肝^[12-13]。还有的研究人员设定了感兴趣区的大小, 每个病例保持一致, 比较软件分析得出的水峰和脂峰的峰值和峰下面积的具体数值, 发现正常人和脂肪肝患者水峰和水峰下面积没有显著性差异, 而脂肪肝患者的脂峰和脂峰下面积明显增加。我们认为, 不设定感兴趣区大小比较符合实际情况, 以脂峰下面积/(水峰下面积+脂峰下面积)×100%表示IHCL能够较好的反映肝内脂肪堆积的程度。本研究表明, 肝脂消胶囊治疗2 mo之后, 肝脏磁共振氢谱图中脂峰和脂峰下面积均下降, 通过计算得出的IHCL也出现不同程度的下降。

MRS作为一种无创检查手段, 可以对脂肪肝进行量化分级, 区别轻、中、重度脂肪肝。磁共振波谱技术作为一种无创性测量人体内化学

成分的检查工具目前正在逐渐广泛地应用于基础医学及临床研究, 其对人体的安全性及可进行重复性检查的特点受到临床的青睐。但是由于MRS检查及后处理过程复杂, 时间较长, 在临床上尚没有推广应用。

4 参考文献

- 1 高志强, 陆付耳. 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1043-1045
- 2 Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 23-28
- 3 Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38: 1008-1017
- 4 王江河, 洪慧闻. 脂肪肝的中医辨证分析. 中国中西医结合杂志 1999; 19: 248
- 5 陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣. 中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1596-1599
- 6 高志强, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富, 邹欣. 肝脂复煎剂对实验性脂肪肝的治疗效应. 中国中西医结合消化杂志 2004; 12: 263-266
- 7 Dong H, Lu FE, Gao ZQ. Experimental study on effects of emodin on nonalcoholic fatty liver induced by high fat diet in rats. *Zhongguo Zhong Yi Yi Jie He Za Zhi* 2006; 26 Suppl: 64-67
- 8 Dong H, Lu FE, Gao ZQ, Xu LJ, Wang KF, Zou X. Effects of emodin on treating murine nonalcoholic fatty liver induced by high caloric laboratory chaw. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1339-1344
- 9 范建高. 肝活检在脂肪肝诊断中的作用. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 116-117
- 10 杜湘珂, 冯义廉. 医学磁共振波谱是人体功能代谢病生理检查的一种方法. 中华放射学杂志 2000; 34: 725-726
- 11 白亮彩, 郭顺林, 周怀琪, 雷军强, 窦郁, 张毅. 1H MRS在定量分析脂肪肝中的初步研究. 中国医学影像技术 2006; 22: 529-531
- 12 Ricci PE, Pitt A, Keller PJ, Coons SW, Heiserman JE. Effect of voxel position on single-voxel MR spectroscopy findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 367-374
- 13 Lee JK, Dixon WT, Ling D, Levitt RG, Murphy WA Jr. Fatty infiltration of the liver: demonstration by proton spectroscopic imaging. Preliminary observations. *Radiology* 1984; 153: 195-201

■同行评价

本文应用磁共振氢谱技术评价肝脂消胶囊治疗NAFLD的疗效, 所采用的技术先进, 可以对肝脏内脂肪含量进行定量分析, 具有潜在的应用价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏

新疆哈萨克族食管鳞癌与TNF- α 基因多态性的相关性

张海洋, 张会敏, 陈玲, 杨兰, 李洪安, 蒋金芳, 秦江梅, 杨磊, 张国昌, 李锋

■背景资料

食管癌是一种常见的上消化道恶性肿瘤, 往往一经发现便为中晚期, 他的5 a生存率不足20%。我国是世界上食管癌发病率最高的国家, 在我国恶性肿瘤死亡率中居于第四位。新疆哈萨克族是我国少数民族中食管癌发病率和死亡率均最高的民族。

张海洋, 张会敏, 陈玲, 杨兰, 李洪安, 蒋金芳, 秦江梅, 杨磊, 张国昌, 李锋, 新疆地方与民族高发省部共建教育部重点实验室, 新疆石河子大学医学院病理教研室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

张海洋, 在读硕士生, 新疆石河子大学医学院病理教研室, 研究方向肿瘤分子病理。

国家自然科学基金资助项目, No. 30660161

科技部973重大基础研究前期专项, No. 2005CCA03700

教育部高校创新工程重大项目培育资金项目, No. 206167

通讯作者: 李锋, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市石河子大学医学院病理教研室/新疆地方与民族高发省部共建教育部重点实验室。lifeng7855@yahoo.com.cn

电话: 0993-2057125 传真: 0993-2057136

收稿日期: 2007-03-28 接受日期: 2007-05-11

Relationship between polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and Kazakh esophageal squamous cell cancer in Xinjiang

Hai-Yang Zhang, Hui-Min Zhang, Ling Chen, Lan Yang, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Jiang-Mei Qin, Lei Yang, Guo-Chang Zhang, Feng Li

Hai-Yang Zhang, Hui-Min Zhang, Ling Chen, Lan Yang, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Jiang-Mei Qin, Lei Yang, Guo-Chang Zhang, Feng Li, Xinjiang Local and National High Diseases Incidence of Provincial Key Laboratory of the Ministry of Education Building, Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660161; the Special Foundation of Prophase Item for 973 Major Basic Research Program of Ministry of Science and Technology, No. 2005CCA03700; the University Important Innovation Project Foundation from the Ministry of Education, No. 206167

Correspondence to: Dr. Feng Li, Department of Pathology in Shihezi Medical University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lifeng7855@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-28 Accepted: 2007-05-11

Abstract

AIM: To investigate the polymorphisms of tumor necrosis factor- α -308G/A (TNF- α -308G/A) and its association with susceptibility to Kazakh esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in Xinjiang.

METHODS: TNF- α -308G/A genotypes were analyzed by polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 212 paraffin-embedded tissues from Kazakh patients with ESCC and 200 blood samples from a population of cancer-free controls resident in the same area. The concordance of TNF- α -308G/A genotypes with Hardy-Weinberg equilibrium was checked.

RESULTS: The genotypes of TNF- α -308G/A were G/G, A/G and A/A. The frequencies of these TNF- α -308G/A genotypes were 70.8, 26.9 and 2.4%, respectively, in Kazakh ESCC and 70, 29 and 1%, respectively in controls. There were no significant differences among them ($\chi^2 = 1.228$, $P > 0.05$). The frequencies of G/G, A/G and A/A were 43.3, 24.5 and 0% in well-differentiated esophageal carcinoma (EC), 46.3, 60.4 and 60.0% in moderately differentiated EC, and 10.4, 15.1 and 40.0% in poorly differentiated EC, respectively. The genotype distribution of TNF- α -308G/A was significantly different between the different ESCC pathological grading ($\chi^2 = 10.630$, $P = 0.019$). The frequencies of G/G, A/G and A/A were 35.3, 50.9 and 80.0%, respectively, in Kazakh ESCC with metastatic lymphadenopathy, and 64.7, 49.1 and 20.0%, respectively, in those with no metastatic lymphadenopathy. Statistically significant differences were also revealed between the TNF- α -308G/A genotype and ESCC metastatic lymphadenopathy ($\chi^2 = 7.203$, $P = 0.025$). G/A and A/A genotype ESCC tended to be moderately and poorly differentiated and have metastatic lymphadenopathy, in contrast with the G/G genotype ($OR = 2.642$; $OR = 2.083$).

CONCLUSION: The TNF- α -308G/A polymorphism might not be correlated with susceptibility to Kazakh ESCC in Xinjiang, but may be associated with a different ESCC pathology grading and lymph node metastasis.

Key Words: Tumor necrosis factor; Gene polymorphism; Esophageal cancer; Kazakh; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

Zhang HY, Zhang HM, Chen L, Yang L, Li HA, Jiang JF, Qin JM, Yang L, Zhang GC, Li F. Relationship between polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and

Kazakh esophageal squamous cell cancer in Xinjiang. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2236-2241

摘要

目的: 探讨新疆哈萨克族人群TNF- α -308G/A基因多态性的分布与食管鳞状细胞癌(ESCC)的相关性。

方法: 应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性PCR-RFLP方法检测212例ESCC石蜡包埋组织及200名正常对照血样标本的TNF- α -308G/A多态性分布情况, 并检验基因型的分布。

结果: TNF- α -308G/A 3种基因型为: G/G, A/G, A/A。在新疆哈萨克族ESCC组所占比例分别为70.8%, 26.9%, 2.4%, 对照组分别为70.0%, 29.0%, 1.0%, 两组中3种基因型总构成比差异无统计学意义($\chi^2 = 1.228, P > 0.05$); TNF- α -308G/A 3种基因型在食管癌不同病理分级中所占的比例分别为: 高分化43.3%, 24.5%, 0%; 中分化46.3%, 60.4%, 60.0%; 低分化10.4%, 15.1%, 40.0%; 在无淋巴结转移分布分别为64.7%, 49.1%, 20.0%; 有转移为35.3%, 50.9%, 80.0%; 3种基因型在食管癌不同病理分级中的分布和淋巴结转移中差异均有统计学意义($\chi^2 = 10.630, P = 0.019$; $\chi^2 = 7.203, P = 0.025$)。G/A型和A/A型的食管癌患者分别较G/G基因型癌趋于中低分化、易转移($OR = 2.642$; $OR = 2.083$)。

结论: TNF- α -308G/A基因多态性与新疆哈萨克族ESCC的发生无关, 与其病理组织分级和淋巴结转移相关。

关键词: 肿瘤坏死因子; 基因多态性; 食管癌; 哈萨克族; 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性

张海洋, 张会敏, 陈玲, 杨兰, 李洪安, 蒋金芳, 秦江梅, 杨磊, 张国昌, 李峰. 新疆哈萨克族食管鳞癌与TNF- α 基因多态性的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2236-2241
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2236.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子是体内一种促炎细胞因子, 具有广泛的生物学活性。人TNF基因位于第6号染色体短臂MHC III类基因区一段长7 kb的DNA序列内, 由TNFA和TNFB组成, 分别编码TNF- α 和TNF- β , 各自都含4个外显子和3个内含子。有研究证实, TNF- α 基因启动子区域-308位点(转录起始位点上游第308 bp)存在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs), 这种

基因多态性的存在可能影响TNF基因转录和表达, 进而影响TNF的生物学功能^[1]。我国人口众多, 民族各异, TNF- α 基因的分布肯定有不同, 新疆北部哈萨克族聚集区是我国食管癌高发区之一^[2], 食管癌的死亡率居哈萨克族恶性肿瘤死亡的首位^[3]。TNF- α -308基因的多态性与妇女宫颈癌有关^[4], 鉴于宫颈癌与食管癌组织学的相似性, 我们对412例新疆哈萨克族TNF- α -308G/A基因的多态性进行了检测如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1980/2005年病理诊断为食管癌的哈萨克族活检石蜡包埋组织212例, 所有标本用40 g/L甲醛固定、石蜡包埋后保存。男115例, 女97例, 同时在当地收集相同年龄组无肿瘤史的一般人群血样200例作为对照, 男109例, 女91例, 对照组人群抽集静脉血、肝素钠抗凝、液氮保存。采用上海生工的小剂量DNA抽提试剂盒提取基因组DNA。

1.2 方法 石蜡包埋组织5 μ m厚蜡片10张, 放入2.0 mL消毒的EP管中, 经脱蜡水化后, 加细胞裂解液(0.02 mmol/L Tris HCl, 0.02 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS), 蛋白酶K(终浓度为0.3 g/L)55 $^{\circ}$ C水浴振荡过夜。待组织完全裂解后依次加入等体积的Tris饱和酚(pH8.0), 酚/氯仿为1:1, 氯仿/异戊醇为24:1, 各抽提1次, 无水乙醇沉淀DNA, 干燥, 加入TE(pH8.0)50-80 μ L溶解DNA沉淀12-24 h, 测定所提取DNA的 A_{260} 、 A_{280} 的值, 并计算 A_{260}/A_{280} 以确定DNA的质量和纯度, 提取的DNA置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。特异扩增基因TNF- α 多态性引物参照文献^[4], 上游: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', 下游: 5'-TCCTCCCTGCTCTGATTCCG-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。扩增的目的片段长度为107 bp。限制性核酸内切酶Nco I购自上海生工生物工程有限公司。限制性核酸内切酶Nco I特异识别CCATGG酶切位点, 对于TNF- α -308G/A单核苷酸多态性, G/G纯合基因型存在Nco I的酶切位点产生87 bp和20 bp 2条DNA片段, A/A纯合基因型由于缺乏Nco I的酶切位点从而表现为原始PCR后的107 bp DNA片段, G/A杂合型则表现为107 bp、87 bp和20 bp 3条片段。采用PCR-RFLP方法检测TNF- α -308G/A基因型。PCR反应体系为25 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 20 pmol/L 上、下游引物各 0.6 μ L, 5 \times 10³ kU/mL

■ 研发前沿

近年来, TNF- α 与肿瘤的关系逐渐成为研究热点, TNF- α 的具体作用机制仍是亟待解决的问题。

■ 相关报道

Peter Szlosarek *et al*认为TNF- α 有促进肿瘤的发生、生长和转移的作用。其可能机制是,在肿瘤细胞的微环境中,TNF- α 起着传递肿瘤细胞和炎症细胞的信息作用。

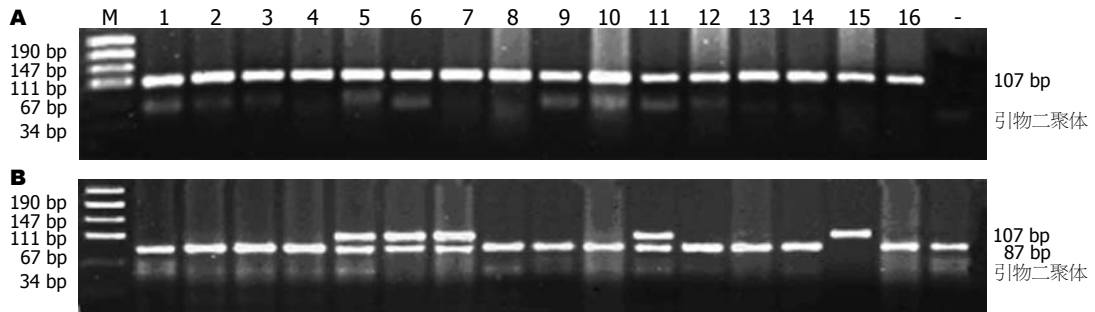


图1 TNF- α -308多态位点的PCR及酶切的电泳图。A: PCR结果, B: 酶切结果。M: DNA分子质量标准; 1, 3, 5: 阳性对照; 2, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16: G/G型; 6, 7, 11: G/A型; 15: A/A型; -: 空白对照。

Taq DNA聚合酶0.3 μ L, 模板DNA 2.0 μ L(约20 ng DNA)及17.0 μ L高压双蒸水。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min, 然后进行35个循环(每个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。选用PCR扩增产物测序确定是TNF- α 基因的食管癌标本作为阳性对照, 以高压双蒸水代替DNA模板作为空白对照。取PCR产物10 μ L, 酶切Bufer 2.5 μ L, 限制性内切酶Nco I 5 U, 补高压双蒸水至20 μ L, 置于37 $^{\circ}$ C水浴8 h酶切消化, 取酶切产物5 μ L, 30 g/L琼脂糖凝胶电泳、Bio-Rad凝胶成像图像分析仪观察结果。PCR产物由上海基康生物技术公司纯化并测序。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件对相关数据行 χ^2 检验。

2 结果

食管癌中TNF- α -308G/A基因型扩增后酶切, 产生107 bp, 87 bp和20 bp 3条片段的是G/A杂合型; 产生87 bp和20 bp 2条带的是G/G纯合型; 只产生107 bp 1条片段的是A/A纯合型(图1)。根据PCR扩增产物测序图上多态位点上的峰来判断基因型, 单峰为纯合基因型, 双峰为杂合基因型(图2)。在哈萨克族食管癌组TNF- α -308G/A基因型G/G, A/G, A/A所占比例分别为70.8%, 26.9%, 2.4%, 对照组分别是70.0%, 29.0%, 1.0%, 比较两组中3种基因型总构成比, 差异无统计意义($\chi^2 = 1.228, P = 0.581$, 表1, 表3)。但在比较食管癌不同病理分级和淋巴结转移情况与TNF- α -308G/A基因型的分布时, 差异有统计学意义($\chi^2 = 10.630, \chi^2 = 7.203, P < 0.05$, 表2), G/A和A/A基因型食管癌较之G/G基因型癌趋向于中低分化并易发生癌淋巴转移($OR = 2.642, 95\% CI = 1.305-5.349; OR = 2.083, 95\% CI = 1.142-3.798$, 表2)。随机挑选TNF- α -308G/A不同基因型的PCR产物测序, 测序结果, 与GenBank中公布的人类TNF基因

表1 TNF- α -308G/A基因型在哈萨克族病例组与对照组中的分布n(%)

分组	n	基因型		
		G/G	G/A	A/A
病例组	212	150(70.8)	57(26.9)	5(2.4)
对照组	200	140(70.0)	58(29.0)	2(1.0)

(序列号: AB210166)同源性高达100%(图2)。对照组及ESCC患者的基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来, 肿瘤坏死因子的抗肿瘤作用备受人们的关注。他是一类具有多种生物学活性的非种属特异性的细胞因子, 在体内具有抗肿瘤、抗病毒和增强免疫的作用。与肿瘤相关的一些基因可通过天然的遗传变异, 调节转录和翻译, 从而影响个体对肿瘤的易感性。TNF基因的功能性单核苷酸多态性与某些肿瘤的易感性有关。有研究显示, TNF- α -308A等位基因可影响转录抑制因子(activator protein 2, AP-2)的结合而导致TNF- α 表达增高^[5-6]。携带TNF- α -308A等位基因的个体有增加宫颈癌^[4]、乳腺癌^[7]和胃癌^[8]的患病风险, 但是在对口腔鳞癌^[9]、膀胱癌^[10]和多发性骨髓瘤^[11]的研究中却得出了不同甚至相反的结论。且同样是研究宫颈癌的南非学者Govan *et al*^[12]认为TNF- α -308G/A基因型与宫颈癌的发病无关。造成研究结论不一致的原因可能是: (1)肿瘤的发生是多种细胞因子及其他多种因素共同作用的结果, TNF- α 只是其中的一种细胞因子。(2)TNF- α 的表达不仅受TNF- α -308位点基因多态性的影响, 除此之外其他位点同样会影响TNF- α 的产量。(3)不同的肿瘤类型有不同的发病机制, TNF- α 在其病理过程中可能作用不同。

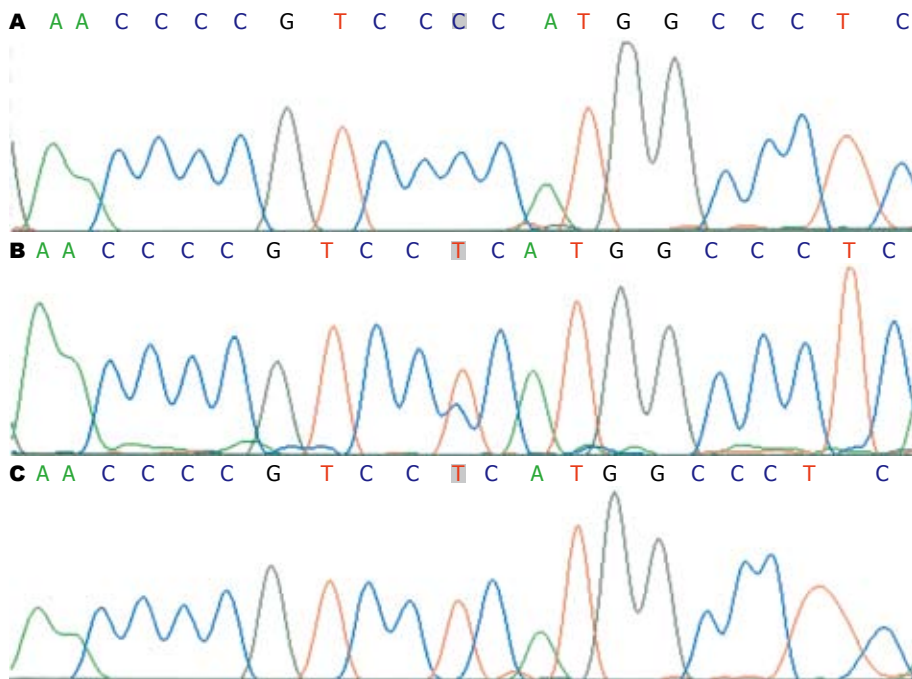


图 2 TNF- α -308 测序. A: G/G型; B: G/A型; C: A/A型.

创新盘点
首次检测了TNF- α -308G/A基因多态性在新疆哈萨克族中的分布, 并分析了其与食管癌的关系. 首次提出了TNF- α -308G/A基因多态性与食管癌恶性程度和转移相关, G/A型和A/A型的食管癌患者, 癌趋于低分化、易转移.

表 2 TNF- α -308G/A基因多态性与食管癌病理分级和淋巴结转移的关系 n (%)

基因型	<i>n</i>	病理分级			淋巴结转移情况		
		高分化	中分化	低分化	<i>n</i>	无转移	有转移
G/G	134	58(43.3)	62(46.3)	14(10.4)	150	97(64.7)	53(35.3)
G/A	53	13(24.5)	32(60.4)	8(15.1)	57	28(49.1)	29(50.9)
A/A	5	0(0)	3(60.0)	2(40.0)	5	1(20.0)	4(80.0)
G/G	134	58(43.3)	76(56.7)		150	97(64.7)	53(35.3)
G/A+A/A	58	13(22.4)	45(77.6)		62	29(46.8)	33(53.2)
合计	192	71	97	24	212	126	86

另外, 也可能与此类研究多是回顾性研究, 且研究人群存在地区、人种和样本量的差异有关. 所以有待于在不同肿瘤中扩大样本量, 并在同种族、同地域人群中进行长期随访研究, 进一步观察TNF- α 多态性与环境因素及其他遗传因素的相互作用, 这样对揭示TNF- α 多态性与肿瘤的确切关系才更有意义.

在食管癌患者血浆中发现TNF- α 表达增多^[13-14]. Zhou *et al*^[15]许多中国学者, 在对比食管癌患者放疗前后及健康人血清TNF- α 水平时发现, 食管癌患者放疗前血清TNF- α 水平显著高于放疗后, 而且均明显高于对照组. 他们还提出, TNF- α 的检测对食管癌的诊断、治疗及预后具有重要的临床意义. TNF水平变化与不同病理学类型、病理分级、有无锁骨上淋巴结转移无关, 和病程长短及近期疗效有关. 因此, TNF- α 作为一种肿瘤标志物, 可能对食管癌的诊断及预后具有指导意义. Guo *et al*^[16]利用PCR-RFLP技术

表 3 新疆哈萨克族和河北汉族食管癌TNF- α -308基因型分布 n (%)

基因型	新疆哈萨克族		河北汉族	
	食管癌	对照	食管癌	对照
G/G	150(70.8)	140(70.0)	266(91.4)	391(89.5)
G/A	57(26.9)	58(29.0)	21(7.2)	40(9.1)
A/A	5(2.4)	2(1.0)	4(1.4)	6(1.4)

对TNF- α -308G/A和TNF- β +252G/A的多态性的研究发现, 在食管鳞癌、胃癌以及健康对照人群中TNF- α 等位基因的分布没有显著性差异. 综合考虑TNF- α -308G/A和TNF- β +252G/A后, 基因型为TNF- β GA和TNF- α GA或AA型个体与TNF- β AA和TNF- α GG型相比较, 癌发生率的风险明显降低. 在调节免疫监督、抑制肿瘤发生的过程中TNF- α 和TNF- β 可能存在交互作用.

我们用PCR-RFLP的方法, 对新疆北部哈萨

应用要点
TNF- α -308G/A基因多态性可能不影响新疆哈萨克族食管癌的发生, 但检测TNF- α -308G/A基因型可能对癌的发展和预后起到评估作用.

■名词解释

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是体内一种促炎细胞因子,在体内具有广泛的生物学活性。人们一般只了解他对肿瘤组织的出血坏死作用,其实,他还有促进肿瘤发生、生长和转移的作用。具体何时主要表现什么作用,这跟TNF在体内的水平高低和作用时间长短有关。

克族食管癌及正常人群的TNF- α -308G/A多态性进行了检测,结果发现TNF- α -308G/A 3种基因型G/G、A/G、A/A食管癌组中所占比例分别为70.8%、26.9%、2.4%,对照组中分别为70.0%、29.0%、1.0%,比较两组中3种基因型总构成比,无差异($\chi^2 = 1.228, P > 0.05$)。说明TNF- α -308G/A基因多态性可能与新疆哈萨克族食管癌的发病无关,这与河北学者的研究结果一致。我们将新疆哈萨克族TNF- α -308G/A基因型分布与河北汉族进行比较发现,无论是食管癌组还是对照组,新疆哈萨克族TNF- α G/A基因型都高于河北汉族的(表3),提示TNF- α -308G/A基因多态性的分布可能与民族不同相关。我们的结果还显示G/G、A/G、A/A 3种基因型在有转移的食管癌中所占比例分别为61.6%、3.7%、4.7%,在没有发生转移的食管癌中分别为77.0%、22.2%、0.8%。经统计分析发现, TNF- α -308G/A基因多态性可能与新疆哈萨克族ESCC的发展和转移相关,携带有G/A或A/A基因型的患者可能增加食管癌生长和转移的风险。有学者^[17]认为, TNF- α -308位点携带有A等位基因型的患者能促进恶性肿瘤的生长。还有学者^[18-19]研究认为,高水平的TNF- α 可能诱导机体产生血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),生成的血管内皮生长因子则可促进肿瘤的生长和转移。不过,也有学者^[20]认为TNF- α 促进肿瘤生长作用,可能与肿瘤细胞表面缺乏和TNF- α 相结合的溶细胞活性的受体(TNFR)有关。还有学者^[21-22]认为,也可能是TNF- α 通过诱导其他细胞因子,如IL-1、前列腺素E₂(PGE₂)等的释放干扰或抑制细胞免疫功能,促进肿瘤的生长或转移。临床资料也显示,癌前病变或恶性肿瘤患者的血浆中TNF- α 表达明显高于正常人,慢性长期的低水平TNF- α 能够促进肿瘤的发生、发展及转移。Szlosarek *et al*^[23]认为,其可能的机制是TNF- α 传递了肿瘤细胞和炎症细胞的信息。

近年来, TNF- α 基因多态性与食管癌的关系研究较少,但均得出了TNF- α 基因多态性与食管癌的发生无关。这除了跟地区和民族的差异有关外,有学者^[24]还认为很难抛开人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)去单独研究TNF- α 在体内的作用,因为他们之间存在着一种连锁不平衡,其作用是相互影响的。而且食管癌的发生除了跟遗传易感性有关外,还跟生活习惯和生活环境有很大关系,单方面去研究某一种因素与食管癌的关系都有一定的片面性和局

限性。在考虑某个或某些特定基因多态的风险时,还必须强调特定的环境暴露,因为不同的人群所暴露的环境因素可能不同。所以下一步,要从TNF在体内的作用机制出发,研究各相关基因的相互作用,及这种作用在不同的生活习惯和生活环境中,对食管癌的发生发展有何不同。

总之,我们认为TNF- α -308G/A基因多态性与新疆哈萨克族ESCC的发生无关,但与其恶性程度和转移相关, G/A型和A/A型的食管癌患者,癌趋于低分化、易转移。

4 参考文献

- 1 Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998; 91: 3574-3581
- 2 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 939-943
- 3 阿依恒·曲库尔汉, 夏依木拉提·夏依马尔旦. 新疆哈萨克族904例恶性肿瘤流行病学分析. *肿瘤* 2003; 23: 11-13
- 4 Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, Medeiros R. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 588-592
- 5 Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-3199
- 6 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399
- 7 Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 672-678
- 8 Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364-371
- 9 Liu CJ, Wong YK, Chang KW, Chang HC, Liu HF, Lee YJ. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 608-612
- 10 Tsai FJ, Lu HF, Yeh LS, Hsu CD, Chen WC. Lack of evidence for the association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism with calcium oxalate stone and bladder cancer patients. *Urol Res* 2001; 29: 412-416
- 11 Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S, Sundblad

- A, Osterborg A, Bjorkholm M, Holm G, Yi Q. Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2000; 109: 39-45
- 12 Govan VA, Constant D, Hoffman M, Williamson AL. The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer* 2006; 6: 24
- 13 吕俊杰, 戴天阳, 詹福生, 江绪明, 祝淮阳, 王宗林. 食管癌患者血清CEA和TNF- α 的水平及意义. *放射免疫学杂志* 2004; 17: 350-351
- 14 陈颖, 杨积慧, 印淦华. 食管癌患者放疗前后血清肿瘤坏死因子测定及其临床意义. *河南肿瘤学杂志* 2003; 16: 382
- 15 Zhou JH, Jiang YG. Pre- and postoperative NK cell number and plasma levels of TNF and PGE2 in patients with esophageal carcinoma and their clinical significance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1994; 16: 132-136
- 16 Guo W, Wang N, Li Y, Zhang JH. Polymorphisms in tumor necrosis factor genes and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma in a population of high incidence region of North China. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 1870-1878
- 17 Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 1997; 80: 1489-1496
- 18 Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987; 329: 630-632
- 19 Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 2002; 87: 1057-1065
- 20 Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer* 1990; 61: 354-361
- 21 Warren RS, Starnes HF Jr, Alcock N, Calvano S, Brennan MF. Hormonal and metabolic response to recombinant human tumor necrosis factor in rat: in vitro and in vivo. *Am J Physiol* 1988; 255: E206-E212
- 22 Nara K, Odagiri H, Fujii M, Yamanaka Y, Yokoyama M, Morita T, Sasaki M, Kon M, Abo T. Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2 by monocytes in cancer patients and its unique modulation by their plasma. *Cancer Immunol Immunother* 1987; 25: 126-132
- 23 Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006; 42: 745-750
- 24 Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 2005; 191: 969-976

■同行评价

本文探讨了新疆哈萨克族食管癌与TNF- α 基因多态性的相关性, 方法成熟, 数据可信, 对食管鳞癌的基础和临床研究都有一定的参考价值。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

HBx致肝细胞癌分子机制的研究进展

程斌, 林松挺, 杨玉珍

■背景资料

流行病学调查及一些体内外研究均为HBx致肝细胞肝癌(HCC)的发生提供了充分的证据,但其确切机制仍未完全阐明,因而成为目前该领域的研究热点.研究发现HBx具有间接调节转录、影响细胞生长周期、信号传导、DNA修复及介导细胞凋亡等多种功能,可能与HCC发生有关.近来还发现HBx可通过影响抑癌基因,如p53的新成员p73以及p16、p21等而参与肝细胞恶性转化与癌变,但其关系错综复杂.

程斌, 林松挺, 杨玉珍, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30570821

通讯作者: 杨玉珍, 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消化内科.

zyyang@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663612 传真: 027-83646605

收稿日期: 2007-03-22 接受日期: 2007-04-28

Advancement on molecular mechanism of hepatitis B virus X induced hepatocellular carcinoma

Bin Cheng, Song-Ting Lin, Yu-Zhen Yang

Bin Cheng, Song-Ting Lin, Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, 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. 30570821

Correspondence to: Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, No. 1095 Jiefang Street, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zyyang@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-03-22 Accepted: 2007-04-28

Abstract

Chronic infection of Hepatitis B Virus (HBV) is one of the major causes of hepatocellular carcinoma (HCC) in our country. Some studies *in vivo* and *in vitro* found that hepatitis B virus X (HBx) can induce hepatocellular malignant transformation; also it has become the hot point in the research concerning the mechanism of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma at present. Recently, some research on the interaction between HBx and tumor suppressor gene p73 which was a new member of p53 family, p16 and p21, etc. and the influence of HBx on malignant transformation of hepatocellular has achieved preliminary results, but their relations are complicated. This ever in-depth study will help to reveal the molecular mechanism of HBx induced hepatocellular carcinoma, and it has great significance to explore the prevention and cure strategy of hepatitis B-related liver cancer.

Key Words: Hepatitis B virus; Hepatitis B virus X; Apoptosis; Cell proliferation; Hepatocellular carcinoma

Cheng B, Lin ST, Yang YZ. Advancement on molecular mechanism of hepatitis B virus X induced hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2242-2248

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是我国肝细胞肝癌(HCC)发生的主要原因之一.一些体内外研究发现,乙型肝炎病毒x(HBx)可诱导肝细胞的恶性转化及癌变,成为目前研究乙肝相关性肝细胞癌发生机制的热点.近来在HBx与抑癌基因,如p53的新成员p73以及p16、p21等之间的相互作用及其对肝细胞恶性转化与癌变的影响等方面的研究也取得初步成果,但其关系错综复杂,这方面不断的深入研究将有助于进一步揭示HBx致肝细胞癌发生的分子机制,对探寻乙肝相关性肝癌新的防治策略具有重要意义.

关键词: 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒x; 凋亡; 细胞增殖; 肝细胞肝癌

程斌, 林松挺, 杨玉珍. HBx致肝细胞癌分子机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2242-2248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2242.asp>

0 引言

在我国,乙型肝炎病毒(HBV)感染被认为是肝细胞癌(HCC)发生最主要的原因,流行病学调查为此提供了充分的依据.进一步研究发现,HBV DNA整合入宿主细胞基因组多发生在乙型肝炎病毒x(HBx)基因区,因此,HBx基因及其产物在乙肝相关性肝癌的发生、发展中作用的研究吸引了众多感兴趣的学者.一些HBx转基因细胞与转基因动物研究均为HBx基因在HCC发生中作用的研究提供了直接的证据,但其确切机制仍未完全阐明.近年来研究发现,HBx具有间接调节转录、影响细胞生长周期、信号传导、DNA

修复及介导细胞凋亡等多种功能, 可能与HCC发生有关. 本文对HBx致肝细胞癌发生机制研究的最新进展进行综述.

1 HBx的结构与生物学效应

HBV全基因组大约32 kb, 具有4个开放读码框(ORF), HBx基因是HBV基因组中最小的开放读码框, 其编码基因位于第1374-1838位核苷酸之间, 所编码的HBx蛋白(含3种功能蛋白)由154个氨基酸组成, 分子量约为17 kDa, 具有多种转录调控活性. Ritter *et al*采用缺失突变方法分析不同HBxAg片段的活性, 发现C-端第149-154或N-端的第2-30氨基酸缺失不影响HBxAg的活性; 但当C-端第106-254或N-端1-9氨基酸缺失后HBxAg的活性完全丧失; N-端32-65氨基酸缺失, HBxAg的活性急剧下降, 说明32-65和106-148位氨基酸为HBx蛋白的功能区. 氨基酸突变分析表明, HBx蛋白分子上有3个活性区, 第46-52位, 特别是Pro-46, His-49和His-52; 第61-69位, 特别是Cys-61, Gly-67, Pro-68和Cys-69; 第132-139位, 特别是Phe-132, Cys-137和His-139都是功能所必需的. 大量研究发现, HBx蛋白具有广泛的生物学功能: (1)细胞转化功能^[1]; (2)抑制受损细胞DNA的剪切修复功能^[2]; (3)反式激活功能^[3]; (4)抑制细胞凋亡功能^[4]. 现已证实, HBx是一种多功能的病毒调节因子, 其影响HBV的复制和增殖是通过多种途径, 多方面因素的作用和相互影响而实现的. HBx可通过Ras-Raf-MAPK转导途径、DAG-PKC转导途径、JAK-STAT转导途径等, 分别激活AP-1, AP-2, NF- κ B等, 进而激活胰岛素样生长因子(IGF- I, II)及其受体IGF-IR基因启动子, 促进其转录, 进而调节细胞的生长分化. HBx的表达受增强子I(Enh I)调控, 又可通过与Enh I核心序列AP-J、C末端元件结合反式激活Enh I, Enh I是许多信号传导途径的信号分子, 胰岛素结合AP-1可上调Enh I的表达IL-6可与核因子(NF)结合上调Enh的表达^[5], HBx可上调血管内皮生长因子(VEGF)启动子活性, 在缺氧状态下诱导血管生成^[6].

既然HBx具有反式激活功能, 那么他可广泛激活病毒和细胞的启动子, 促进病毒的复制和细胞的转录、生长. Doria *et al*曾利用扫描共聚焦激光显微镜技术对转染HBx的细胞进行研究, 发现培养细胞中表达的HBx不仅存在于细胞质, 同时也存在于细胞核中. 进一步的研究资料表明, 存在于胞质与胞核中的HBx分别以独立

的作用方式发挥反式激活功能. HBx对多种同源或异源病毒或细胞的基因转录调节区具有反式激活作用, 如HBV增强子/核心启动子、S基因启动子、SV40的增强子及早期启动子、单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(HSV-TK)启动子、人T淋巴细胞I型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(ITR)、人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)的LTR、Rous肉瘤病毒(RSV)及 β -干扰素的启动子等^[7]. HBx也可反式激活RNA聚合酶(po1) I, II, III启动子, 并且对HLA-DR, MHC- I 及IL-8等都有反式激活作用^[8]. HBx通过NF- κ B, NF-AT, CRE/TRE等途径起反式激活转录作用, 可作用于TF II B, TF II H, TBP, RBP5, 紫外线损伤DNA结合蛋白(UVDDDB)以及I κ B等, 调节免疫与炎症反应相关基因的表达^[9].

HBx-ORF编码的蛋白不仅存在于HBV, 亦存在于土拨鼠肝炎病毒(WHV)和地松鼠肝炎病毒(GSHV), 但不存在于鸭肝炎病毒(DHBV), 而鸭肝炎的预后良好, 不形成肿瘤, 因此认为HBx可能与HBV致癌变密切相关. 进一步研究表明, HBx能直接或间接激活各种转录因子和癌基因, 是慢性HBV感染导致HCC的重要协同因子. Hoare *et al*^[10]研究发现, 受检慢性乙肝患者中69%可检测到HBx, 其中又有20%的HBx阳性患者肝细胞核中可检测到较高浓度的HBx, 提示核内物质可能参与HBx的生物学效应. Su *et al*^[11]报道在HCC患者的癌组织中, 利用HBx的多种mAb和多克隆抗体, 58.8%的患者可检测到HBx野生型片段和变异型片段, 在癌细胞的胞质和胞核中均可检测到HBx.

体外实验研究发现, 将HBx导入小鼠的肝细胞中, 可引起肝细胞的恶性转化^[12]. 将HBx基因转入小鼠体内, 可诱发转基因小鼠肝癌形成^[13]. 另外, 还有研究发现, HBx可反式激活*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*等细胞原癌基因, 使感染HBV的非恶性胎鼠肝细胞系或胎鼠纤维瘤细胞系发生恶性转化, 并且用转化后的肝细胞接种到裸鼠后形成瘤灶^[1].

2 HBx致HCC的分子机制

乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染是导致肝细胞癌最主要的危险因素. HBx蛋白被认为在肝细胞癌的发生、发展中起着重要作用. 实验证实HBx作为一种反式活化因子, 能与细胞内多种与转录、基因调控有关的因子结合, 广泛激活病毒与细胞的启动子, 参与基因调控, 与肝细胞癌

■应用要点

本文特对目前国内外这方面研究的最新进展进行概括总结, 旨在促进HBx致肝细胞癌发生分子机制研究的深入开展.

■同行评价

本文对HBx与肝癌的关系进行了较为详细的介绍,内容较为丰富,涉及方面较广,对从事这一领域研究的学者们有较好的参考价值。

的发生、发展密切相关^[14]。HBx本身不能与双链DNA直接结合,而是通过蛋白与蛋白之间的相互作用来行使功能^[15]。有研究报道HBx对肝细胞并无直接致癌作用,只在致癌物存在时触发致癌作用^[16]。下面分别就其致肝细胞癌发生的各种可能机制作概述。

2.1 HBx与细胞增殖的关系及相关的细胞信号传导途径 迄今,国内外学者经过大量的研究证实,HBx可促进细胞增殖,这对肿瘤的发生、发展起着重要的作用。在HBV相关的HCC的发生机制中,HBx可能通过多种途径参与对细胞生长特性的调控。HBx可促进细胞有丝分裂,从而促进肝细胞增殖与恶性转化。目前研究认为,HBx促细胞增殖作用可能与以下调控机制有关。

2.1.1 HBx与蛋白酶体 蛋白酶体是一类与多数真核细胞非溶酶体降解有关的复合物,他既能降解变形、异常的蛋白质,也能降解如细胞周期素、细胞周期素依赖激酶抑制因子、P53等天然蛋白质,因此在细胞分化、细胞周期调控、信号转导、转录活化等方面具有重要的作用,其功能改变可以导致细胞高度增殖和恶性转化,在肝细胞癌变过程中具有重要作用。

26S蛋白酶体是由20S和19S组成的复合物,20S由 α 或 β 亚单位组成的4个七聚体叠加成的环构成,并且和 β 亚单位按 $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ 的顺序排列,并通过 α 亚单位与19S相连,PSMA7是一个26S蛋白酶复合物的20S的 α 亚单位,其C末端自然暴露于20S亚单位的外环,影响着其他因子的功能;PSMC1是19S的亚单位,为ATP酶家族中的一员。两者结合对维持正常的细胞功能至关重要。HBx与PSMA7和PSMC1中任一分子的作用都可能改变26S蛋白复合物的空间构象而导致细胞内复杂的变化。Zhang *et al*^[17]通过实验发现,HBx可能在20S和19S之间的位点与PSMA7和PSMC1发生作用,HBx与PSMA7和PSMC1的相互作用可解除PSMC1抑制转录因子的作用,并促进转录因子的聚集进而促进转录。同时研究发现HBx在AP-1和VP-16的协同作用下刺激哺乳动物细胞,可扰乱PSMA7和PSMC1的功能,使细胞分裂失控。

2.1.2 HBx与MAPK和JAK1的作用 MAPK的激活对细胞的增殖、生长有着极为重要的意义。Nijhara *et al*^[18]通过缺失突变观察HBx对MAPK的作用发现,HBx第58-119个氨基酸对MAPK的激活起主要作用。Benn *et al*^[13]的研究表明,在转染细胞中HBx的表达可诱导Ras-GTP复合物的形

成以及MAPK的活化,从而通过Ras-Raf-MAPK途径激活多种转录因子。其机制是HBx刺激合成的复合物Ras-GTP可促使Raf磷酸化而活化,活化的Raf通过一系列反应激活MAPK,MAPK进一步使包括AP-1, NF- κ B, AP-2等在内的多种转录因子活化。有研究表明,HBx还可通过Ras/Raf-1信号途径的激活而刺激TBP启动子的转录。TBP是细胞基因转录所必须的转录因子,其激活可使RNA聚合酶II的活性增强。

Lee *et al*利用免疫沉淀和Western blot分析转染了HBx基因的Hepa细胞,发现HBx可通过促使一组新的酪氨酸蛋白激酶家族JAK的磷酸化进而激活一类新的转录因子,即信号转导子和转录激活子(STAT)。他们还通过缺失突变研究证实HBx诱导JAK-ATAT途径的活性是由HBx基因的中央区域所编码的HBx蛋白所决定的,STAT一旦被激活,便与JAK形成二聚物或多聚物转运到核内,结合到DNA上的STAT结合序列,导致不同基因激活。Kim *et al*^[19]也发现HBx可形成二聚体与JAK发生对接,激活JAK,激活的JAK可活化AP-1, NF- κ B和SRE增强子,发挥刺激转录活性的效应。

2.2 HBx与细胞凋亡的关系及相关的细胞信号传导途径 HBx对肝细胞凋亡的调节具有双重的调节作用,即具有促进肝细胞凋亡和抑制肝细胞凋亡的双重作用。那么到底其在什么情况下发挥促进凋亡的作用,什么情况下发挥抑制凋亡的作用呢?具体机制是什么?对此,各国学者都进行了大量研究,发现生长因子、细胞因子以及相关的信号传导途径在肝细胞的凋亡、增殖和再生中起着重要作用。这些信号传导途径包括STAT激酶途径、NF- κ B途径、JNK/SAPK途径、ER激酶1(ERK 1)途径和ERK2途径,各种信号传导途径通常具有交叉作用或重叠效应。HBx蛋白可通过调节肝细胞凋亡的传导途径调控肝细胞的凋亡。这在肝细胞癌变的起始阶段起着重要作用。以下分别概述HBx对肝细胞凋亡调控的各种信号传导途径。

2.2.1 HBx与Fas/FasL凋亡途径 FasL与靶细胞表面Fas结合后可诱导Fas分子三聚体化,导致Fas细胞质内的死亡结构域(DD)与接头蛋白FADD羧基端的DD结合,促使FADD N端的DED(death effector domain)与pro-Caspase-8/10的DED结合,继而激活下游的pro-Caspase,此外还可以激活Bcl-2家族的促凋亡成员Bid, Bid被Caspase催化断裂后,C端的活性部分转移至线粒体膜引起跨

膜势能破坏, 释放细胞色素C, pro-Caspase-2, 3, 9等, 继而激活下游的pro-Caspase3, 6, 7, 其效应为破坏DNA完整性、干扰细胞周期的正常运行、破坏细胞的结构, 最终导致细胞凋亡的形态学改变. 有学者将HBx基因转染肝癌细胞, 可上调肝癌细胞FasL的表达, 从而通过诱导表达Fas的T细胞凋亡而使肝癌细胞逃脱免疫监视^[20].

2.2.2 HBx与PI-3K/PKB途径 Shih *et al*研究发现, HBx可通过激活PI-3-K, 磷酸化PKB/Akt, 从而有效地抑制TGF- β 引起的细胞凋亡^[21]. 而PI-3-K和PKB/Akt的RNA表达水平并无明显变化. 分析认为HBx可能通过细胞因子, 诸如IL-6, 胰岛素生长因子I、表皮生长因子等来激活PI-3-K/PKB途径. HBx还可通过激活其他信号级联, 诸如Sre-Ras-GTP复合物和JAK-STAT等来间接激活PI-3-K/PKB途径. 也有实验表明HBx可直接作用于PI-3-K, PKB/Akt这两种激酶^[22].

2.2.3 HBx与PKC途径 哺乳动物的PKC家族至少包括10个家族成员, 这些磷酸依赖性激酶在细胞生长、分化、增殖与凋亡等方面有着重要意义. HBx能够增加内源性PKC的水平, 随后激活AP-1和NF- κ B转录因子. 有证据表明, HBx激活NF- κ B是一个PKC依赖过程. HBx也可能通过增加内源性激活因子Sn-1, 2-DAG短暂地激活PKC. 最近发现HBx蛋白能与XAP3(一种PKC结合蛋白)和PKC发生相互作用, 从而加速HBx的磷酸化, 增加PKC的自动磷酸化, 上调HBx介导的转录激活.

2.2.4 HBx与TNF/TNFR凋亡途径 TNF- α 可作为一种应激因子与细胞膜上的相应受体即TNFR相结合调控细胞凋亡, 一方面TNFR被激活后通过特定的结合蛋白TRADD, FADD, pro-Caspase-8启动凋亡, 另一方面激活后的TNF受体可通过上调NF- κ B以激活生存途径. TNFR可促使TRADD, TRAF2, IP, NIK和IKK组成一复合体, 允许NF- κ B转位子核内激活凋亡抑制基因TAP以抑制凋亡^[23], 这一信号传导途径有利于维持细胞生存与凋亡的一种动态平衡. 已有实验证实, HBx可刺激被转录因子NF- κ B激活的启动子, 细胞质中HBx的短暂表达可使两种NF- κ B的抑制因子I κ B α 和p105发生磷酸化而降解, 从而上调NF- κ B的表达.

2.3 HBx与肿瘤抑制因子 HBx与抑癌基因的关系目前研究也比较多, 并且不断有所发现. 在所有的抑癌基因中, p53家族以及p16和p21研究相对较多, p53家族有p53, p63, p73 3个成员, 其中p53

研究最多, 发现他与肿瘤的关系最为密切. 那么HBx与他们的关系如何呢? 下面就此进行概述.

2.3.1 HBx与p53家族 P53蛋白是由抑癌基因p53编码的, 有3个功能区: DNA结合区、寡聚化区、反式活化区, P53具有两个独立的HBxAg结合位点, 分别是位于p53特异DNA结合区、寡聚化区^[24]. p53具有维持细胞基因稳定性作用, 包括: 反式激活作用、抑制功能、调节DNA修复、引导细胞凋亡和细胞分裂周期调控功能. 在肝细胞中HBx与P53的关系, 学者进行了多方面的研究, 有人研究发现在肝细胞的胞质中发现了HBxAg与P53结合物, 并证实了他们的结合是可逆的^[4].

HBx对p53的影响是多方面的. P53与HBx蛋白相互作用, 破坏了P53的反式激活作用, 抑制P53引导的细胞凋亡^[4], 该机制在HBV相关的HCC的病理过程中起着重要作用. 在肝细胞核内, 低水平的P53支持细胞分裂期G₂, 阻止细胞凋亡, 而高水平的P53则可引导细胞凋亡^[25]. HBx-Ag与P53相互结合后, 可使P53定位于细胞核内的过程受阻, 导致核内P53浓度降低, 其所引导的细胞凋亡受到抑制. 另外, HBxAg可不依赖于P53, 而是通过HBx-PI3K-Akt-Bad途径抑制细胞凋亡, 还可以被PI3K特异性抑制剂所阻断. 还有研究发现, HBx可通过上调细胞周期蛋白激酶抑制剂(CDKI)p21waf1/cip1蛋白的表达, 延长G₁-S细胞周期转换, 增加了肝细胞基因突变的可能性^[26]. p53基因对HBx蛋白亦可有抑制作用, p53基因家族新成员p73 β , p73 α 基因, 均能通过抑制HBx的作用, 从而抑制HBV的复制, 其中p73 β 基因的抑制作用更主要、更有效^[15]. 至于P63目前报道甚少.

HBx蛋白与P53结合还可导致2种变化: (1) 继发p53基因突变, 一方面是HBx增加对AFB1的敏感性, 同时AFB1摄入还可使感染HBV的人类肝细胞p53在249位点发生点突变, 另一方面HBx还可通过其他途径如HBx-PI3K-Akt-Bad途径和上调CDKI p21waf1/cip1蛋白表达, 延长G₁-S细胞周期转换, 增加了p53基因突变的可能性^[27]. 这一改变将导致失去wtp53的“分子警察”作用, 从而导致细胞增生而发生癌变. (2) 继发AFP增加, AFP是常用的HCC的血清和组织标记物. 研究发现HBxAg与P53结合, 削弱了P53对AFP基因表达的抑制作用, 使得肝细胞内AFP合成增加, 而AFP可能是HBxAg促进乙型肝炎相关性HCC的发生、发展的一个重要因素.

既然HBx与p53的作用可以导致上述诸多的改变,那么HBx对p53修复DNA损伤的能力又有何影响呢?我们知道,p53通过调节转录及核酸切除修复过程而在保持基因组稳定性方面发挥作用.体内外一系列研究已证实,HBxAg能够与p53结合,影响p53的功能,干扰p53引导核酸修复功能.HBxAg还可通过结合p53抑制其引导的在转录起始或延伸阶段分别与转录因子IIH(TF IIH)的相互作用,使核苷酸损伤的切除修复中断.有学者发现,HBxAg可通过与p53的相互作用,进而影响肝细胞DNA的修复;也可与已损伤的DNA结合蛋白相结合,在核苷酸损伤的切除修复中起协同作用^[28].

2.3.2 HBx与p16和p21 p16与p21是继p53之后研究得较多的肿瘤抑制基因,但其在HBx致肝细胞癌发生机制中的作用研究甚少.众所周知,肿瘤的发生是由于细胞增殖与分化异常所致,抑癌基因的抑癌机制之一就是使细胞分裂阻滞于细胞周期某一时相,而抑制细胞异常增殖.p16蛋白通过抑制细胞周期素依赖性蛋白激酶CDK4和CDK6的活性,使细胞周期停滞于G₁-S期.若其功能丧失,细胞就可能恶变.那么HBx是通过什么机制来影响p16而导致HCC发生的呢?王兆文 *et al*^[29]在HCCs及癌旁组织中研究HBx的整合与P16表达间的关系发现,HBx基因整合的HCC中,p16蛋白表达缺失率(19/25)远高于无HBx整合者(3/10),两者差异有显著性($P < 0.05$),提示HBx基因整合影响P16表达可能是HBV致癌的重要机制之一.推测HBx基因整合可能在多个层面影响P16蛋白的表达:HBx基因整合可能引起p16基因的缺失或突变;HBx基因编码的蛋白与损伤后DNA结合蛋白(在核苷酸的切除修复中必不可少)相结合,可能使异常p16基因无法修复,出现复制障碍;HBx蛋白还可能与转录调节蛋白形成复合体,从而调节p16基因表达.HBx基因的整合也有可能影响p16 mRNA的表达与翻译过程.

P21作为一种细胞周期主要抑制调控因子,控制细胞周期G₁/S调控点,调控细胞周期的进展,因此,他在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用.K.Fukushima *et al*研究HCCs及癌旁组织中P21^{waf1}和p16^{INK4a}表达时发现,P21^{waf1}表达水平的下降伴有P16^{INK4a}表达的减少或缺失,同时还发现P21^{waf1}的缺失表达常常伴p53基因的突变.因此,P53对P21^{waf1}表达的影响较大,推测P21^{waf1}的表达既受上游调节因子p53的调控,也受转录后调节因子p16^{INK4a}的调控.另外,还有实

验显示p16^{INK4a}甲基化在HCCs中出现的频率比在癌旁组织中更高,其甲基化与表达呈反比关系,而P21^{waf1}的表达减少程度也与P16^{INK4a}的甲基化程度及P16^{INK4a}低表达呈一定的正比关系.HBx蛋白是一种多功能蛋白质,可通过调控P21蛋白表达而影响细胞周期进程^[30],而HBx蛋白与P53蛋白相结合可使其失活,可以认为P21蛋白表达降低是由于HBx蛋白使P53蛋白失活所致.另外还有研究发现,HBx可通过非P53依赖的途径抑制P21^{waf1}的转录.

2.4 HBx对DNA修复的影响 在HBx与p53的关系中,谈到了HBx与p53的结合可干预受损DNA的修复,事实上HBx还可通过一些其他的途径影响受损DNA的修复.有研究证实,HBx可结合XAP-1而影响损伤DNA的修复.通过HBx缺失突变的研究发现,HBx第55-101氨基酸是X相关蛋白-1(XAP-1)的结合部位.由于损伤DNA与XAP-1的结合是DNA修复的第一步,HBx与XAP-1的结合影响了核苷酸切除修复的后续步骤,从而妨碍受损DNA的修复.Croisman与Jia *et al*的研究也证实,HBx抑制DNA修复并不依赖P53,后者还发现HBx可与TF IIH转录因子、核苷酸切除修复因子XPB, XPD在体外结合,阻碍XPB, XPD与P53的结合,进而影响受损DNA的修复.另外,HBx还可与UV2DDB结合从而影响着DNA的修复.最近研究发现,表达HBx的Chang氏肝细胞对低剂量的紫外线照射的致死效应十分敏感,提示HBx可能通过结合受损DNA来干扰细胞的DNA修复功能,从而导致潜在的致死性或恶性突变的积累^[31].Becker *et al*发现,HBx可与猴UV-DDB及人的XAP-1结合,且HBx的表达显著抑制细胞受损DNA的修复能力.这表明HBx在肝细胞癌变中可作为一个辅因子阻断细胞有效地修复受损DNA,导致DNA突变的累积而参与肝细胞恶性转化和癌变发生.

2.5 HBx与细胞周期 细胞周期又称细胞生活周期或细胞增殖周期,指细胞从上一次有丝分裂结束到下次有丝分裂完成所经历的整个过程.肿瘤生长的最基本特征是增殖失控,即表现为连续不断的细胞周期.分裂中的真核细胞必须经过细胞周期的两个“控制点”,即:G₁-S和G₂-M的转变,也就是DNA复制的起始与完成及细胞分裂的起始与完成.细胞周期的调控是在一系列的调控因子的严密监控下进行的,如果某一个或几个环节出现问题,将导致细胞周期调节失控从而导致细胞的增殖异常进而导

致肿瘤的发生. 一些癌基因和抑癌基因可直接参与细胞周期的调控, 如c-myc, c-fos, c-jun等原癌基因对细胞的增殖生长具有重要影响. HBx可通过反式激活作用激活这些基因, 使其处于活化状态, 持续刺激肿瘤细胞的增殖^[32]. 研究表明, HBx可缩短细胞从G期进入S期的时间, 使细胞快速通过细胞周期的两个控制点. 另外还有研究发现, HBx可通过提高细胞周期依赖激酶CDK2和CDC2的活性水平对细胞周期进行调控.

3 结束语

目前, HBx基因是研究乙肝相关性肝癌发生机制的热点, 经过各国学者的不懈努力, 取得了较大进展, 尤其在细胞信号传导途径方面的成绩更为突出. 在HBx与抑癌基因, 如与p53的新成员p73, 与p16, p21等之间相互作用对肝细胞恶性转化及癌变的影响等方面的研究也取得初步成果, 但HBx与p16甲基化关系方面的研究国内外尚未见报道, 而且HBx与p53, p21, p16之间的关系错综复杂, 这些仍需要不断地深入研究. 另外, 我们对HBx参与调控信号传导方面的研究应该说还处于比较肤浅的阶段, 在这些方面开展各种针对性的干预实验, 将有助于进一步揭示HBx致肝细胞癌发生的分子机制, 对探寻乙肝相关性肝癌新的防治策略具有重要意义.

4 参考文献

- 1 Hohne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990; 9: 1137-1145
- 2 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- 3 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-10354
- 4 Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14707-14712
- 5 Choi BH, Park CJ, Rho HM. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol* 1998; 17: 951-956
- 6 Ohno H, Kaneko S, Kobayashi K, Murakami S. Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6. *J Med Virol* 1997; 52: 413-418
- 7 Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of

- hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993; 195: 305-314
- 8 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 111-114
- 9 Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6345-6354
- 10 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
- 11 Su Q, Schroder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120
- 12 Qadri I, Ferrari ME, Siddiqui A. The hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 15443-15450
- 13 Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-819
- 14 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; 22: 2729-2740
- 15 Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1094-1097
- 16 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- 17 Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000; 275: 15157-15165
- 18 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Kumar V, Sarkar DP. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett* 2001; 504: 59-64
- 19 Kim H, Lee YH, Won J, Yun Y. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 886-894
- 20 Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. Expression of fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 1999; 82: 587-591
- 21 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase

- pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 22 Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 189-205
- 23 DeLuca C, Kwon H, Lin R, Wainberg M, Hiscott J. NF-kappaB activation and HIV-1 induced apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 235-253
- 24 Lin Y, Nomura T, Yamashita T, Dorjsuren D, Tang H, Murakami S. The transactivation and p53-interacting functions of hepatitis B virus X protein are mutually interfering but distinct. *Cancer Res* 1997; 57: 5137-5142
- 25 Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10: 2438-2451
- 26 Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol* 2002; 83: 2765-2772
- 27 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 3384-3394
- 28 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- 29 王兆文, 彭志海, 李克, 蔡国强, 张益, 顾炜. p16影响乙肝病毒相关性肝细胞肝癌的发生. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 356-358
- 30 Fukushima K, Ueno Y, Yamagiwa Y, Yamakawa M, Iwasaki T, Ishii M, Toyota M, Shimosegawa T. Correlation between p21waf1 and p16ink4a expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research* 2001; 20: 52-67
- 31 Capovilla A, Carmona S, Arbuthnot P. Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 255-260
- 32 Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6599-6603

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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世界华人消化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: 150001, 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。联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

溃疡性结肠炎发病机制研究进展

桑力轩, 刘汉立, 姜敏

桑力轩, 刘汉立, 姜敏, 中国医科大学第一临床学院消化科
辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 姜敏, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第一临床学院消化科. sanglixuan2008@sohu.com
电话: 024-23414369
收稿日期: 2007-03-18 接受日期: 2007-03-31

Progress of research into the pathogenesis of ulcerative colitis

Li-Xuan Sang, Han-Li Liu, Min Jiang

Li-Xuan Sang, Han-Li Liu, Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Clinical College of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Clinical College of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sanglixuan2008@sohu.com
Received: 2007-03-18 Accepted: 2007-03-31

Abstract

Despite being known as a clinical entity for more than a century, the true origins of ulcerative colitis remain elusive. However, several factors are thought to contribute to the development of this condition. Environmental factors may interfere with inherent predispositions to ulcerative colitis. Genetic susceptibility, together with abnormal innate immunoreactivity, is probably the essential prerequisite for the initiation and perpetuation of ulcerative colitis. New investigative technology has recently clarified the role of bacterial species, which may account for intestinal dysbiosis, as a factor for triggering ulcerative colitis. The search for the pathogenesis of ulcerative colitis continues to have great significance, with the aim of achieving improvements in its treatment and in patient quality of life.

Key Words: Ulcerative colitis; Etiology; Pathogenesis

Sang LX, Liu HL, Jiang M. Progress of research into the pathogenesis of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2249-2254

摘要

尽管对溃疡性结肠炎的临床研究有100多年的

历史, 但是他的真正病因尚不清楚, 多种因素可能促进这种疾病的发生和发展. 环境因素可能影响遗传易感性, 遗传易感性与异常的先天免疫反应性可能是溃疡性结肠炎的起始反应和持续反应的先决条件. 最近研究结果证实, 细菌物种可解释肠内生态失调可能是溃疡性结肠炎的一种促发因素. 溃疡性结肠炎的病因学研究对于提高疾病的治疗效果和改善患者的生存质量都具有重要意义.

关键词: 溃疡性结肠炎; 病因学; 发病机制

桑力轩, 刘汉立, 姜敏. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2249-2254
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2249.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎是一种原因不明的非特异性炎症, 病变位于大肠, 呈连续性弥漫性分布, 多数累及直肠和乙状结肠, 溃疡性结肠炎一个典型的临床过程包括黏液脓血便和腹痛腹泻. 然而, 作为一种全身系统性疾病, 部分患者有肠外表现, 包括累及关节, 例如肠病性关节炎, 肝胆管的疾病, 例如原发性硬化性胆管炎, 还可以出现眼和皮肤的损害^[1-2]. 在世界范围内, 溃疡性结肠炎的发病率波动在十万分之0.5-24.5, 发病率和患病率与国家的经济状况相关, 在发展中国家发病率最低, 在北美和西欧中欧发病率最高, 目前, 溃疡性结肠炎的发病率在中欧和东欧有增长的趋势, 而在西欧和斯堪的那维亚人地区发病率稳定^[3-4]. 1859年, 溃疡性结肠炎就被临床医生所了解, 但是病因学的秘密直到今天尚不完全清楚. 近几年来, 新的分子生物学机制的研究使本病在病因的研究方面取得了很大进步^[5-6].

1 环境因素

1.1 应激和心理因素 心理神经免疫学研究已经表明, 行为因素和情绪能对全身和局部的炎症反应和免疫系统产生影响^[7-10]. 在1950年初期, 溃疡性结肠炎被称为心身疾病, 在文艺复兴时期

■背景资料

1859年, 人类就了解了溃疡性结肠炎, 但是至今真正病因仍不十分清楚, 目前已知的环境因素, 遗传因素, 免疫因素, 感染因素可能促进该病的发生和发展.

■ 研发前沿

关于溃疡性结肠炎发病机制中免疫因素的研究较多,免疫因素的研究对疾病的治疗也具有重要意义。

这个方面的研究就开始增加,如果患者显示出很高的抑郁分数,疾病会显示出很大的恶化风险^[11-13],这些结果被临床实践所支持。前瞻性研究表明,情感的消极事件能引起溃疡性结肠炎的复发^[14-20]。

1.2 吸烟和口服避孕药 溃疡性结肠炎主要是影响不吸烟者。与不吸烟者相比,吸烟能改善疾病的过程,能减少激素的需要量和结肠切除术发生率,大样本的荟萃分析显示出一个优势比0.57(95%CI: 0.38-0.85),这是当前吸烟者和不吸烟者相比的全结肠切除术比率^[21-23]。吸烟对溃疡性结肠炎有利的影响的假定机制是:香烟中的烟碱使黏蛋白合成增加,致炎细胞因子的产生减少,肠道平滑肌紧张度降低,改善肠内对大分子的通透性^[24-28]。避孕药对溃疡性结肠炎的影响尚不十分清楚,但是有数据表明口服药计划生育可能作为溃疡性结肠炎的一种触发因素,荟萃分析显示:避孕药和溃疡性结肠炎之间存在正相关^[29-31]。目前,我们还没有明确的证据来建议溃疡性结肠炎的患者不使用避孕药。

1.3 饮食因素 摄入较多的牛奶产品或者是摄入较少的膳食纤维可能和溃疡性结肠炎的复发有关^[32],有证据表明,饮食因素中的硫和硫酸盐与病情复发有关,这可能是硫和硫酸盐直接作用于肠黏膜细胞引起的,还可能是被蛋白质功能和抗原性的改变间接引起。另外更进一步研究支持同现代生活方式相关的营养因素影响溃疡性结肠炎的发生率^[33-37]。

1.4 阑尾切除术 研究发现,在20岁之前行阑尾切除术的人发展成溃疡性结肠炎的可能性大大降低。其后,13例分析对照研究证实,在阑尾切除术和溃疡性结肠炎之间存在反相关。研究表明在年轻时切除阑尾患溃疡性结肠炎的可能性至少减少70%,阑尾切除术的预防效果其机制还不清楚。有人推测,切除阑尾时切除了大量的淋巴结,可能改变了调节器和效应器细胞之间的平衡,这个观点被实验数据支持,例如在切除盲肠后结肠炎发生率减少,溃疡性结肠炎的患者很少发生阑尾炎^[38-40]。

2 遗传因素

遗传易感性在炎症性肠病的病因学中具有重要作用。溃疡性结肠炎和克罗恩病都有复杂的遗传基础,存在多重的联合基因和不纯一性。在过去的10 a中,十多个基因组的筛选和不同的连锁研究已经描绘出至少9个炎症性肠病(IBD)的易

感位置,许多研究已经证明NOD2/CARD15多态现象和溃疡性结肠炎不相关^[41]。然而,研究人员已经开始研究其他的基因是否与溃疡性结肠炎相关,研究已经发现,多元抗药性基因1(MDR1)缺陷的老鼠发展成结肠炎。另外,临床研究发现,MDR1的两个多晶型物(C3435T和G2677T/C)和溃疡性结肠炎相关。人类多元抗药性基因密码对于P-糖蛋白而言是形成一个抵抗外源性化学物质的屏障,这个基因的多态现象引起低蛋白表达,在防御肠内细菌方面似乎很重要^[42-45]。然而,其他的病例对照研究不能证实这个结果,正在进行的关于IBD3和IBD6的研究有望证实这个结果,IBD3位于6号染色体上,包含主要组织相容性复合物基因,根据前人的研究结果,人体白细胞抗原等位基因和IBD似乎是相关的。IBD6包括一种抗抑郁成分和膜蛋白质结合的基因密码,这对于免疫细胞的吸附和运输是很重要的^[46]。核因子 κ B(NF- κ B)家族成员的多态现象和IBD的关系非常密切^[47],相关的研究聚焦在人类4号染色体的NF- κ B1基因启动子区的多态现象,他在溃疡性结肠炎的发病过程中参与许多调控进程^[48]。研究人员发现,与对照组对比,荷兰人高加索人的患者NF- κ B1启动因子94ATTG多态现象缺失频率增加。此外,一个94ATTG缺失的纯合子患者比不是纯和子的患者发病要年轻。关于溃疡性结肠炎的与NF- κ B1基因相关疾病易感性的确切机制尚不清楚,一种解释是由于转录蛋白水平很低,对细菌抗原的免疫反应很弱,导致菌株入侵黏膜并且诱发慢性炎症。当前研究主要是集中在基因编码TLR4和TLR9修饰肠腔内抗原应答反应^[49]。尽管新的实验都证明,与克罗恩病相比,遗传易感性在溃疡性结肠炎中相对较弱,但是我们推测,加强溃疡性结肠炎遗传方面的研究将会使疾病的诊断和治疗水平有很大的提高。

3 免疫因素

在局部和系统的免疫反应中消化道内细菌刺激上皮细胞和肠道淋巴组织,先天免疫的激活作用使肠内上皮细胞和细菌与黏膜稳定的紧密接触,通过形成的膜感受器(TLR)或者细胞内的NOD族感受器对细菌抗原进行快速识别。导致肠道疾病的细菌通过激活相关的转录基因刺激促炎症反应细胞因子的产生。至于健康人黏膜存在非致病微生物的入侵,免疫活性细胞产生调控细胞因子。值得强调的是,一些菌株调控释

放促炎症细胞因子并且诱导有活性的淋巴细胞凋亡^[50].

上皮细胞不仅在先天免疫的形成中起重要作用, 而且在诱导后天免疫的记忆途径上也有重要作用. 后天免疫反应主要是发生在peyer's斑和淋巴结. 为了使同源T细胞或B细胞增殖, 专门化树突状细胞传递细菌抗原给淋巴组织. 未致敏的T细胞分化为Th1, Th2, T调控细胞, 这些淋巴细胞亚群效应器能力有显著的不同^[51]. 1990年代, 研究发现克罗恩病和溃疡性结肠炎细胞之间的调停主要是被Th1和Th2细胞所解释. 真实情况似乎更加复杂, 在两种疾病之间有严格的分化, 理解还远不完善^[52-53]. 共生菌株和免疫间隔之间的肠道内黏膜免疫的失调和相互作用的缺陷能导致免疫调节的紊乱, 包括炎症性肠病. 由于发达国家卫生标准很高, 在儿童期细菌和免疫活性细胞的接触显著减少, 结果, 细菌抗原耐受性的减少可能导致后来的慢性肠病, 这样的一种解释被称为“卫生学假说”^[54].

4 感染因素

溃疡性结肠炎和传染性肠炎有很多类似的方面, 因此, 许多研究者怀疑是否存在某种微生物触发肠道的慢性炎症, 然而, 直到现在, 尚未证实某种微生物与该病有关. 许多论点反对该病存在一个感染的病因. 例如在溃疡性结肠炎的患者之间缺乏传染证据. 溃疡性结肠炎高发的国家, 感染性肠病的发病率却很低. 在卫生条件很差的国家, 消耗未被加工的食物却是保护性因素. 在儿童期频繁应用抗生素增加溃疡性结肠炎的发病风险. 在溃疡性结肠炎的治疗中, 缺乏有效的抗微生物制剂. 在溃疡性结肠炎患者的粪便中培养出结果亦不一致^[55]. 已经有大量的证据表明, 在溃疡性结肠炎的患者中, 肠道细菌与黏膜之间存在异常的黏膜免疫反应. 分子生物学技术已经表明一个成人肠道内空间能容纳多于500种不同的细菌, 许多菌株沿小肠逐渐增加, 革兰氏阴性菌占主要地位, 大肠中细菌的数量在肠腔内每公分达到大约 10^{12} , 当前条件下多于50%的菌株还不能被人工培养. 在成人粪便的细菌组成是宿主专化和稳定的, 菌株波动很少达到20%^[56-57].

肠道细菌能刺激淋巴细胞克隆增殖并且阻止淋巴细胞凋亡^[58], 革兰氏阳性菌优先刺激白细胞介素12的产生, 然而革兰氏阴性菌诱导白细胞介素4的产生, 革兰氏阴性菌和革兰氏阴性菌细胞

壁的主要成分对于诱导口服免疫耐受是很重要的. 虽然标准的培养技术能检测达到30%的微生物群, 新的技术(包括细菌的16s核糖体核糖核酸分析, 多聚酶链式反应, 原位杂交, 流式细胞计量术, 脱氧核糖核酸微点阵, 薄片分析)已经显著的增加了检出率, 有益的菌株诸如双歧杆菌和乳酸杆菌, 在活动性溃疡性结肠炎患者肠黏膜中是缺失的^[59]. 另一个方面, 革兰氏阴性厌氧菌, 特别是大肠杆菌, 变形梭杆菌, 拟杆菌在黏膜中浓度增加, 消化链球菌属有一个很高的侵袭频率. 研究证实, 与健康人相比, 溃疡性结肠炎患者的结肠样本中黏膜存在严重的细菌感染^[60-63]. 在炎症性肠病的患者中, 细菌黏膜入侵与免疫球蛋白G和细菌性抗原的滴定度是相对应的, 他们中的一些可以用来区分溃疡性结肠炎和克罗恩病^[63-64]. 由于遗传对照提出了肠内菌丛的测定, 在炎症性肠病患者的健康亲属中发现了粪便菌丛的改变^[65], 然而, 问题就是在溃疡性结肠炎的患者中生态失调是疾病的原因还是结果仍然缺乏一个满意的答案. 肠道细菌在溃疡性结肠炎的发病机制中的作用被总结如下: (1)在溃疡性结肠炎患者中菌丛的组成和空间分布与对照组存在明显差异; (2)在肠道免疫系统中, 一些共生菌株在黏膜内环境稳态和成熟方面起重要作用^[66-67]; (3)不同的细菌存在变异的能力来诱导慢性肠炎. 微生物制剂或抗生素有疗效主要是归因于对细菌群落控制^[50,68].

20多年来, 溃疡性结肠炎在病因、发病机制、应用现代的治疗方法上尽管有很大进步, 但是许多问题还是没有满意的答案. 现在, 任何一种单独的治疗方法成功应用于溃疡性结肠炎患者中似乎都是不太可能的. 前景有待于个体化治疗的应用. 靶向作用于刺激抗原, 纠正特殊的遗传缺陷, 修复被破坏的黏膜屏障, 消除肠腔内的抗原, 这些都有待于细菌群落的操纵, 或者免疫抑制分子的传递来阻断扩大的黏膜免疫活性, 我们希望益生元, 生物制剂或者是局部应用抗生素能广泛的应用, 还有新的分子靶向作用, 抑制促炎因子, 或者希望在不久的将来有新的治疗方法.

5 参考文献

- 1 Park SH, Kim YM, Yang SK, Kim SH, Byeon JS, Myung SJ, Cho YK, Yu CS, Choi KS, Chung JW, Kim B, Choi KD, Kim JH. Clinical features and natural history of ulcerative colitis in Korea. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 278-283
- 2 Brandt LJ, Boley SJ, Mitsudo S. Clinical

■创新盘点

本文对溃疡性结肠炎发病机制中的4个方面做了详尽的分析, 对临床上分析该病的有一定的帮助.

■应用要点

细菌物种可解释肠内生态失调可能是溃疡性结肠炎的一种促发因素。溃疡性结肠炎的病因学研究对于提高和疾病的治疗效果和改善患者的生存质量都具有重要意义。

- characteristics and natural history of colitis in the elderly. *Am J Gastroenterol* 1982; 77: 382-386
- 3 Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6102-6108
 - 4 Lakatos L, Lakatos PL. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? *Postgrad Med J* 2006; 82: 332-337
 - 5 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
 - 6 Kirsner JB. Inflammatory bowel diseases at the University of Chicago-early experiences: a personal historical account. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 407-416
 - 7 Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861-869
 - 8 Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Tache Y, Wood JD. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391-1411
 - 9 Heinrichs SC, Tache Y. Therapeutic potential of CRF receptor antagonists: a gut-brain perspective. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 647-659
 - 10 Glavin GB, Murison R, Overmier JB, Pare WP, Bakke HK, Henke PG, Hernandez DE. The neurobiology of stress ulcers. *Brain Res Brain Res Rev* 1991; 16: 301-343
 - 11 Filipovic BR, Filipovic BF, Kerkez M, Milinic N, Randelovic T. Depression and anxiety levels in therapy-naive patients with inflammatory bowel disease and cancer of the colon. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 438-443
 - 12 Szigethy E, Carpenter J, Baum E, Kenney E, Baptista-Neto L, Beardslee WR, Demaso DR. Case study: longitudinal treatment of adolescents with depression and inflammatory bowel disease. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2006; 45: 396-400
 - 13 Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004; 66: 79-84
 - 14 Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB Edwardes MD, Shah S, Ransil B, Locke SE. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2203-2208
 - 15 Langhorst J, Anthonisen IB, Steder-Neukamm U, Luedtke R, Spahn G, Michalsen A, Dobos GJ. Patterns of complementary and alternative medicine (CAM) use in patients with inflammatory bowel disease: perceived stress is a potential indicator for CAM use. *Complement Ther Med* 2007; 15: 30-37
 - 16 Kunzendorf S, Jantschek G, Straubinger K, Heberlein I, Homann N, Ludwig D, Benninghoven D. The Luebeck interview for psychosocial screening in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 33-41
 - 17 Vidal A, Gomez-Gil E, Sans M, Portella MJ, Salamero M, Pique JM, Panes J. Life events and inflammatory bowel disease relapse: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 775-781
 - 18 Bernstein CN, Walker JR, Graff LA. On studying the connection between stress and IBD. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 782-785
 - 19 Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491
 - 20 Jantschek G, Zeitz M, Pritsch M, Wirsching M, Klor HU, Studt HH, Rasenack J, Deter HC, Riecken EO, Feiereis H, Keller W. Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1289-1296
 - 21 Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 848-859
 - 22 Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 481-496
 - 23 Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 1147-1152
 - 24 McGilligan VE, Wallace JM, Heavey PM, Ridley DL, Rowland IR. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 108-115
 - 25 Scott DA, Martin M. Exploitation of the nicotinic anti-inflammatory pathway for the treatment of epithelial inflammatory diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7451-7459
 - 26 Ingram JR, Rhodes J, Evans BK, Thomas GA. Preliminary observations of oral nicotine therapy for inflammatory bowel disease: an open-label phase I-II study of tolerance. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 1092-1096
 - 27 Sandborn WJ, Tremaine WJ, Leighton JA, Lawson GM, Zins BJ, Compton RF, Mays DC, Lipsky JJ, Batts KP, Offord KP, Hurt RD, Green J. Nicotine tartrate liquid enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis unresponsive to first-line therapy: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 663-671
 - 28 Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP, Lawson GM, Petersen BT, Batts KP, Croghan IT, Dale LC, Schroeder DR, Hurt RD. Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 126: 364-371
 - 29 Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy). *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 859-867
 - 30 Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 309-315
 - 31 Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37: 668-673
 - 32 Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, Gonzalez-Huix F, Riera J,

- Gonzalez-Lara V, Dominguez-Abascal F, Gine JJ, Moles J, Gomollon F, Gassull MA. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalazine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 427-433
- 33 Magee EA, Edmond LM, Tasker SM, Kong SC, Curno R, Cummings JH. Associations between diet and disease activity in ulcerative colitis patients using a novel method of data analysis. *Nutr J* 2005; 4: 7
- 34 Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004; 53: 1479-1484
- 35 Tilg H, Kaser A. Diet and relapsing ulcerative colitis: take off the meat? *Gut* 2004; 53: 1399-1401
- 36 Winawer SJ. Screening of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2005; 14: 699-722
- 37 Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrugger RW. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 243-249
- 38 Jiang L, Xia B, Li J, Ye M, Deng C, Ding Y, Luo H, Ren H, Hou X, Liu H, Xu H, Cheng H, Yang H. Risk factors for ulcerative colitis in a Chinese population: an age-matched and sex-matched case-control study. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 280-284
- 39 Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, Luegering A, Heidemann J, Lebidz P, Rijcken E, Kiesel L, Domschke W, Kucharzik T, Maaser C. Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. *Inflamm Bowel Dis* 2007
- 40 Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 171-176
- 41 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36
- 42 Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003; 52: 759-766
- 43 Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A, Penati C, Tenchini ML, Bianchi Porro G. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 516-523
- 44 Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 797-805
- 45 Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 26-33
- 46 Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62: 527-535
- 47 Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietinck R. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004; 53: 980-986
- 48 Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. A NFkB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 401-405
- 49 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
- 50 Borruel N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002; 51: 659-664
- 51 Mudter J, Neurath MF. Mucosal T cells: mediators or guardians of inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 343-349
- 52 Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 311-317
- 53 Hanauer SB. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 26-31
- 54 Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005; 54: 317-320
- 55 Guarner F. Microecology as a target for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. *IDrugs* 2003; 6: 868-873
- 56 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
- 57 Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 291-297
- 58 Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Dore J, Pochart P, Seksik P. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 4: 18-23
- 59 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
- 60 Macfarlane S, Furrie E, Cummings JH, Macfarlane GT. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in

同行评价

本文综述了溃疡性结肠炎发病机制进展, 内容广泛, 层次清楚, 对溃疡性结肠炎的研究有重要参考价值。

- patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1690-1699
- 61 Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1-4
- 62 Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut* 2004; 53: 91-98
- 63 Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 849-853
- 64 Mow WS, Vasiliaskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JL, Yang H, Targan SR. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 414-424
- 65 Van de Merwe JP, Schroder AM, Wensinck F, Hazenberg MP. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 1125-1131
- 66 Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5606-5610
- 67 Sartor RB. Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 324-330
- 68 Kruis W. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 4: 75-78

编辑 王晓瑜 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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》合作举办“原位肝移植新技术及进展”学习班,由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持,并邀请海内外肝移植知名专家授课,就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座。

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位,也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前,已开展近1000例肝脏移植术,术后1 a生存率超过80%,居国内领先水平。本中心已举办3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: 510630,广州市天河路600号,中山大学附属第三医院肝脏移植中心。联系人:汪根树 电话:020-87595523 传真:020-87595523 E-mail:chengying_827@163.com.

射频消融对鼠肝肿瘤血管内皮生长因子及其受体Flk-1表达的影响

孔文韬, 陈骏, 仇毓东, 张炜炜

孔文韬, 陈骏, 仇毓东, 张炜炜, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com
电话: 025-83304616-11602
收稿日期: 2007-04-14 接受日期: 2007-04-28

Influence of radiofrequency ablation on vascular endothelial growth factor and fetal liver kinase 1 in transplanted liver cancer in rats

Wen-Tao Kong, Jun Chen, Yu-Dong Qiu, Wei-Wei Zhang

Wen-Tao Kong, Jun Chen, Yu-Dong Qiu, Wei-Wei Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Drumtower Hospital, the Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Drumtower Hospital, the Medical College of Nanjing University, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com
Received: 2007-04-14 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To study the influence of radiofrequency ablation (RFA) on vascular endothelial growth factor (VEGF) and fetal liver kinase 1 (Flk-1) in a rat transplanted liver cancer model.

METHODS: A rat liver cancer model was established by injecting Walker carcinosarcoma 256 tumor cells into the livers of the rats. After tumor growth had proceeded for about 9 or 10 days, we surgically treated the rats with RFA. Rats were randomly divided into control and RFA groups. After treatment, rats were randomly divided into two groups, and were killed after 1 or 3 days to obtain liver specimens. Expression of VEGF and Flk-1 was observed in the tumor and adjacent tissues by an immunohistochemical Elivision method at 1 and 3 days after RFA.

RESULTS: The expression of VEGF in adjacent

tissues was higher ($P = 0.014$, and $P = 0.013$) and the expression of VEGF in remnant tumors was lower at 1 and 3 days after RFA than that before RFA ($P = 0.015$, $P = 0.013$). The expression of Flk-1 1 day after RFA in the adjacent tissues was higher than that in controls ($P = 0.008$).

CONCLUSION: RFA can repress the expression of VEGF in carcinoma near areas of necrosis, but this treatment may also induce expression of VEGF in adjacent tissues. The effect of RFA on Flk-1 needs further investigation.

Key Words: Radiofrequency; Liver cancer; Rat; Vascular endothelial growth factor; Fetal liver kinase 1

Kong WT, Chen J, Qiu YD, Zhang WW. Influence of radiofrequency ablation on vascular endothelial growth factor and fetal liver kinase 1 in transplanted liver cancer in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2255-2259

摘要

目的: 探讨射频消融对大鼠肝肿瘤血管内皮生长因子(VEGF)及其受体Flk-1(fetal liver kinase 1)表达的影响。

方法: 采用Walker-256细胞株构建大鼠肝脏种植瘤模型, 肿瘤接种后9-10 d开腹, 分为对照组与射频组。治疗后射频组再随机平均分为2组, 分别于1, 3 d处死大鼠取肝脏标本。采用Elivision法对本免疫组化染色, 根据VEGF与Flk-1在胞质内染色强度与阳性细胞数, 对不同分组的肿瘤组织、癌旁组织进行半定量评分。

结果: 射频后1, 3 d组癌旁和残留组织VEGF表达与治疗前癌旁($P = 0.014$, $P = 0.013$)和肿瘤组织相比($P = 0.015$, $P = 0.013$), 有统计学差异, 癌旁组织VEGF表达高于治疗前, 而残留组织低于治疗前。射频后1 d Flk-1表达与治疗前癌旁组织相比有统计学差异($P = 0.008$), 较治疗前增加。

结论: 射频对残余肿瘤细胞VEGF表达有抑

■背景资料

射频消融是肝癌的一种重要治疗手段, 该技术具有创伤性小, 可重复性强的优点, 在临床上应用日益广泛。由于肝细胞性肝癌是富血供肿瘤, 血管新生对肿瘤的发生与进展有着重要的作用, 因而, 射频后疗效在很大程度上取决于术后血管新生的变化情况。

■相关报道

射频作为肝癌的一种局部灭活治疗技术,术后肿瘤的血管新生情况与预后有着重要的关联。射频治疗肿瘤的基本机制是利用肿瘤的不耐热性,但对于肿瘤微血管亦有影响。有文献表明,射频可以通过有效的破坏肿瘤微血管,抑制血管新生,减少肿瘤的血液供应,从而降低术后转移复发的几率。但目前尚无射频后癌旁血管新生情况的相关研究报道。

制作用,但可促进癌旁组织的VEGF表达上调。射频对Flk-1的影响有待进一步研究。

关键词: 射频; 肝肿瘤; 大鼠; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体Flk-1

孔文韬, 陈骏, 仇毓东, 张炜炜. 射频消融对鼠肝肿瘤血管内皮生长因子及其受体Flk-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2255-2259

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2255.asp>

0 引言

肝细胞性肝癌是富血供肿瘤,血管新生对肿瘤的发生与进展有着重要的作用。射频后疗效在一定程度上取决于血管新生的变化情况。VEGF是目前被认为参与血管新生过程中最重要的调节因子,通过特异性与其受体Flk-1结合,促进血管新生起始^[1-3]。我们在构建的大鼠肝脏种植瘤射频模型基础上,通过免疫组化染色,观测癌旁组织与残余肿瘤组织内VEGF和Flk-1表达情况,初步探讨射频治疗对局部血管新生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠40只,体质量250±50 g,南京军区总医院动物实验中心提供;Walker256细胞株,中国医学科学院肿瘤医院肿瘤所提供;冷循环射频治疗仪(Cool-tip RF system, CC-1-B型),美国Radionics公司制造;VEGF与Flk-1 Ab均购自Santa Cruz公司。采用直接注射法制作大鼠肝脏种植瘤模型^[4],接种肿瘤后9-10 d开腹,将肿瘤大小接近的大鼠随机分为对照组与射频组,对照组不做任何治疗,取肝脏标本。射频组在直视下将射频针插入肿瘤中心部位,手动调节功率为10 w,时间设定5 min,可形成约1 cm左右的毁损灶^[5]。治疗后随机平均分为2组,分别于术后1, 3 d处死取肝脏标本。取出肝脏后常规中性甲醛固定,石蜡切片4 μm, HE染色,光镜下形态学观察。

1.2 方法 石蜡切片于二甲苯中脱腊,梯度酒精至水; 30 mL/L H₂O₂室温孵育10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性; 100 mL/L山羊血清封闭,室温孵育15 min; 滴加适当比例稀释(1:100)的VEGF与Flk-1的抗体,4℃过夜; 滴加二抗,37℃孵育20 min; DAB显色,显微镜下观察,控制反应时间; 自来水充分冲洗,苏木素衬染,脱水,封片。以上步骤间均用PBS冲洗3次,每次1 min。每张切片在镜下对肿瘤组织(包括对照组与射频后

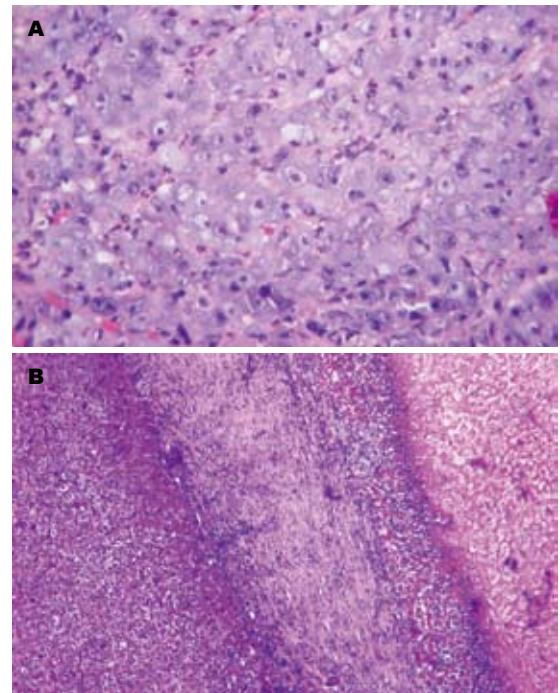


图1 射频治疗大鼠肿瘤组织学。A: 肝脏种植瘤治疗前(HE × 200); B: 治疗后坏死灶周边炎症反应带(HE × 40)。

残存肿瘤细胞),癌旁组织(邻近肿瘤细胞或毁损灶周边1 cm的正常肝组织)进行免疫组化评分,在细胞质中出现棕黄色或褐色颗粒为阳性细胞。VEGF与Flk-1的表达根据染色强度与阳性细胞数分为4级:阴性(-):无阳性细胞;弱阳性(+):细胞轻度着色染成淡黄色,阳性细胞数<25%;阳性(++):细胞着色成黄色,阳性细胞数25%-50%;强阳性(+++):细胞明显着色,呈棕黄色,阳性细胞数>50%。

统计学处理 采用SPSS11.5统计学软件进行分析,VEGF与Flk-1的表达差异采用秩和检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 射频后病理表现 对照组肿瘤细胞呈巢状、片状分布,排列紧密,杂乱。细胞形态不规则,胞质轻度嗜碱性,核大深染,核仁明显(图1A)。治疗后镜下呈现3个区带(图1B),原肿瘤区域经射频后变为大片坏死组织,表现为凝固性坏死。周边可见界限清晰的炎症反应带,其中可见中性粒细胞、淋巴细胞以及成纤维细胞聚集。炎症细胞的外围可见一层明显肉芽组织,其内有多量新生的毛细血管。毁损灶周围的肝组织结构正常,但肝细胞可发生变性,以水肿,胞质疏松化常见。在治疗不充分的标本中毁损区周边或内部可见残留的肿瘤细胞。

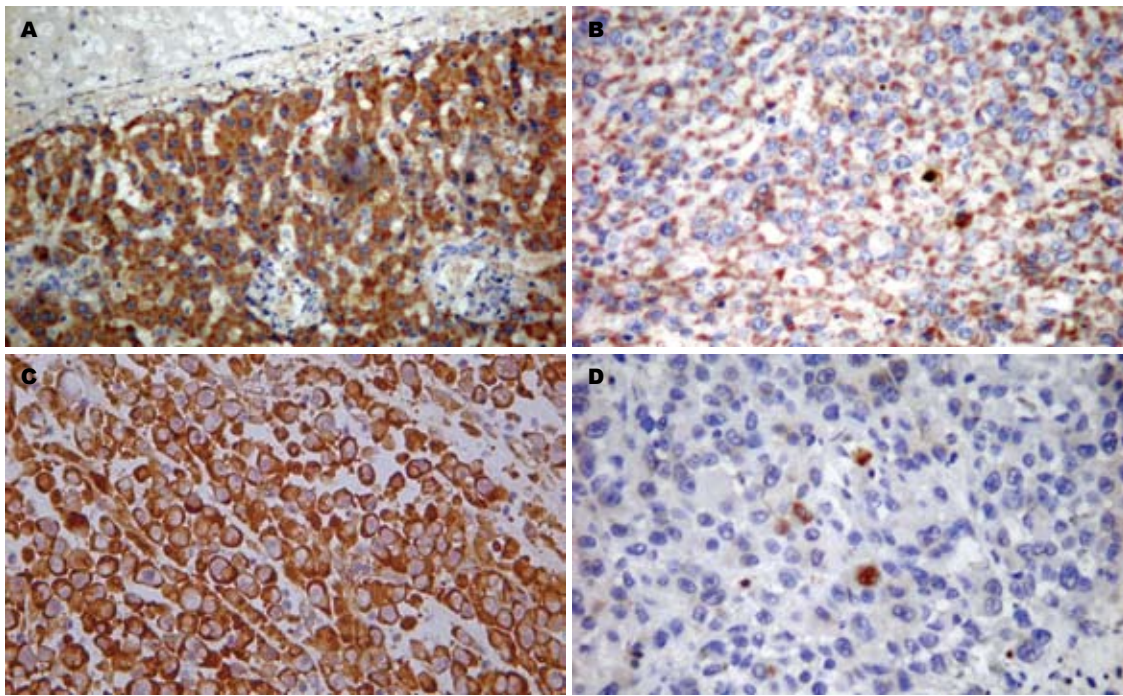


图 2 射频前后VEGF, Flk-1表达(SABC/SP × 200). A: 射频后癌旁组织VEGF高表达; B: 射频后癌旁组织Flk-1高表达; C: 射频前肿瘤细胞VEGF表达强阳性; D: 射频后残存肿瘤细胞VEGF表达弱阳性.

■ 创新盘点

血管内皮生长因子(VEGF)是目前被认为参与血管新生过程中最重要的调节因子,在肿瘤的生长、发展和转移过程中起重要作用,VEGF由肿瘤细胞产生并分泌,通过特异性与其受体Flk-1结合,促进血管新生起始.本研究在构建的大鼠肝脏种植瘤射频模型基础上,通过免疫组化方法,观测癌旁组织与残余肿瘤组织内VEGF和Flk-1表达情况,初步探讨射频治疗对局部血管新生的影响.

2.2 射频后癌旁组织VEGF及Flk-1的表达变化

(表1) 射频后1 d组癌旁组织内VEGF表达弱阳性(+)1例,阳性(++)2例,强阳性(+++)9例,Flk-1表达阳性(++)10例,强阳性(+++)2例,与治疗前癌旁组织相比,两者的表达有统计学差异(P 值分别为0.014, 0.008).射频后1 d组癌旁组织VEGF及其受体Flk-1的表达高于对照组(图2A-B).射频后3 d组癌旁组织内VEGF表达弱阳性(+)1例,阳性(++)5例,强阳性(+++)6例,与治疗前癌旁组织相比有统计学差异($P = 0.013$); Flk-1表达弱阳性(+)5例,阳性(++)5例,强阳性(+++)2例,与治疗前癌旁组织相比,表达无统计学差异($P = 0.545$).

2.3 射频后残存肿瘤细胞的VEGF及Flk-1的表达变化(表1)

镜下观察,射频后1 d组有9张存在残余肿瘤细胞(75%), VEGF的表达阴性(-)2例,弱阳性(+)6例,阳性(++)1例; 3 d组有4张存在残余肿瘤细胞(33%), VEGF的表达阴性(-)2例,弱阳性(+)2例.与治疗前肿瘤组织相比,两者的表达有统计学差异(P 值分别为0.015, 0.013).射频后残存肿瘤细胞的VEGF表达低于对照组(图2C-D).射频后1 d组残存肿瘤组织Flk-1的表达阴性(-)1例,弱阳性(+)3例,阳性(++)5例; 3 d组Flk-1表达阴性(-)1例,阳性(++)3例,与治疗前肿瘤组织相比,表达无统计学差异(P 值分别为0.874, 0.634).

3 讨论

肿瘤的生长与转移依赖于血管新生,根据血管新生平衡开关学说^[6-7],在肿瘤生长的过程中,肿瘤中心缺氧,导致缺氧诱导因子的表达,从而改变了血管新生促进因子与抑制因子的平衡,使其向促进血管新生方向发展. VEGF是其中一种重要的血管新生促进因子^[8]. VEGF由肿瘤细胞产生并分泌,作用于表达其受体的内皮细胞,具有增加微血管通透性、促进不同来源的内皮细胞分裂增殖和血管构建、促使内皮细胞迁移等多种作用,在肿瘤的生长、发展和转移过程中起重要作用^[9]. VEGF主要通过两种细胞表面的酪氨酸激酶受体起作用,也就是Flt-1 (VEGFR-1)与KDR/Flk-1(调节血管新生主要是通过Flk-1).这些受体,尤其是Flk-1在肿瘤血管的内皮细胞上都有表达. VEGF与相应受体结合后,发生二聚作用并激活酪氨酸激酶,然后受体发生自身磷酸化,在该部位结合并激活其下游的配体诱导一系列信号转导机制,从而发挥生物学效应.

射频作为肝癌的一种局部灭活治疗技术,术后肿瘤的血管新生情况与预后有着重要的关联.射频治疗肿瘤的基本机制是利用肿瘤的不耐热性,但对于肿瘤微血管亦有影响.有文献表明,射频可以通过有效的破坏肿瘤微血管,抑制血管新生,减少肿瘤的血液供应,从而降低术后

■应用要点

射频消融后,邻近毁损灶的残存肿瘤细胞由于热效应的影响,以及炎症免疫反应等因素,肿瘤细胞的VEGF表达受到抑制。但射频对癌旁组织的VEGF表达有一定促进作用,提示射频消融后的乏氧区对肿瘤的血管新生有一定的促进作用,这可能是射频消融术后肿瘤局部复发的机制之一。文章的研究结果有助于深入理解射频治疗的机制,进一步改进治疗策略,从而降低射频术后转移复发的几率。

表 1 射频组与对照组VEGF, Flk-1表达情况(n)

分组	n	VEGF表达情况分级				Flk-1表达情况分级			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
对照组(A组)									
肿瘤组织	12	0	5	6	1	1	5	6	0
癌旁组织	12	0	5	4	3	1	4	7	0
射频后1 d(B组)									
残存肿瘤组织	9	2	6	1	0	1	3	5	0
癌旁组织	12	0	1	2	9	0	0	10	2
射频后3 d(C组)									
残存肿瘤组织	4	2	2	0	0	1	0	3	0
癌旁组织	12	0	1	5	6	0	5	5	2

转移复发的几率^[10]。但目前尚无射频后癌旁血管新生情况的相关研究报道。在我们的实验中构建了大鼠肝脏种植瘤的射频治疗模型,采用Walker256瘤株构建的肝脏种植瘤是一种较好的肝癌研究模型,该肿瘤生长迅速,属富血供肿瘤。可以近似模拟肝癌的血供特点,有研究发现,该肿瘤在生长过程中具有诱导新生血管的能力^[11],适宜于进行有关血管新生方面的研究。

本研究结果显示,射频后1 d组有75%存在残余肿瘤细胞,3 d组有33%存在残余肿瘤细胞。通过对残余肿瘤细胞VEGF表达的统计学分析,显示其表达明显低于对照组。小动物模型中,射频时对毁损范围不易把握是导致肿瘤残留的主要原因。而残留肿瘤细胞中VEGF的表达明显下调,其机制考虑是热效应导致肿瘤细胞坏死或失活,或蛋白的变性与分解。也可能是大量坏死组织诱导炎症免疫反应,从而间接抑制了肿瘤VEGF的表达^[12]。射频术后的肿瘤残余一直是影响治疗效果的重要因素,尤其对于较大体积的肝癌或多发肝癌在所难免^[13-14]。因此,残余肿瘤细胞的生物学特性变化值得进一步研究与探讨。我们的研究显示对于坏死区内或邻近坏死区的残余肿瘤细胞,射频对VEGF的表达有一定抑制作用。

与上述现象相反的是,射频术后癌旁组织VEGF与Flk-1的表达均显著高于对照组。通过光镜观察,我们发现在坏死灶周围存在炎症反应带,可见多量毛细血管和炎症细胞聚集。血管新生的原因可能有2个:(1)射频术后的坏死与肿瘤自发性坏死不同。后者主要见于病灶中心,炎症反应不明显。而射频后坏死灶周边可出现炎症反应带。炎症细胞可以释放促血管新生因子,因而VEGF等可以是炎症细胞释放的;(2)射频后组

织坏死,局部缺氧,产生缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)^[15],可能对血管新生产生正向促进作用,从而使VEGF表达上调。

总之,射频对于邻近毁损灶的残余肿瘤细胞的VEGF表达有抑制作用。而射频后癌旁组织的VEGF与Flk-1表达有上调现象。癌旁新生血管是否对残留肿瘤组织的生长有促进作用,有待进一步研究。

4 参考文献

- Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 307-319
- Tanaka S, Arai S. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 82-89
- Zacharoulis D, Hatzitheofilou C, Athanasiou E, Zacharoulis S. Antiangiogenic strategies in hepatocellular carcinoma: current status. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5: 645-656
- 邵成伟, 王培军, 田建明, 张火俊, 王敏杰, 曾浩. 直接注射法制作大鼠肝癌模型. *中国医学影像技术* 2002; 18: 731-732
- 孔文韬, 陈骏, 仇毓东, 张炜炜. 大鼠肝脏种植瘤冷循环射频治疗病理形态学改变及临床意义. *中华实验外科杂志* 2007; 24: 35-36
- Sugimachi K, Tanaka S, Terashi T, Taguchi K, Rikimaru T, Sugimachi K. The mechanisms of angiogenesis in hepatocellular carcinoma: angiogenic switch during tumor progression. *Surgery* 2002; 131: S135-141
- Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR, Sugimachi K. Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol* 2003; 38 Suppl 15: 93-97
- Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 864-880
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Sansonno D, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 437-444
- 郭晓华, 沈世强. 射频消融对兔肝癌肿瘤微血管密度及血管内皮细胞生长因子的影响. *腹部外科* 2004; 17:

365-367

11 彭林, 区金锐, 王卫东, 孙建, 简志祥. 原位种植肝癌新生血管的检测及血管内皮细胞生长因子mRNA的表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 717-718

12 张盟辉, 孔宪炳, 王巧玲, 阴红卫, 轩诗进. 射频消融联合亚硝酸局部治疗对兔肝VX2肿瘤MVD和VEGF表达的影响. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 19-22

13 Sakr AA, Saleh AA, Moeaty AA, Moeaty AA. The combined effect of radiofrequency and ethanol ablation in the management of large hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol* 2005; 54: 418-425

14 Kim YS, Rhim H, Cho OK, Koh BH, Kim Y. Intrahepatic recurrence after percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: analysis of the pattern and risk factors. *Eur J Radiol* 2006; 59: 432-441

15 Myung SJ, Yoon JH. Hypoxia in hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2007; 13: 9-19

■同行评价
 本文通过研究射频消融对鼠肝肿瘤血管内皮生长因子及其受体Flk-1表达的影响, 得出了一些有意义的结果, 选题具有一定先进性, 文字流畅, 研究方案较合理, 有一定的参考价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮)

本刊讯 2007年国家级继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办, 由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办, 特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示, 欢迎消化内镜工作者投稿参会, 优秀稿件可优先发表. 回执或投稿请于2007-09月底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心, 刘希双收, 邮编: 266003, E-mail: liuxishuang1@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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.

腹腔镜胆囊切除术中粗大胆囊管的处理

宿砚明, 张宗明, 钟华, 蒋艺, 郭金星

■背景资料

随着LC的广泛开展, 适应症逐渐放宽, 但胆瘘等并发症也时有发生, 特别是在结石嵌顿、胆囊管扩张、胆囊萎缩、Mirrizz综合征等复杂情况时, 更易导致严重并发症。探讨特殊情况下的LC的处理方法, 有重要的临床实际意义。

宿砚明, 张宗明, 钟华, 蒋艺, 郭金星, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科 北京市 100016

通讯作者: 宿砚明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科.

suyanming62@sohu.com

电话: 010-64372362 传真: 010-64361322

收稿日期: 2007-04-24 接受日期: 2007-05-11

Management of an enlarged cystic duct in laparoscopic cholecystectomy

Yan-Ming Su, Zong-Ming Zhang, Hua Zhong, Yi Jiang, Jin-Xing Guo

Yan-Ming Su, Zong-Ming Zhang, Hua Zhong, Yi Jiang, Jin-Xing Guo, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Correspondence to: Yan-Ming Su, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, No. 6, Block 1, Jiuxian Bridge, Chaoyang District, Beijing 100016, China. suyanming62@sohu.com

Received: 2007-04-24 Accepted: 2007-05-11

Abstract

AIM: To investigate the management of an enlarged cystic duct in laparoscopic cholecystectomy.

METHODS: From November 1995 to December 2004, 46 patients with enlarged cystic ducts underwent laparoscopic cholecystectomy in our hospital. The diameters of the cystic ducts were 0.4-0.6 cm in 21 cases, 0.6-0.8 cm in 14, and > 0.8 cm in 11. Five treatment methods were undertaken: overlapped clipping ($n = 12$), large-sized titanium clipping ($n = 5$), endoloop ($n = 1$), clamping after ligation ($n = 22$), and ligation ($n = 6$).

RESULTS: All patients were discharged from hospital without complications.

CONCLUSION: Suitable methods need to be implemented to manage enlarged cystic ducts in laparoscopic cholecystectomy. A ligation method may be the first choice if the operator is skilled in ligation technology.

■研发前沿

胆漏是LC术后的常见并发症, 如何有效地预防, 一直是困扰胆道外科的棘手问题。

Key Words: Laparoscopic cholecystectomy; Cystic duct; Ligation method

Su YM, Zhang ZM, Zhong H, Jiang Y, Guo JX. Management of an enlarged cystic duct in laparoscopic cholecystectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2260-2262

摘要

目的: 探讨腹腔镜胆囊切除术(LC)中粗大胆囊管的处理方法。

方法: 1995-10/2004-12施行LC 640例, 发现胆囊管明显增粗46例, 其中胆囊管直径为0.4-0.6 cm, 0.6-0.8 cm, 0.8 cm以上的例数分别为21, 14和11例。分别采用阶梯施夹法(12例)、大号钛夹法(5例)、圈套器法(1例)、结扎后再施夹法(22例)和结扎法(6例)处理增粗的胆囊管。

结果: 全组46例患者手术顺利, 术后无胆漏及其他并发症发生。

结论: 在LC中, 可选用阶梯施夹法、大号钛夹法、圈套器法、结扎后再施夹法和结扎法等牢固处理增粗的胆囊管。如果结扎技术熟练, 结扎法可适用于各种情况, 可做为首选。

关键词: 腹腔镜胆囊切除术; 胆囊管; 结扎法

宿砚明, 张宗明, 钟华, 蒋艺, 郭金星. 腹腔镜胆囊切除术中粗大胆囊管的处理. *世界华人消化杂志* 2007;15(20):2260-2262

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2260.asp>

0 引言

在腹腔镜胆囊切除术(Laparoscopic cholecystectomy, LC)中, 一般使用2或3枚平行的中号钛夹夹闭胆囊管残端, 这对大多数病例是足够的。但在胆囊管增粗(直径>0.4 cm)的情况下^[1], 胆囊管的处理存在一定难度。现就胆囊管增粗的处理方法加以探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 1995-10/2004-12施行LC 640例, 发现

胆囊管明显增粗46例, 男10例, 女36例. 年龄32-71(平均52.3)岁. 胆囊炎胆囊结石43例, 胆囊息肉3例. 有黄疸史2例, 胰腺炎病史2例, 入院体检发现黄疸2例. B超发现胆总管结石2例, 胆总管增粗7例(其中1例合并胆总管结石).

1.2 方法 详细询问病史、体检, 并给予肝功能检测及肝、胆、胰B超检查等. 有黄疸史或胆红素增高者, B超发现胆总管增粗或胆囊管内结石者, 均行内镜下逆行胰胆管造影术(ERCP), 证实有胆总管结石者行内镜下奥狄氏括约肌切开(EST)取石. 在腹腔镜胆囊切除术中仔细解剖Calot三角, 当分离出胆囊管后, 根据胆囊管直径大小分别采用采用阶梯施夹法12例(胆囊管直径均为0.4-0.6 cm), 大号钛夹法5例(胆囊管直径均为0.4-0.6 cm), 圈套器法1例(胆囊管直径>0.8 cm), 结扎法6例(胆囊管直径0.4-0.6 cm 4例, 0.6-0.8 cm 2例)、结扎后施夹法22例(胆囊管直径0.6-0.8 cm 12例, >0.8 cm 10例). 其中7例胆囊管壁水肿、增厚明显者于小网膜孔处置腹腔引流管.

2 结果

全组46例患者手术顺利, 术后无胆漏及其他并发症发生, 均治愈出院.

3 讨论

若有以下情况要考虑胆囊管增粗可能: (1)胆囊颈部结石嵌顿者. 因结石嵌顿后引起胆囊颈部炎症, 导致胆囊管壁水肿、增厚, 管径增粗. 本组胆囊管直径>0.8 cm的5例患者中, 有4例属此类情况; (2)既往有黄疸史, 入院体检发现黄疸, B超发现胆总管增粗及胆总管结石者. 胆总管原发结石可致胆总管下端梗阻, 胆道内部压力增高, 胆汁自胆囊入胆总管排泄不畅, 可能导致胆囊管增粗. 胆总管继发结石, 若有胆囊结石自胆囊管入胆总管, 可引起胆囊管被动性扩张增粗. 当然, 不排除胆囊管原本就较粗, 有小结石由增粗胆囊管排入胆总管的可能. 磁共振胰胆管造影(MRCP), ERCP对术前判断及治疗很有意义. 正确解剖Calot三角, 仔细辨认胆囊管、胆囊动脉及胆总管是LC成功的关键, 其中胆囊壶腹部与胆囊管移行部正确辨认最为重要, 将胆总管或肝总管误认为胆囊管是最常见的损伤^[2], 尤其是在胆囊管增粗的病例中, Calot三角往往存在黏连水肿, 更要注意防止损伤胆总管或肝总管. 在分离胆囊管时, 应向外牵拉或提起胆囊壶

腹部, 充分暴露胆囊前后三角, 使用30度镜视野更佳; 一定要找准间隙然后用分离钳或直角钳进行分离, 防止盲目硬性插入. 当发现解剖出的“胆囊管”增粗时, 不要有先入为主的观点, 准备施夹前, 避免用力牵拉胆囊, 尽量要认清“三管”关系; 有时Calot三角黏连水肿明显, 胆总管、肝总管难以解剖清楚, 为避免将胆总管误认为增粗的胆囊管, 可采用V形分离法^[3]适当扩大胆囊前、后三角的分离范围, 明确解剖出的胆囊管未进入肝脏, 并与胆囊壶腹部相延续.

在胆囊管近端钳夹两枚中号钛夹(强生公司LT300), 远端钳夹一枚中号钛夹, 在他们之间剪开部分胆囊管, 而后在剩余胆囊管的近端部分平行钳夹一枚中号钛夹, 再完全剪断胆囊管. 此法的优点是全部使用中号钛夹, 无需更换器械. 缺点是若胆囊管壁较厚钛夹可能移位或脱落, 且对于增粗明显的胆囊管, 由于中号钛夹长度相对较短, 此方法难以满意夹闭胆囊管残端, 宜采用下面介绍的方法.

在胆囊管近端、远端各钳夹一枚大号钛夹(强生公司LT400), 在他们之间剪断胆囊管. 此法的优点是操作较为方便, 但需要备有大号施夹钳及大号钛夹. 如胆囊管增粗明显, 也可将大号钛夹法与阶梯施夹法结合使用^[4]. 在胆囊管近端、远端各钳夹一枚大号钛夹, 在他们之间剪断部分胆囊管, 而后在剩余胆囊管的近端部分在钳夹一枚中号钛夹, 再完全剪断胆囊管, 可视作对这种方法的补充. 当胆囊管明显增粗, 特别是水肿增厚明显时, 宜采用圈套器结扎^[5]. 我们使用的是成品圈套器, 只需将圈套器由剑突下套管伸进腹腔, 并从胆囊底部套至胆囊管近端, 再于体外收紧圈套器, 剪断胆囊管即可, 我们体会这种方法比较便捷、牢靠. 但操作时一般需要逆行剥离胆囊, 最好能先将胆囊动脉、胆囊管解剖出来^[6], 并夹闭胆囊动脉, 这样不但可以有效地防止误伤胆总管, 而且能明显减少将胆囊由胆囊床剥离时的出血. 但有时由于胆囊三角炎症明显, 解剖不清, 较难分离夹闭胆囊动脉, 术中逆行切除胆囊时可能出血较多, 这就需要术者有较为熟练的技术与配合. 结扎可采用腹腔内打结, 也可采用体外打结推入法, 前者需要专项练习才能熟练掌握, 后者则较易掌握. 结扎法的优点如下: (1)结扎法可有效扎紧增粗的胆囊管, 避免钛夹夹闭不全的弊端; 尤其是当胆囊动脉与胆囊管并行且黏连致密不易分离时, 可将其一并结扎, 避免损伤; (2)当胆囊管短而粗时,

■创新盘点

本文对于LC术中胆囊管增粗情况的处理方法合理、效果满意, 结扎法有更多的优越性, 有可操作性和临床价值.

■应用要点

在临床实际工作中, 胆囊管的解剖和处理方法是LC手术成败的关键, 本文介绍的方法, 实用性强, 结扎法处理胆囊管术后体内不留金属异物、且经济可靠.

同行评价

本文通过介绍腹腔镜胆囊切除术中粗大胆囊管的处理体会,为临床医生处理类似情况提供了很好的经验总结,实用价值较好。

结扎法更具优势,占位小且不易松脱;(3)当胆囊管开口位于下腔静脉前方或门静脉左前方时,如使用金属钛夹处理时,钛夹尖端有可能伤及静脉壁,而结扎法则可避免此类风险;(4)结扎法能避免术后金属夹对MRI, CT, B超影像检查的干扰或误诊;(5)与钛夹尤其与可吸收蛋白夹相比价廉物美。

当胆囊管粗,钛夹不能将其完全夹闭时,可以将结扎法与钛夹法结合使用。方法是先结扎胆囊管,使之缩窄变细,然后再上钛夹,此法多可将增粗的胆囊管完全夹闭。对于因炎性水肿变脆的胆囊管,施夹时如用力过度则易线形割裂伤,如用力不够则会在水肿消退后钛夹脱落,为术后胆漏发生埋下隐患。结扎为环形缩窄,应力均匀,术后体液将结扎线水化后更为牢靠。结扎后在线结稍远处再施夹,更增加了保险系数。

有报道17%-25%的LC后综合征由胆囊管残余结石引起^[7]。在术中若发现胆囊管增粗,特别是局部膨大时,可用分离钳轻夹胆囊管,若无结石,胆囊管可能被夹扁;当有小结石时,会有钳夹硬物感。如果结石近段胆囊管足够长,可先用钛夹夹闭近端胆囊管而后切断之,再将结石自胆囊管残端挤出。如果结石近端胆囊管较短,无法于胆囊管近端施加钛夹,可尝试结扎,或先用分离钳从胆囊管近端将结石逐渐向胆囊方向挤压,待结石近段胆囊管足够长时再施加钛夹,但要防止不慎将结石挤入胆总管。若较大结石嵌顿于胆囊管,最好能先将结石近段胆囊管钛夹夹闭或结扎,再将结石处胆囊管横行或T形剪开,取出结石。

胆管损伤是LC严重而常见的并发症之一,占LC严重并发症的34%,胆管损伤的手术病死率是6%^[8]。因此,当胆囊萎缩,胆囊管增粗且极短,纤维闭塞,Calot三角致密黏连,结石嵌顿疑有Mirizzi综合征时,一味强行分离,必然增加胆管损伤的机会,可采用剖开胆囊取出结石行胆囊大部切除,于胆囊颈部胆囊腔内寻找胆囊管开口并缝合关闭,避免损伤肝外胆管。对于LC所致胆管损伤强调早发现早处理,应根据损伤时间、部位、程度选择合适术式^[9-10]。根据术中

情况作出正确判断,结合术者的技术和经验,必要时及时中转开腹手术,避免脏器损伤。适时的中转不是LC失败,而是针对不同情况采取的不同处理方式,目的是安全完成手术^[11]。

对于胆囊管增粗的病例,特别是胆囊管壁水肿增厚明显时,腹腔镜胆囊切除术后钛夹、结扎线或圈套器均可能移位或脱落,造成胆漏;而且有时因胆囊动脉与胆囊管黏连而一起施夹时,术后出血的可能性也会增加。所以我们认为可根据手术情况放置腹腔引流管。采用双腔瓦楞管置于小网膜孔处,一方面,有助于术后观察有无出血、胆漏,便于及时处理;另一方面,即使发生了胆漏,腹腔引流对于治疗也大有帮助,部分胆漏病例可通过腹腔引流、适当抗炎、加强营养支持,必要时结合ERCP+ENBD(经内镜鼻胆管引流),也可能治愈。

4 参考文献

- 1 黄志强. 现代腹腔镜外科学. 北京: 人民军医出版社, 1994: 112-123
- 2 李立波, 李君达, 蔡秀军, 魏琪, 蔡小燕. 影响腹腔镜胆囊切除术胆道损伤修复效果的因素. 中华普通外科杂志 2003; 18: 263-265
- 3 王秋生. LC术中预防胆管损伤的手术技巧. 腹部外科 1999; 12: 7-8
- 4 Hida Y, Okuyama S, Iizuka M, Katoh H. New technique to ligate enlarged cystic duct using a clip applier during laparoscopy: report of a case. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 926-927
- 5 Nowzaradan Y, Meador J, Westmoreland J. Laparoscopic management of enlarged cystic duct. *Surg Laparosc Endosc* 1992; 2: 323-326
- 6 Kato K, Matsuda M, Onodera K, Kobayashi T, Kasai S, Mito M. Laparoscopic cholecystectomy from fundus downward. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4: 373-374
- 7 Kockerling F, Schneider C, Reymond MA, Hohenberger W. Extraction of cystic duct occlusion calculus in laparoscopic cholecystectomy. *Zentralbl Chir* 1997; 122: 295-298
- 8 黄志强. 黄志强胆道外科. 济南: 山东科学技术出版社, 1996: 415-416
- 9 石景森, 任宏. 胆管损伤发现时间因素与处理的关系. 肝胆胰外科杂志 2004; 16: 83-84
- 10 朱黎庆, 王钦尧, 张敏, 曹伟家, 曹亦军, 黄毅. 肝外胆管损伤即时修复新技术的应用. 肝胆胰外科杂志 2005; 17: 47-49, 52
- 11 吴建斌, 张明金. 腹腔镜胆囊切除术并发症及其对策. 中华实用外科杂志 2005; 25: 99-100

编辑 何燕 电编 张敏

胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达改变及意义

王立峰, 王瑞芬, 郝兆星, 王正彩

王立峰, 王瑞芬, 王正彩, 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科 黑龙江省哈尔滨市 150001
郝兆星, 黑龙江省铁力市人民医院病理科 黑龙江省铁力市 152500
王立峰, 副教授, 副主任医师, 主要研究病理学.
黑龙江省科技攻关计划项目, No. GB06C40203
黑龙江省教育厅科学技术研究项目, No. 10551205
通讯作者: 王立峰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科. lfwy@public.hr.hl.cn
电话: 0451-53604114
收稿日期: 2007-03-17 接受日期: 2007-04-13

Changes in protein expression and significance of tumor-associated fibroblasts in gastric cancer

Li-Feng Wang, Rui-Fen Wang, Zhao-Xing Hao, Zheng-Cai Wang

Li-Feng Wang, Rui-Fen Wang, Zheng-Cai Wang, Department of Pathology, the First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Zhao-Xing Hao, Department of Pathology, the People's Hospital of Tieli Municipal, Tieli 152500, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Heilongjiang Province, No. GB06C40203 and Project in Science and Technology of Department of Education of Heilongjiang Province, No. 10551205

Correspondence to: Dr. Li-Feng Wang, Department of Pathology, the First Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. lfwy@public.hr.hl.cn
Received: 2007-03-17 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To study changes in protein expression in tumor-associated fibroblasts in gastric cancer and their relationship with tumor invasion.

METHODS: We used immunohistochemistry to detect expression of CD34, smooth muscle actin (SMA) and transforming growth factor (TGF)- β 1 in stromal fibroblasts of 75 gastric cancer and 10 normal gastric tissues, and analyzed its mechanism and relationship with clinical characteristics.

RESULTS: There were statistically significant differences in expression of CD34, SMA and TGF- β 1 between gastric cancer and normal gas-

tric tissues (8.0% vs 80.0%, $\chi^2 = 28.220$; 90.7% vs 30.0%, $\chi^2 = 19.401$; 89.3% vs 30.0%, $\chi^2 = 17.486$; $P < 0.01$, respectively). Expression of TGF- β 1 and SMA was related to depth of tumor, clinical stage and lymph node metastasis (both $P < 0.05$). SMA was positively associated with TGF- β 1 ($r = 0.555$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The loss of CD34 and the acquisition of SMA in tumor-associated fibroblasts are associated with gastric cancer invasion, and TGF- β 1 may promote this phenotypic alteration.

Key Words: Gastric cancer; Tumor-associated fibroblast; CD34; Smooth muscle actin; Transforming growth factor beta1

Wang LF, Wang RF, Hao ZX, Wang ZC. Changes in protein expression and significance of tumor-associated fibroblasts in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2263-2267

摘要

目的: 探讨胃癌中肿瘤相关纤维母细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)蛋白表达的改变及与胃癌侵袭转移的关系。

方法: 应用免疫组织化学方法检测75例胃癌组织及10例正常胃黏膜组织中纤维母细胞CD34, 平滑肌肌动蛋白(SMA)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的表达, 分析蛋白表达改变的机制及与胃癌临床病理特征的关系。

结果: 胃癌组织CD34, SMA和TGF- β 1中的阳性表达与正常胃黏膜组织纤维母细胞中的表达(8.0% vs 80.0%, $\chi^2 = 28.220$; 90.7% vs 30.0%, $\chi^2 = 19.401$; 89.3% vs 30.0%, $\chi^2 = 17.486$; 均 $P < 0.01$); SMA和TGF- β 1均与与肿瘤浸润深度、临床分期和淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$), 且两者的表达密切相关($r = 0.555$, $P < 0.05$)。

结论: 胃癌细胞可能通过分泌TGF- β 1作用于间质, 促进CD34(+)纤维母细胞转变为SMA(+)的肌纤维母细胞, 从而发挥其促进肿瘤浸润转移的作用。

背景资料

肿瘤的浸润和转移直接影响着患者的预后, 近年发现肿瘤间质在肿瘤的侵袭和转移过程中起着必不可少的作用。肿瘤相关纤维母细胞作为肿瘤间质的主要细胞类型之一, 在肿瘤发生、发展过程中的作用已成为研究热点, 但胃癌中的相关报道很少。

■ 研究前沿

目前研究发现肿瘤相关纤维母细胞能分泌多种生长因子和酶类,从而促进肿瘤侵袭转移,但纤维母细胞与上皮细胞相互作用是许多因子共同参与的复杂过程,其中许多环节的作用机制还不清楚。

关键词: 胃癌; 肿瘤相关纤维母细胞; CD34; 平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子 β 1

王立峰, 王瑞芬, 郝兆星, 王正彩. 胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达改变及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2263-2267
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2263.asp>

0 引言

过去肿瘤的研究多集中在肿瘤细胞本身的基因结构和表型的改变上,近年来肿瘤间质在肿瘤浸润转移中的作用逐渐被人们重视. 肿瘤组织中被激活的纤维母细胞称为TAF,在肿瘤进展中的作用比想象的更为活跃^[1]. 我们应用免疫组织化学方法检测胃癌TAF蛋白表达改变并探讨其机制及与胃癌侵袭转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/08病理诊断为胃癌的石蜡标本75例,男46例,女29例,年龄35-86(平均59.8)岁. 浸润未超过浆膜层者17例,超过浆膜层者58例; Lauren肠型35例,弥漫型38例,混合型2例; WHO 2000年分级标准,高中分化者23例,低分化和未分化者52例; 临床 I - II 期30例, III-IV期45例; 有淋巴结转移者47例,无淋巴结转移者28例. 同时选取相应的正常胃黏膜组织10例作为对照组。

1.2 方法 应用PV6000通用型二步法进行免疫组织化学染色. 一抗为CD34鼠抗人mAb(1:100), SMA鼠抗人mAb(1:150)均购于北京中杉金桥生物技术有限公司; TGF- β 1兔抗人多克隆抗体(即用型)购于福州迈新生物技术开发有限公司,切片常规脱蜡至水,实验过程严格按照试剂说明书进行. 用已知阳性切片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照. CD34染色以胞质中出现背景清晰的棕色或棕黄色颗粒为阳性,根据阳性细胞所占百分比,阳性细胞数<10%为(-),阳性细胞数 \geq 10%为(+); SMA染色以胞质中出现背景清晰的棕色或棕黄色颗粒为阳性,根据阳性细胞范围,无明显阳性细胞为(-),局灶阳性者为(+),弥漫阳性者为(++); TGF- β 1染色以胞质中出现背景清晰的棕色或棕黄色颗粒为阳性,根据阳性细胞染色强度及阳性细胞百分数的多少进行分级:染色强度(未着色、弱、中、强)及阳性细胞百分数(0%, \leq 25%, 26%-75%, >75%)分别积分为0, 1, 2, 3, 两项积分之和为0-1分者计为(-), 2-4分计为(+), 5-6分计为(++).

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学分析, CD34, SMA和TGF- β 1蛋白在各组间的表

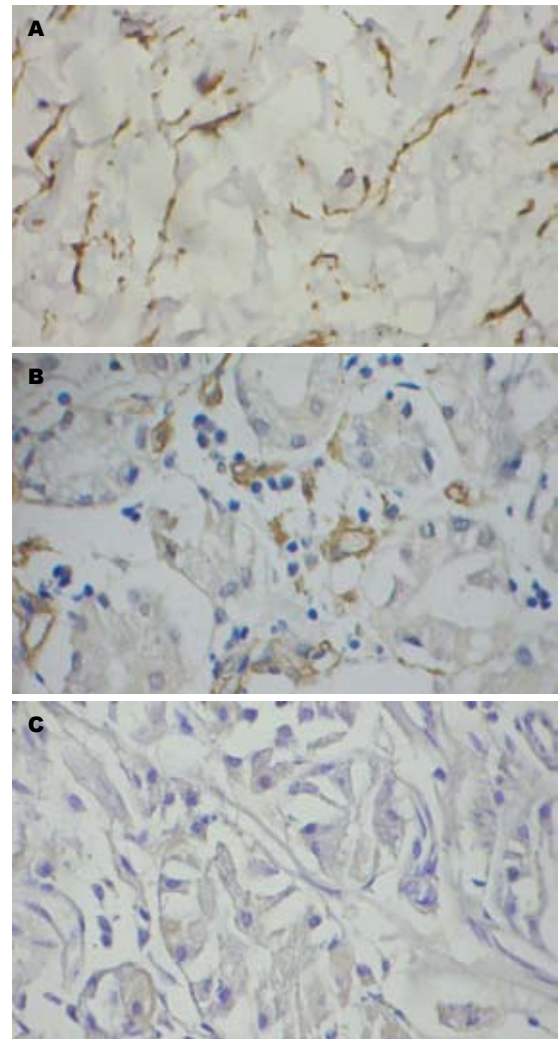


图1 正常胃黏膜组织(SP \times 400). A: CD34(+); B: SMA(-); C: TGF- β (-).

达差异采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法, SMA和TGF- β 1蛋白的相关性分析采用Spearman等级相关分析和 κ 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 CD34, SMA和TGF- β 1的表达 CD34在正常胃黏膜组织纤维母细胞中阳性表达率为80.0%, 主要分布于黏膜下层、固有肌层、浆膜下层和黏膜肌层(而黏膜固有层中未见明显阳性细胞); SMA在正常组织纤维母细胞的阳性表达率为30.0%, TGF- β 1在正常胃黏膜腺体的阳性表达率为30.0%(图1, 表1). 在75例胃癌组织中CD34仅在血管呈阳性表达(图2A-B), 其中仅有6例(8.0%)在癌巢周围的TAF中呈阳性表达, 阳性率显著低于正常胃黏膜组($\chi^2 = 28.220, P < 0.01$); SMA在胃癌TAF中阳性表达率为90.7%, 阳性率明显高于正常组($\chi^2 = 19.401, P < 0.01$), 阳性细胞

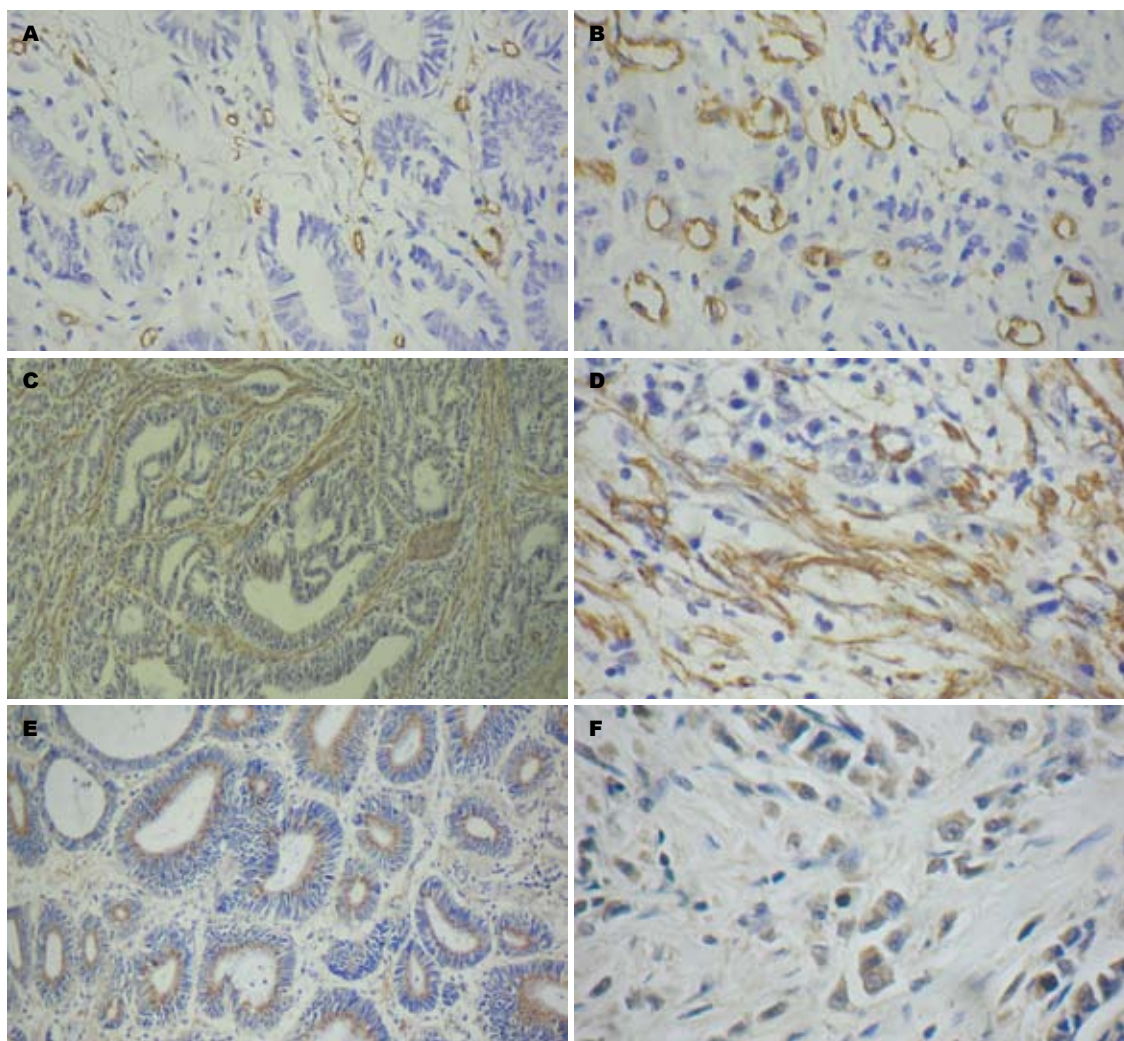


图 2 胃癌组织. A: 肠型CD34(×200); B: 弥漫型CD34(×400); C: 肠型SMA(×100); D: 弥漫型SMA(×400); E: 肠型TGF-β(×100); F: 弥漫型TGF-β(×400).

■创新盘点
 本文通过检测胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达的改变, 分析其可能机制并探讨其与肿瘤细胞侵袭转移的相关性.

呈梭形, 主要位于癌巢周边(图2C-D); 89.3%胃癌呈现出TGF-β1的阳性表达, 阳性率明显高于正常组($\chi^2 = 17.486, P < 0.01$), 阳性细胞主要为肿瘤细胞且位于腺体腔缘(图2E-F), 少量淋巴细胞、血管内皮细胞和纤维母细胞也呈现点状的阳性表达(表1).

2.2 SMA和TGF-β1表达与临床病理的关系
 SMA和TGF-β1的表达与患者年龄、性别、病理分型和组织学分级无关($P > 0.05$), 而与肿瘤浸润深度、临床分期和淋巴结转移有关($P < 0.05$). 随着浸润深度的增加、临床分期的进展和淋巴结转移的出现, 两者表达均增强且差异有统计学意义(表2). 另TGF-β1和SMA的表达呈正相关($r = 0.555$), 根据 $\kappa(0.557)$ 值, 两者的一致性较好(表3).

3 讨论

研究发现, TAF参与肿瘤细胞外基质的合成、

表 1 胃黏膜CD34, SMA和TGF-β1的阳性表达n(%)

分组	n	CD34	SMA	TGF-β1
正常组	10	8(80.0)	3(30.0)	3(30.0)
胃癌组	75	6(8.0) ^b	68(90.7) ^b	67(89.3) ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常组.

沉积和重建等过程, 旁分泌多种生长因子、各种蛋白酶及其抑制剂, 并能诱导肿瘤免疫逃逸, 从而在肿瘤的发生、发展中具有重要作用^[2-3]. TAF是被激活的肿瘤间质纤维母细胞, 其主要特征是能够发生表型改变, 主要表现为纤维母细胞不表达CD34, 而转变成α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin)阳性的肌纤维母细胞, 这种现象可发生于多种侵袭性上皮肿瘤如乳腺癌、宫颈癌、口腔鳞癌、肠癌、肺癌等^[4-9], 然

■应用要点
 肿瘤相关纤维母细胞是非转化二倍体细胞, 与肿瘤细胞相比其基因组较稳定, 因此针对肿瘤相关纤维母细胞的肿瘤基因治疗或免疫治疗将有很好的发展前景. 探讨肿瘤相关纤维母细胞在胃癌侵袭过程中的作用, 期为临床对胃癌靶向向间质的早期合理、有效治疗提供理论基础.

■名词解释

1 弥漫型胃癌:指不形成腺腔结构弥漫散在生长的低分化腺癌及印戒细胞癌。

2 肠型胃癌:指具有管状结构的高-中分化腺癌。

表 2 胃癌SMA和TGF-β1阳性表达与临床病理特征的关系n(%)

临床病理特征	n	SMA		TGF-β1	
		+~+++	++	+~+++	++
男	46	43(93.5)	24(52.2)	43(93.5)	19(41.3)
女	29	25(86.2)	18(62.1)	24(82.8)	19(65.5)
年龄≥50	55	48(87.3)	31(56.4)	49(89.1)	28(50.9)
<50	20	20(100.0)	11(55.0)	18(90.0)	10(50.0)
浸润未超过浆膜	17	13(76.5)	6(35.3)	14(82.4)	4(23.5)
超过浆膜	58	55(94.8) ^a	36(62.1)	53(91.4)	34(58.6) ^a
肠型	35	31(88.6)	18(51.4)	30(85.7)	15(42.9)
弥漫型	38	35(92.1)	23(60.5)	35(92.1)	22(57.9)
混合型	2	2(100.0)	1(50.0)	2(100.0)	1(50.0)
高分化+中分化	23	20(87.0)	13(56.5)	18(78.3)	12(52.2)
低分化+未分化	52	48(92.3)	29(55.8)	49(94.2)	26(50.0)
临床 I - II 期	30	26(86.7)	8(26.7)	25(83.3)	8(26.7)
III - IV 期	45	42(93.3)	34(75.6) ^a	32(93.3)	30(66.7) ^a
淋巴结转移(+)	47	44(93.6)	37(78.7) ^a	44(93.6)	33(70.2) ^a
(-)	28	24(85.7)	5(17.9)	23(82.1)	5(17.9)

^aP<0.05.

而Nakayama *et al*^[10]在弥漫型进展期胃癌间质中发现大量CD34(+)的间质细胞,而弥漫型早期胃癌和肠型胃癌中无CD34(+)的间质细胞.随后的研究又发现,胃癌中CD34(+)间质细胞和α-SMA(+)间质细胞与弥漫型进展期胃癌(浸润至浆膜下)间质形成有关,而纤维母细胞中CD34不表达和α-SMA阳性表达与肠型和实体型胃癌间质的形成有关^[11],因此,胃癌TAF蛋白表达的改变及其与胃癌侵袭转移的关系尚需进一步研究.

研究表明,CD34(+)纤维母细胞具有合成胶原、抗原呈递及T细胞激活功能,在免疫反应和组织修复过程中发挥重要作用^[12-13].SMA(+)肌纤维母细胞能够分泌多种可溶性生长因子,参与合成降解细胞外基质的蛋白酶类,体外实验还证实其参与肿瘤免疫逃逸^[3].本实验结果显示,正常胃黏膜组织纤维母细胞表现为CD34的高表达和SMA的低表达,而75例胃癌组织中CD34仅在血管呈阳性表达,其中仅有6例在癌巢周围的纤维母细胞中呈阳性表达,阳性率显著低于正常胃黏膜组,SMA在胃癌组的阳性表达率明显高于正常组,这说明胃癌中肿瘤相关纤维母细胞缺乏CD34(+)表达,而表现为SMA(+)特征,且这种改变与患者性别、年龄、病理分型和组织学分级无关.随着浸润深度的增加、临床分期的进展和淋巴结转移的出现,纤维母细胞中

表 3 SMA与TGF-β1表达的相关性

SMA	TGF-β1			合计	P	r	κ
	-	+	++				
-	4	2	1	7	<0.05	0.555	0.557
+	1	20	5	26			
++	3	7	32	42			
合计	8	29	38	75			

SMA的表达增强,表明TAF与胃癌的侵袭转移密切相关.

目前,TAF蛋白表达改变的机制尚不清楚,Barth *et al*^[6]推测:(1)肿瘤细胞能够诱导CD34(+)纤维母细胞凋亡,而被SMA(+)肌纤维母细胞取代;(2)肿瘤中存在一种未知的细胞群,这种细胞群能够下调CD34表达,相反却增加SMA的表达.体外实验表明,TGF-β1能下调纤维母细胞CD34的表达,促进CD34(+)纤维母细胞向表达SMA的肌纤维母细胞方向分化,相反,抑制TGF-β1信号则CD34的表达水平保持不变^[14],我们发现,胃癌中肿瘤细胞TGF-β1的表达与胃癌侵袭转移密切相关,肿瘤细胞TGF-β1的表达和TAF SMA的表达呈正相关,且两者的一致性较好,提示我们在体内环境中,内源性的TGF-β1可能在TAF蛋白表达改变过程中起到一定的促进作用.胃癌细胞可能通过分泌TGF-β1作用于间质,促进CD34(+)

纤维母细胞转变为SMA(+)的肌纤维母细胞, 从而发挥其促进肿瘤浸润转移的作用.

4 参考文献

- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332-337
- Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 97-104
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 509-517
- Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002; 440: 298-303
- Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 2003; 56: 271-276
- Barth PJ, Ramaswamy A, Moll R. CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2002; 441: 564-568
- 施琳, 孙善珍, 王振光. 口腔侵袭性鳞癌间质中CD34和 α 平滑肌肌动蛋白的表达. *中华口腔医学杂志* 2006; 41: 106-107
- Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 2000; 53: 626-629
- Roh MS, Choi J W, Lee HW, Kwon HC, Park TH, Choi PJ, Lee CH, Cheon BK. Differential Expression of CD34 and Smooth Muscle Actin in the Stroma of Small Lung Adenocarcinoma with Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components. *The Korean J of Pathol* 2005; 39: 158-163
- Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Kiyoku H, Toi M, Hiroi M. CD34 positive stromal cells in gastric adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2001; 54: 846-848
- Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Toi M. Alpha smooth muscle actin positive stromal cells in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55: 741-744
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1: 71-81
- Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6307-6312
- Espana EM, Kawakita T, Liu CY, Tseng SC. CD-34 expression by cultured human keratocytes is downregulated during myofibroblast differentiation induced by TGF-beta1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2985-2991

■同行评价

本文应用免疫组织化学方法检测了胃癌组织中间质细胞——肿瘤相关纤维母细胞(被激活的纤维母细胞)胞质内CD34, SMA和TGF- β 1的蛋白表达, 及其胃癌侵袭转移的关系. 文章内容较丰富, 方法得当, 得出的结果对判断预后有一定的临床意义.

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

胃癌组织中 β -catenin及Tiam-1 mRNA表达的意义

王轶淳, 黄玉红, 孙明军, 傅宝玉

■背景资料

胃癌是发病率非常高的恶性肿瘤, 其侵袭和转移是一个复杂过程。Tiam-1是一个细胞骨架调节因子, 而 β -catenin基因编码的蛋白质具有细胞黏附和信号转导功能, 本文探讨了两者在胃癌组织中的表达。

王轶淳, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110001
黄玉红, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
王轶淳, 2006年中国医科大学博士, 主要从事内镜及胃癌方面的研究。
通讯作者: 王轶淳, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院内镜中心。
susanwyichun@yahoo.com
电话: 024-83282108 传真: 024-22703576
收稿日期: 2007-03-23 接受日期: 2007-04-13

Clinicopathological significance of β -catenin and T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 mRNA expression in gastric carcinoma

Yi-Chun Wang, Yu-Hong Huang, Ming-Jun Sun, Bao-Yu Fu

Yi-Chun Wang, Ming-Jun Sun, Endoscopic center, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Yu-Hong Huang, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yi-Chun Wang, Endoscopic center, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, No. 155 Nanjing North Street, Heping District, Liaoning Province, China. susanwyichun@yahoo.com
Received: 2007-03-23 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To investigate the expression of β -catenin and T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam-1) mRNA in gastric carcinoma and its clinicopathological significance in the differentiation and metastasis of gastric carcinoma.

METHODS: mRNA expression of β -catenin and Tiam-1 was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in 40 patients with gastric carcinoma, and 30 cases of chronic superficial gastritis (CSG) selected as controls.

RESULTS: Positive expression of β -catenin mRNA was seen in gastric carcinoma (60.0%) and CSG tissue (53.3%), and there was no significant difference between the two groups. The

expression of β -catenin mRNA had no correlation with differentiation of gastric carcinoma and metastasis. The rate of Tiam-1 expression in gastric carcinoma was 67.5%, and was markedly higher than that in CSG (26.7%). The expression of Tiam-1 in poorly differentiated gastric carcinoma or that with lymph node metastasis was higher than that in well-differentiated gastric carcinoma or that without lymph node metastasis (85.0% vs 50.0%, 82.6% vs 47.1%, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Expression of β -catenin mRNA has no correlation with differentiation of gastric carcinoma and metastasis. Expression of Tiam-1 is associated with differentiation and lymph node metastasis of gastric carcinoma. Tiam-1 may promote the invasion and metastasis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; β -catenin; T-cell lymphoma invasion and metastasis 1; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Wang YC, Huang YH, Sun MJ, Fu BY. Clinicopathological significance of β -catenin and T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 mRNA expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2268-2271

摘要

目的: 研究胃癌组织中 β -catenin和Tiam-1的表达及二者与胃癌分化程度及转移的关系。

方法: 收集胃癌40例及慢性浅表性胃炎(CSG)组织30例, 利用逆转录酶链式反应(RT-PCR)方法分别检测组织中 β -catenin和Tiam-1 mRNA的表达情况。

结果: 在胃癌组织40例中24例有 β -catenin mRNA表达(60.0%), β -catenin mRNA的表达与胃癌分化程度及淋巴结转移无关($P > 0.05$), 在CSG 30例中16例有 β -catenin mRNA表达(53.3%), 2组比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.3111, P > 0.05$)。在胃癌组织40例中27例有Tiam-1 mRNA的表达(67.5%), 在CSG 30例中8例有Tiam-1 mRNA的表达(26.7%), 胃癌组织中Tiam-1的阳性率明显高于CSG组($\chi^2 =$

11.4333, $P < 0.01$), 低分化组及淋巴结转移阳性组Tiam-1的阳性率高于高分化组及淋巴结转移阴性组(85.0% vs 50.0%, 82.6% vs 47.1%, 均 $P < 0.05$).

结论: β -catenin mRNA表达与胃癌分化程度及转移无关, Tiam-1 mRNA表达与胃癌分化程度及淋巴结转移有关.

关键词: 胃癌; 慢性浅表性胃炎; β -catenin; Tiam-1; 逆转录酶链式反应

王轶淳, 黄玉红, 孙明军, 傅宝玉. 胃癌组织中 β -catenin及Tiam-1 mRNA表达的意义. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2268-2271
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2268.asp

0 引言

肿瘤细胞的侵袭、转移与其运动能力密不可分, 因细胞骨架结构的特性导致运动能力的不同, 是肿瘤细胞与正常细胞以及不同转移潜能肿瘤细胞间生物遗传素质差异的具体表现. 细胞骨架在维持细胞形态和运动的同时, 还可以整合内、外源信号, 参与细胞分泌、接触抑制、增殖和凋亡等多种生物活动^[1]. Tiam-1(T-cell lymphoma invasion and metastasis 1)是一个细胞骨架调节因子, 而 β -catenin基因编码的蛋白质是一种多功能蛋白质, 具有细胞黏附和信号转导功能. 我们探讨 β -catenin与Tiam-1与胃癌的侵袭、转移的关系, 为临床胃癌转移的有效防治提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2005年胃癌术后标本40例术前未行化放疗, 男28例, 女12例, 年龄26-72(平均55)岁, 高分化腺癌20例, 低分化腺癌20例. 内镜科活检CSG标本30例, 男22例, 女8例, 年龄25-68(平均46)岁. 所有的标本离体后半小时内取材, 剪成小块立即放入液氮, 并转入-80℃冰箱保存. TRIzol总RNA抽提纯化及RT-PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司. β -catenin及Tiam-1的引物经GenBank检索, 利用Primer5.0软件设计, 引物购自北京三博远志生物技术有限公司. β -catenin引物序列为: 上游: 5'-GGG CGG CAC CTT CCT ACT TC-3', 下游: 5'-AGC TCC CTC GCG GTT CAT-3', 产物长度为128 bp, Tiam-1引物序列为: 上游: 5'-GTT TCG TTT CCG CTG TTA-3', R: 5'-TTT CTC CCT CTT GCC

ATC-3', 产物长度为373 bp, β -actin引物序列为: 上游: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 下游: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 产物长度为498 bp.

1.2 方法 采用RT-PCR法检测胃癌及CSG组织 β -catenin和Tiam-1 mRNA的表达. 总RNA提取严格按照TRIzol总RNA抽提纯化试剂盒说明书进行. 冻存的胃癌及CSG组织在液氮中研成粉末, TRIzol匀浆后进行RNA提取, 所得RNA进行浓度、纯度及完整性的检测, RNA纯度: $A_{260}/A_{280} = 1.65-1.96$. 逆转录cDNA: RNA 3 μ L, 反应体系: 2 \times Buffer 15 μ L, $MgSO_4$ (25 mmol/L) 6 μ L, AMV (22 MU/L) 1.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.5 μ L, oligodT (50 μ mol/L) 1.5 μ L, RNase-inhibitor (40 MU/L) 0.75 μ L, RNaseFreeH₂O 0.75 μ L, 按以下条件进行逆转录反应: 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 30 min内匀速升温, 65℃ 30 min, 98℃ 5 min, 5℃ 5 min. PCR反应体系: cDNA 3 μ L, 2 \times Buffer 2.5 μ L, $MgSO_4$ (25 mmol/L) 6 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, Taq酶(83.35 nkat/L) 0.2 μ L, RNaseFreeH₂O 17.1 μ L, β -catenin及Tiam-1引物各0.1 μ L(浓度5 μ mol/L). β -catenin扩增按以下条件进行反应: 94℃预变性3 min, 94℃变性40 s, 57℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延长7 min. Tiam-1扩增按以下条件进行反应: 94℃预变性3 min, 94℃变性40 s, 53℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延长7 min. β -actin作为内参照. PCR产物加样于20 g/L琼脂糖凝胶中, 电泳后在紫外灯下观察电泳条带, 并进行光密度扫描及拍照.

统计学处理 应用SPSS12.0软件, 采用 χ^2 检验进行统计学分析.

2 结果

2.1 β -catenin mRNA的表达 胃癌组织40例中, β -catenin阳性24例(60.0%), 其中, 高分化组阳性11例(55.0%), 低分化组阳性13例(65.0%), 两组比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.4167$, $P > 0.05$); 淋巴结转移阳性组 β -catenin阳性14例(60.9%), 淋巴结转移阴性组 β -catenin阳性10例(58.8%), 两组比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.0171$, $P > 0.05$). CSG 30例中, β -catenin阳性16例(53.3%), 胃癌组与CSG组比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.3111$, $P > 0.05$)(表1).

2.2 Tiam-1 mRNA的表达 胃癌组织中40例, Tiam-1阳性27例(67.5%), 其中, 高分化组阳性10

■创新盘点

本文通过对胃癌组织中 β -catenin和Tiam-1表达的研究, 探讨其在胃癌的侵袭及转移中的相互作用, 以求为开发新的抗癌药物及寻求新的基因治疗的靶点提供新的思路.

同行评价

本研究利用RT-PCR方法分别检测胃癌组织中 β -catenin和Tiam-1的表达及二者与胃癌分化程度及转移的关系。文章方法先进,实验数据及统计方法合理可信,得出的结果为胃癌的发生、侵袭、转移防治提供了实验依据,有一定的学术价值。

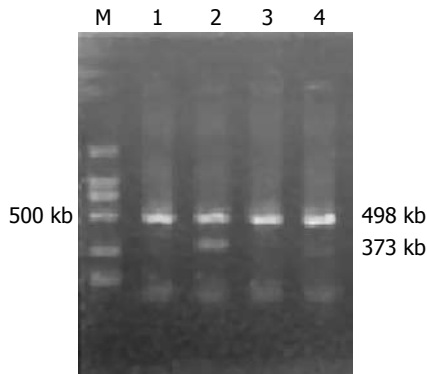


图1 胃癌及CSG Tiam-1 mRNA的表达。M: Marker; 1: CSG Tiam-1; 2: 胃癌Tiam-1; 3: CSG未加逆转录酶; 4: 胃癌中未加逆转录酶。

例(50.0%),低分化组阳性17例(85.0%),两组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.5840, P < 0.05$);淋巴结转移阳性组Tiam-1阳性19例(82.6%),淋巴结转移阴性组Tiam-1阳性8例(47.1%),两组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.6313, P < 0.05$)。CSG 30例中,Tiam-1阳性8例(26.7%),胃癌组与CSG组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 11.4333, P < 0.01$,图1)(表1)。

3 讨论

肿瘤转移是一个多步骤、多阶段、多途径、涉及多基因变化的一系列复杂过程,包括肿瘤细胞从原发灶脱落,侵入血管或淋巴管,迁移、黏附于适宜部位,诱导肿瘤血管形成,对抗宿主抗肿瘤免疫,最终在远处形成转移灶。 β -catenin的基因CTNNB1位于第3号染色体短臂3p21,含有4个外显子,其突变多发生于外显子3上, β -catenin的异常表达在肿瘤发展中的效应可能不同。对肝癌^[2]和不同分期卵巢癌^[3]中 β -catenin的表达与预后的关系的研究就提出了相反的结论。有研究指出,Wnt信号传导通路与其他通路之间有交互作用,可以形成复杂的网络,提示 β -catenin的异常表达在肿瘤发展过程中有多重效应^[4-7]。本研究中, β -catenin mRNA在胃癌及CSG中均有表达,而二者之间比较,差异无统计学意义。在胃癌低分化组及高分化组以及淋巴结转移阳性组及阴性组之间比较,差异均无统计学意义。提示 β -catenin mRNA的表达与胃癌的分化程度及淋巴结转移无关。

Tiam-1基因是一种原癌基因,在人的肝细胞、肾小管上皮细胞、支气管上皮细胞、心肌细胞中低度表达,在平滑肌细胞中呈中度表达,在其他正常组织中不表达。Tiam-1蛋白是鸟

表1 胃癌 β -catenin及Tiam-1 mRNA表达与分化程度及淋巴结转移的关系 $n(\%)$

	<i>n</i>	β -catenin	Tiam-1
CSG	30	16(53.3)	8(26.7)
胃癌	40	24(60.0)	27(67.5) ^b
高分化	20	11(55.0)	10(50.0)
低分化	20	13(65.0)	17(85.0) ^a
淋巴结转移 +	23	14(60.9)	19(82.6)
-	17	10(58.8)	8(47.1) ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

氨酸转换因子,有多个比较重要的结构区域,如参与GDP-GTP转换的Dbl同源(DH)功能区,参与细胞质相互作用的pleckstrin同源(PH)功能区等,这些功能区在肿瘤的侵袭、转移及信号传导方面具有重要的作用^[8-9]。Tiam-1基因能够调节E-cadherin介导的细胞黏附,并与Rho一起参与黏附复合物的组装。细胞间黏附复合物中的任一结构发生变化时,都会影响细胞间的正常连接,从而使肿瘤细胞的黏附能力下降,获得侵袭、转移的能力。Tiam-1作为Rho GEFs家族成员之一,主要参与调节Rho类蛋白的活性,连接细胞外信号与细胞骨架的通讯,参与转录活化及细胞周期调控。Tiam-1可以活化GTP酶,活化的GTP酶与整合素信号通路相互作用调节细胞的增殖,还可以增加细胞周期蛋白D1的表达、抑制p21和p27的表达,加速细胞周期的进展,促进细胞的增殖^[10]。细胞间的黏附在肿瘤的转移过程中起非常重要的作用。肿瘤细胞间的同质性黏附可以由E-cadherin等黏附分子介导,抑制细胞侵袭、转移。肿瘤细胞与宿主细胞或细胞外基质之间的异质性黏附可以由整合素、CD₄₄等黏附分子介导,促进细胞侵袭、转移。在正常MDCK犬肾上皮细胞中,Tiam-1的低度表达可以增强E-cadherin介导的同质性黏附,抑制肝细胞生长因子诱导的细胞离散,并逆转Ras诱导的上皮细胞恶性转化和侵袭表型呈现^[11]。而对Tiam-1表达的乳腺癌SP-1细胞系的研究^[12]发现,Tiam-1与细胞骨架蛋白锚蛋白形成复合体,实现细胞骨架重塑,促进乳腺癌细胞侵袭、转移。有研究报道,在人肾癌细胞株中Tiam-1通过促进E-cadherin介导的细胞间黏附而显著抑制细胞迁移^[13]。而对人肾癌细胞株中Tiam-1的表达水平与体外侵袭呈负相关^[14]。在一些肿瘤细胞中,过量表达

的Tiam-1通过三磷酸激醇激酶相关信号途径, 激活Rac1, 既可以诱使整合素 $\alpha 6\beta 1$ 迁移到肿瘤细胞周边特异的黏着部位, 促进异质性黏附, 又可以将整合素 $\alpha 6\beta 1$ 募集于细胞头部和伪足处, 传递调节信号至细胞骨架, 影响肌动蛋白微丝组配, 增强肿瘤细胞的运动和侵袭^[15]. 利用生物信息学方法分析发现, Tiam-1与结直肠癌转移高度相关^[16]. 本研究中, 胃癌组织Tiam-1 mRNA的阳性率明显高于CSG, 而且低分化组及淋巴结转移阳性组的阳性率高于高分化组及淋巴结转移阴性组, 提示在胃癌的恶性转化过程中, Tiam-1起促进作用. 由此推断, Tiam-1在胃癌中没有发挥增强E-cadherin介导的细胞黏附作用而抑制转移. 虽然Tiam-1能够与E-cadherin在膜连接处形成功能上的耦联, 但是 β -catenin的异常表达^[17]导致细胞间的Cadherin-catenin正常连接出现异常, 而Tiam-1的促进肿瘤细胞迁移以及参与基因表达调控和细胞增殖的作用尤为突出, 导致肿瘤细胞的恶性转化及侵袭、转移.

4 参考文献

- Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 41-47
- Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999; 155: 703-710
- Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999; 155: 527-536
- Gleason JE, Korswagen HC, Eisenmann DM. Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction. *Genes Dev* 2002; 16: 1281-1290
- Tsukashita S, Kushima R, Bamba M, Nakamura E, Mukaiho K, Sugihara H, Hattori T. Beta-catenin expression in intramucosal neoplastic lesions of the stomach. Comparative analysis of adenoma/dysplasia, adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Oncology* 2003; 64: 251-258
- Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 368-372
- Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003; 22: 1536-1545
- Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, Michiels F, Collard JG. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene* 1995; 10: 1371-1376
- Michiels F, Collard JG. Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion. *Biochem Soc Symp* 1999; 65: 125-146
- Welsh CF. Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in g1 cell cycle regulation. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84: 33-42
- Hordijk PL, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Michiels F, Oomen LC, Collard JG. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 1997; 278: 1464-1466
- Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol* 2000; 150: 177-191
- Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE. Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 41889-41897
- Engers R, Zwaka TP, Gohr L, Weber A, Gerharz CD, Gabbert HE. Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 2000; 88: 369-376
- Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997; 390: 632-636
- 黄仲曦, 孙青, 丁彦青, 姚开泰. 用文献轮廓挖掘大肠癌转移芯片表达谱. 第一军医大学学报 2003; 23: 1195-1197
- 王轶淳, 孙明军, 傅炜昕, 傅宝玉. β -catenin的表达与早期胃癌多发性的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1150-1153

编辑 何燕 电编 张敏