

三叶因子1的研究与进展

蔡稼燕, 任建林, 张靖

蔡稼燕, 福建医科大学2006级硕士研究生 福建省福州市 350000

任建林, 张靖, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化病诊治中心 厦门大学附属中山医院博士后工作站 福建省厦门市 361004

任建林, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 厦门大学附属中山医院消化内科主任, 厦门大学消化疾病研究所常务副所长, 厦门市消化疾病诊治中心常务副主任, 主要从事胃肠黏膜病变与胃肠道肿瘤的相关研究。

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心。jianlinr@msn.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2007-06-05 修回日期: 2007-07-09

Review of research and progress related to trefoil factor 1

Jia-Yan Cai, Jian-Lin Ren, Jing Zhang

Jia-Yan Cai, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, Fujian Province, China

Jian-Lin Ren, Jing Zhang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Diagnosis Center of Xiamen City; Postdoctoral Workstation, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University, 201 Hubin South Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. jianlinr@msn.com

Received: 2007-06-05 Revised: 2007-07-09

Abstract

There is convincing evidence that trefoil factor 1 (TFF1), the first member of the trefoil factor family, plays an important role in the gastrointestinal barrier function and epithelial restitution. TFF1 is involved in gastrointestinal protection, in combination with mucin. TFF1 contributes to the different steps of mucosal restitution, especially the regulation of cell-cell contact and cell migration. Recently, TFF1 has been shown to interfere with crucial biological processes such as cell migration, proliferation, differentiation and apoptosis, and angiogenesis. TFF1 delays the G1-S phase transition of the cell cycle, and reduces gastrointestinal-cell-induced apoptosis. TFF1 participates in folding secreted proteins

inside the endoplasmic reticulum. TFF1 is also closely related to the development of gastrointestinal disorders. The effect of TFF1 differs depending on its location in the gastrointestinal tract. TFF1 is considered to be a gastric tumor suppressor, although it promotes the development and progression of colonic tumors. TFF1 operates through distinct signaling pathways. This review summarizes and discusses current developments related to these processes.

Key Words: Trefoil factor 1; Function; Cancer

Cai JY, Ren JL, Zhang J. Review of research and progress related to trefoil factor 1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2273-2278

摘要

TFF1是三叶因子家族成员之一,在胃肠道黏膜屏障和修复中发挥着重要的生理功能。通过与黏蛋白结合对胃肠道起保护作用,并涉及黏膜重建的不同步骤,特别是调节细胞-细胞连接、细胞移行。近年研究发现,TFF1与细胞迁移、增殖、分化、血管形成等密切相关。他可以延迟细胞从G1期向S期转化,从而减少细胞凋亡,参与细胞内蛋白折叠而且与消化道疾病的发生密切相关。TFF1在胃肠道不同的部位发挥的作用不同,在胃组织中发挥肿瘤抑制因子的作用,但在结肠组织中却发挥着致癌因子的作用,促进结肠肿瘤的发生和发展,并且通过不同的信号途径发挥作用。本文主要对上述的新近研究进行综述。

关键词: 三叶因子1; 功能; 肿瘤

蔡稼燕, 任建林, 张靖. 三叶因子1的研究与进展. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2273-2278

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2273.asp>

0 引言

三叶因子家族是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽。迄今为止,发现哺乳动物有3种三叶肽,分别为TFF1, TFF2, TFF3。1982年由 Masiakowki *et al*^[1] MCF-7中应用雌激素诱导获得

■背景资料

三叶因子家族是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽,TFF1是三叶家族成员之一。TFF1在胃肠道黏膜屏障和修复中发挥着重要的生理功能,TFF1与胃肠道疾病有关,特别是与胃肠道肿瘤有特殊的联系。但其具体机制尚不清楚。近年研究发现,TFF1与细胞迁移、增殖、分化、血管形成等密切相关,其作用机制及其信号传导途径也取得了新的进展。

■ 研发前沿

三叶因子目前研究的热点及重点集中于: (1)三叶因子的作用机制, 特别三叶因子的黏膜保护与修复及其在肿瘤发生、发展中的作用, 明确其作用的细胞信号转导途径; (2)三叶因子基因的表达调控; (3)蛋白质水平的研究, 如寻找三叶因子相关受体或结合蛋白。

TFF1. 同年Jorgensen *et al*^[2]从猪胰腺中提取胰岛素, 发现TFF2. 1991年Suemori *et al*^[3]从大鼠肠上皮细胞中发现肠三叶因子, 即TFF3. 3种人三叶肽蛋白的编码基因都位于21q22.3区域^[4].

三叶肽家族均拥有保守的三叶肽结构, 该结构通过6个半胱氨酸残基以1-5, 2-4, 3-6的交联方式形成二硫键, 通过二硫键链接形成3个环状的三叶草结构. 三叶肽结构域很稳定, 能耐酸、水解和蛋白酶解. 哺乳动物三叶肽中, TFF1和TFF3包含了1个三叶肽结构域, TFF2含有2个三叶肽结构域. TFF1三叶肽结构域含有42个氨基酸残基^[5], TFF1通过Cys⁵⁸形成分子间二硫键形成二聚体. 三叶肽结构域内形成规则的 α -螺旋和 β -链状结构, 结构域外N端及C端紧密联系形成无规则的延伸结构, 部分形成 β -折叠. 三叶肽结构域允许TFF1形成二聚体, 自身形成同二聚体或与其他蛋白共同形成25 kDa的复合物, 形成不同的活性形式.

1 TFF1的表达

TFF1基因表达, 除了受多种调节因子(C/EBP β , 雌激素, Gata家族, HNF因子, NF- κ B, TPA)调节外^[6], 在胃肠道组织中的特异性表达与他们近端启动子区的甲基化状况有关^[6-7].

TFF1生理性状态下大量表达于胃腺颈以上所有区域的黏液细胞、小肠Brunner's腺体管腔细胞和邻近大肠隐窝表面的杯状细胞, 局部表达于胰腺管上皮, 散在表达于胆囊上皮, 少量表达于乳腺小叶和导管上皮, 在前列腺邻近肿瘤的正常组织中也有表达^[8]. 病理状态下, 上述表达消失, 例如胃肠化生时表达于杯状和柱状细胞, 胃癌时表达低下或消失, 但是在其他实体瘤如胆管癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌等则有高表达.

2 TFF1的功能

2.1 黏膜防御 TFF1通过与黏蛋白结合对胃肠道起保护防御作用. 在胃肠道中特定黏膜分泌特定三叶肽和黏蛋白. 黏蛋白是分子较大、较重的糖基化蛋白, 他以组织特异性方式分泌于机体的多种器官. 黏蛋白正常可分为2种类型: 分泌型和黏膜结合型. 其中分泌型MUC2、MUC5AC、MUC5B和MUC6是胃肠道主要凝胶形成的黏蛋白, 也是黏液层流变学特点的主要成因^[9]. 特定的三叶因子有特定的黏蛋白配对. 正常胃肠道中TFF1与MUC5AC结合, 发挥其生理功能. TFF1和人黏蛋白MUC5AC这两种分

子在黏液表面和小凹细胞共同包装分泌到胃黏膜表面并相互结合, 可增加黏液胶原的黏滞度, 并增强上皮防御酸和食物诱发损伤的能力^[10]. 但是在病理条件下, 上述表达有所改变. 例如, Barrett's食管^[11]和炎症性肠病^[12]时, 三叶肽和黏蛋白的这种协调作用下降.

目前已经发现两种TFF1特异性结合蛋白: 黏蛋白^[13]和三叶肽作用因子(TFIZ1)^[14], 他与TFF1以异二聚体的形式结合. 一方面, 胞内三叶肽很可能在分泌的过程中涉及复杂的寡聚化和分泌型黏蛋白的包装, 例如, 通过TFF1-TFIZ1异二聚化^[14], 胞外的三叶肽经过胞吐作用后结合黏蛋白, 影响着黏液层的血液流变学特征^[10,15]. 另一方面, 诸多学者认为胞外三叶肽是通过假定的受体起作用, 该假定的受体推测定位于基底外侧膜. 目前尚无明确的TFF1受体被发现. 现已证实, TFF1在胃肠道中有三种形式存在: 单聚体, 同二聚体和异二聚体. 这三种存在形式的生物活性不尽相同. 应用人结肠细胞株HT29的损伤重建模型研究发现, TFF1二聚体可以增加细胞迁移, 而单聚体无此作用^[16]. 虽然两种形式的TFF1均能抑制人胃细胞株AGS的生长, 但相比之下, 二聚体的作用更强^[17]. 在胃损伤的动物模型中, 发现二聚体TFF1的保护胃肠道损伤的疗效更加明显^[5].

另外, TFF1作为一种保护因子, 除参与黏液屏障的组成外, 可能涉及肠道炎症反应. 应用基因剔除TFF1, 导致TFF1缺乏的小鼠诱发小肠炎症性疾病, 观察发现3周龄的TFF1缺乏小鼠, 小肠没有明显改变. 鼠成年后, 其上皮和黏膜固有层中有增大的绒毛和增加的淋巴组织. 淋巴组织含有混合的炎症细胞, 包括淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞^[18]. T细胞中, CD4/CD8的比值改变, CD8亚型的相对百分比明显增加. 而在野生鼠, 主要观察到CD4和CD8亚型各自在黏膜固有层的中心和周边, 而在TFF1缺乏鼠中, 他们是混合的^[19]. 也有推测炎症反应可能是黏液屏障缺陷并发的, 因此是避免物理和化学的攻击较为低级的保护方法.

2.2 黏膜重建, 细胞迁移 3种三叶肽涉及重建的不同步骤, 特别是调节细胞-细胞连接, 细胞移行. 研究表明三叶肽通过减少细胞-细胞和细胞-基质相互作用而促进细胞分散^[20]. 例如, TFF1和TFF3的过度表达诱发胶原蛋白凝胶剂内的细胞分散式生长模式^[21]. 三叶肽可以通过Src原癌基因和RhoA蛋白诱发转化细胞分散, 导致他们迁入胶原蛋白凝胶剂内^[22]. 而Ras和Src路径的活化

容易减少黏连接^[23-24]. 在HCT-8结肠细胞株中稳定的转染TFF1, 表现出通过RhoA相关途径诱导侵袭的表现型. RhoA是GTP酶, 调节生长因子诱导细胞骨架重组, 这在细胞运动中起关键性作用^[25].

TFF1诱发细胞移行的信号传导途径, 与表皮生长因子受体EGFR酪氨酸激酶信号途径相关. EGFR是酪氨酸激酶, 可自发磷酸化结合的配体, 活化各种信号路径的下游蛋白, 包括MAPK和PI3K等^[6]. 在人类, 该路径通过调节细胞播散、移行、增殖、黏连和分化来调节细胞转化^[26]. TFF1和TFF2诱导的细胞侵袭必须依赖于EGFR家族, 而TFF3诱导细胞的侵袭则与EGFR无关^[27]. 三叶肽刺激细胞侵袭包括Rho/ROCK和COX-2/TXA2-R信号级联. 研究表明, 在结肠肿瘤细胞中, EGFR活化可以上调COX-2表达, 而COX-2过度表达可以诱发EGFR表达^[28]. 环氧合酶产生大量的产物, 包括PGE2, PGF2a, PGD2, PGI2和TXA2. 前列腺素和TXA2有促进侵袭的功能, 并能被TFF1促发信号通过Src相关自体活化环而调控^[29]. 大量证据表明, COX-2与实体瘤的发生和进展^[30]与外源性三叶肽的效应有关. 如果抑制了COX-1和COX-2的表达, 则可以阻止侵袭, 但在人结肠细胞中TFF1可以诱导COX2的表达, 并且TFF1可以通过TXA-2诱导血管形成^[25].

另外, TFF1诱发细胞移行, 也涉及G蛋白偶联受体的信号传导途径. EGFR活化的TFF1和TFF2可能不直接通过反磷酸化EGFR受体分子而发生, 而是与G蛋白有关. PGE2受体与G蛋白偶联, 活化EGFR, 促发Brk2介导的有丝分裂信号途径^[31]. TFF1效应与G蛋白的异源三聚体有关, 后者是调节细胞正常生长和分化的信号传导途径的组成元件. 他们调节各种细胞内的效应器, 如Rho, GTPases, 离子通道, 腺苷酸环化酶, PLCb, PI3K和MAPK^[32]. 蛋白酶活化受体-1(PAR-1)是TFF1诱导的肿瘤侵袭的负调节蛋白, 可通过偶联百日咳毒素敏感G蛋白质亚单位G α i3^[33], 和消耗游离的G $\beta\gamma$ 异二聚体而减少由TFF1诱导的侵袭.

目前有研究表明三叶肽可以影响紧密连接. Johnson *et al*^[34]应用TFF1敲除小鼠研究胃癌前状态的异型增生的分子改变, 发现在胃癌发生的早期表达紧密连接蛋白claudin-7.

2.3 促进细胞的分化 在胚胎发育过程中^[35], TFF1在第17天开始表达于上皮细胞表面、新生胃小

凹和腺体. 颈黏液细胞和主细胞在缺乏TFF1时, 分化不发生变化, 而胃小凹和壁细胞则受影响. 小凹细胞群在第21天扩增, 而每一腺体的壁细胞数目减少. TFF1在这个过程中作用及机制仍不清楚. TFF1可能控制双重分化程序, 一方面, 前胃小凹细胞分化为成熟的胃小凹和颈黏液细胞, 另一方面, 一些前胃小凹细胞分化为壁细胞. TFF1基因除表达在小凹细胞区域, 也表达在小鼠的泌酸黏膜的祖细胞区^[36].

TFF1可以延迟细胞从G1期向S期转化^[19]. TFF1通过磷酸化活化MAPK/ERK^[17,21]抑制人结肠肿瘤细胞株的生长. 运用重组人TFF1可以明显减少人胃肠细胞IEC18, HCT116和AGS分化^[37]. 转染TFF1的HCT116细胞或多西霉素诱导人TFF1表达可以降低细胞的增殖^[17,38]. TFF1可以阻止细胞进入S期, 与G1期细胞高频率一致, 周期调节蛋白D1阳性细胞比例增加, 而PCNA(S期)阳性的细胞和周期调节蛋白B1(G2期)阳性的细胞减少. TFF1诱导G1-S期转化延迟源于INK4(P15和P16)和CIP(P21和P27)周期素依赖性蛋白激酶(CDK)抑制物的上调. TFF1可以使视网膜成神经细胞瘤蛋白(pRb)表达增加, 并导致E2F活力降低. 据此推断, TFF1抗有丝分裂功能的效应器可能是pRb/E2F途径^[38].

TFF1可以减少胃肠道细胞凋亡^[38]. 表达TFF1的IEC18, HCT116和AGS细胞虽然数目有所减少, 但没有细胞凋亡的形态学证据. 而且, 被同时运用重组人TFF1和各种凋亡刺激剂诱导的细胞, 细胞凋亡减少. 研究表明, TFF1通过减少半胱天冬酶Caspase-3, -6, -8, -9活性起抗凋亡的作用. Caspase-1, 2, 4/5活性不受影响. TFF1不是通过凋亡体抑制前Caspase-9的失活过程, 而可能是通过比如凋亡抑制剂(IAPs)和相关蛋白, 直接作用于Caspase-9的活化形式, 而在非胃肠道HeLa和Jurkat细胞中未观察到这种抗凋亡效应^[38].

2.4 参与细胞内蛋白折叠 近年来应用基因敲除小鼠研究发现TFF1可作为一个细胞内蛋白折叠因子^[19]. 在TFF1缺乏的肿瘤中, 内质网(ER)有关的一整套基因编码蛋白上调, 其中ER固有的GRP78/BiP, ERp72和p58IPK伴侣蛋白与开放蛋白反应元件(UPR)有关^[19]. 两种非ER固有参与蛋白折叠的蛋白CHOP10/GADD153和Clusterin, 在TFF1缺乏的肿瘤中过度表达. TFF1缺乏的肿瘤中, 粗面内质网扩大, 包含致密物质. 这些积聚的蛋白性质需要进一步明确. 其中可能包含

■ 相关报道

丹麦的Thim教授是对三叶因子研究最早、最多及最深入的学者之一, 这篇文章详细介绍了三叶因子的结构与功能, 使读者对三叶因子有较为形象的了解. Tomasetto *et al*总结了三叶因子1的多重功能, 对三叶因子1的生物学功能介绍较为详尽.

■ 创新盘点

国内文献中, 对三叶因子家族的黏膜保护与修复及其在肿瘤发生、发展中的作用综述较多, 但独立阐述TFF1的研究尚少, 本文对TFF1的作用机制及信号传导途径作一综述.

■应用要点

明确TFF1在胃肠道中的作用,及其与胃肠道疾病的关系,特别是与胃肠道肿瘤的关系,将对胃肠道肿瘤的诊断与治疗开辟新的途径。

黏蛋白,因为TFF1和黏蛋白都通过内质网分泌和转运.这样,TFF1和黏蛋白结合可能发生在内质网内,帮助正确的黏蛋白折叠和分泌^[39].

3 TFF1与消化道疾病

3.1 TFF1与溃疡 Wright *et al*^[40]发现在Crohn's病和消化性溃疡附近区域存在一个特有的解剖结构,称之为“溃疡相关细胞系”.它是一种腺样结构,直接来源于肠腺隐窝基部干细胞,可以不断地产生新细胞迁移到溃疡表面,促进溃疡修复.他能表达所有3种三叶因子、EGF和溶菌酶.这些观察结果提示TFF1可能参与修复过程和维护黏膜的完整性.在空肠中过度表达人类TFF1的转基因小鼠,胃肠道中诱发溃疡的发生率较低,说明TFF1在胃肠道的修复和防护中发挥着重要作用^[41].

3.2 TFF1与胃癌 TFF1基因敲除的小鼠表现出幽门窦的超常和不典型增生,导致腺瘤和罕见的上皮内和黏膜内肿瘤病灶^[18].50%的人类胃肿瘤缺乏TFF1^[42].有报道TFF1基因缺失和改变^[43-44]和不正常的基因甲基化有关^[45].现在大多数学者认为TFF1是一种肿瘤抑制因子^[18].

TFF1在胃肿瘤中的缺乏与体细胞突变和杂合子(LOH)有关^[46].Yio *et al*^[47]近期发现,TFF1的突变体通过不同的发病途径促使胃肿瘤发生.与胃癌相关的TFF1突变体A10D和E13K改变了TFF1的三叶草结构中环1区域的表面电荷,而不干扰蛋白质稳定性.重组野生型TFF1显著地抑制细胞生长,A10D和E13K丢失了这种抑制肿瘤特性和阻断足叶乙贰诱发的细胞凋亡的能力.虽然野生型TFF1有促进细胞侵袭的能力,A10D和E13K有更强的前侵袭能力.由这两种突变体诱发的侵袭可被PI3K或磷脂酶C所阻断,而抑制Rho相关激酶只能阻滞E13K诱导的侵袭.

三叶肽信号级联与肿瘤形成的关系中,有一个主要可能的途径就是三叶肽通过白介素IL6/GP130途径调节^[48].IL-6家族细胞因子通过调节黏膜增生、炎症、血管形成和中TFF1和其他因子的表达,保持胃内环境稳定,IL-6/GP130途径的功能失调与三叶肽在损伤中的作用,和胃肿瘤形成有关^[49].

*H pylori*感染首先诱导形成慢性浅表性胃炎(而非萎缩性胃炎),进而进展为慢性萎缩性胃炎,肠化,不典型增生、胃癌.最近的研究提出人胃中*H pylori*的定植可能由细菌和TFF1的直接相互作用介导^[20].TFF1的过表达可能增强了

*H pylori*在胃组织中的定植能力^[50].*H pylori*导致的炎症反应可引起不同的信号路径的活化,不仅有利于清除炎症,而且有利于促进黏膜重组和修复.有报道,在AGS和T84细胞中,*H pylori*感染可上调TFF1^[50],这一结果与目前所知的三叶肽在黏膜修复中的功能是一致的.有趣的是,*H pylori*结合TFF1二聚体形式,*H pylori*优先定植于胃的表面黏膜胶原凝胶层,这个凝胶层主要由MUC5AC和TFF1组成^[50].*H pylori*和TFF1表达的相互作用可能是一把双刃剑:一方面,*H pylori*诱导TFF1的表达,对黏膜修复可能是有益的;另一方面,更多的TFF1可能导致*H pylori*在人胃黏膜中的数目增加^[51],而*H pylori*又是目前公认的重要的致癌因素之一.

3.3 TFF1与Barrett's食管 Fox *et al*^[52]应用基因表达图谱和免疫组织化学技术来比较正常食管和胃、Barrett's食管以及胃食管腺癌的生物标记.发现在BE到腺癌的发展过程出现TFF1表达缺失的现象,食管腺癌和胃腺癌的混合样本293例中,有84.6%的样本缺乏或少量表达TFF1.另外,正常胃组织和Barrett's食管中,有或无不典型增生的组织中有TFF1的高表达.该报道首次涉及BE到腺癌的转化中TFF1的缺失,表明TFF1缺失可能参与了BE相关恶性肿瘤的发生过程.

3.4 TFF1与结直肠息肉和肿瘤 Kim *et al*^[53]研究表明TFF1在结肠、直肠息肉和肿瘤表达不同,提示结直肠黏液瘤有不同的病理发病途径.在增生性息肉HP,锯齿状腺瘤SA,管状绒毛状腺瘤TVA,绒毛状腺瘤VA,和结肠直肠黏液瘤MC中,MUC2表达和MUC5AC和TFF1异位表达比例明显高于管状腺瘤TA和非黏液瘤的直肠结肠癌NMC.这些结果提示杯状细胞和胃小凹细胞的分化途径同时激活,主要发生在HP,SA,TVA,VA和MC,而少发生于TA和NMC中.

Rodrigues *et al*^[54]研究表明在人类结肠上皮细胞中,TFF1可以诱发腺瘤腺癌的发生.在正常人类结肠隐窝中无TFF1表达,但在家族和散发的结肠腺瘤腺癌中高表达,这与Cdc25A-B转录水平和肿瘤阶段有关.TFF1和Cdc25A-B与其他主要的致癌途径相互作用,诱导腺瘤和腺癌转化.作用于TFF1/Cdc25信号路径的因素可用于治疗TFF1表达的实体瘤.

4 展望

TFF1拥有多重功能^[19]:保护消化道黏膜免受攻击;作为肿瘤抑制因子参与胃的个体发育和内

环境稳定; 参与内质网中折叠分泌蛋白; 限制细胞增殖, 促进细胞分化. TFF1作用方式: 细胞外作为旁分泌和自分泌因子, 细胞内TFF1通过不同信号路径起作用. TFF1在胃肠道不同的部位作用不同, 胃中发挥肿瘤抑制因子的作用, 但在结肠中却发挥着致癌因子的作用, 促进结肠肿瘤的发生和发展. 其作用机制尚不完全清楚, 因此进一步研究探讨TFF1在胃肠道肿瘤发生发展的作用机制, 将对胃肠道肿瘤的诊断与治疗开辟新的途径.

5 参考文献

- 1 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7895-7903
- 2 Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmodic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept* 1982; 3: 207-219
- 3 Suemori S, Ciacci C, Podolsky DK. Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines. *J Clin Invest* 1991; 87: 2216-2221
- 4 Gott P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 308-315
- 5 Thim L, May FE. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2956-2973
- 6 Baus-Loncar M, Giraud AS. Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2921-2931
- 7 Ribieras S, Lefebvre O, Tomasetto C, Rio MC. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene* 2001; 266: 67-75
- 8 Williams GR, Wright NA. Trefoil factor family domain peptides. *Virchows Arch* 1997; 431: 299-304
- 9 Gipson IK, Argueso P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol* 2003; 231: 1-49
- 10 Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1946-1954
- 11 Warson C, Van De Bovenkamp JH, Korteland-Van Male AM, Buller HA, Einerhand AW, Ectors NL, Dekker J. Barrett's esophagus is characterized by expression of gastric-type mucins (MUC5AC, MUC6) and TFF peptides (TFF1 and TFF2), but the risk of carcinoma development may be indicated by the intestinal-type mucin, MUC2. *Hum Pathol* 2002; 33: 660-668
- 12 Shaoul R, Okada Y, Cutz E, Marcon MA. Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 488-493
- 13 Tomasetto C, Masson R, Linares JL, Wendling C, Lefebvre O, Chenard MP, Rio MC. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* 2000; 118: 70-80
- 14 Westley BR, Griffin SM, May FE. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry* 2005; 44: 7967-7975
- 15 Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 519-527
- 16 Marchbank T, Westley BR, May FE, Calnan DP, Playford RJ. Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 1998; 185: 153-158
- 17 Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 1999; 188: 312-317
- 18 Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; 274: 259-262
- 19 Tomasetto C, Rio MC. Pleiotropic effects of Trefoil Factor 1 deficiency. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2916-2920
- 20 Hoffmann W, Jagla W. Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol* 2002; 213: 147-181
- 21 Uchino H, Kataoka H, Itoh H, Hamasuna R, Kono M. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology* 2000; 118: 60-69
- 22 Emami S, Le Floch N, Bruyneel E, Thim L, May F, Westley B, Rio M, Mareel M, Gespach C. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J* 2001; 15: 351-361
- 23 Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; 23: 912-923
- 24 Frame MC. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 2004; 117: 989-998
- 25 Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 2004; 25: 885-898
- 26 Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4: S3-8
- 27 Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S, Gespach C. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmodic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4488-4497
- 28 Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438: 120-130
- 29 Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel

■名词解释

上皮重建: 黏膜上皮损伤后, 由局部邻近的黏膜上皮快速迁移入损伤部位, 覆盖损伤部位, 快速重建黏膜的完整性和连续性, 称为“上皮重建”, 这个黏膜修复的早期过程仅需要数分钟至数小时, 不需要细胞增殖.

■同行评价

本文对三叶因子的研究与进展进行了综述, 选题较为新颖, 内容丰富, 行文流畅, 有较好的理论和实际意义。

- M, Gspach C, Emami S. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2001; 15: 1517-1528
- 30 Koki AT, Khan NK, Woerner BM, Seibert K, Harmon JL, Dannenberg AJ, Soslow RA, Masferrer JL. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 13-18
- 31 Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002; 8: 289-293
- 32 Schwindinger WF, Robishaw JD. Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 2001; 20: 1653-1660
- 33 Faivre S, Regnaud K, Bruyneel E, Nguyen QD, Mareel M, Emami S, Gspach C. Suppression of cellular invasion by activated G-protein subunits Galphao, Galphai1, Galphai2, and Galphai3 and sequestration of Gbetagamma. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 363-372
- 34 Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, Moskaluk CA, El-Rifai W. Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol* 2005; 167: 577-584
- 35 Karam SM, Tomasetto C, Rio MC. Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* 2004; 53: 1408-1415
- 36 Li Q, Karam SM, Gordon JI. Diphtheria toxin-mediated ablation of parietal cells in the stomach of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996; 271: 3671-3676
- 37 Kannan R, Tomasetto C, Staub A, Bossenmeyer-Pourie C, Thim L, Nielsen PF, Rio M. Human pS2/trefoil factor 1: production and characterization in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2001; 21: 92-98
- 38 Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 2002; 157: 761-770
- 39 Torres LF, Karam SM, Wendling C, Chenard MP, Kershenobich D, Tomasetto C, Rio MC. Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol Med* 2002; 8: 273-282
- 40 Wright NA, Poulosom R, Stamp G, Van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 12-20
- 41 Playford RJ, Marchbank T, Goodlad RA, Chinery RA, Poulosom R, Hanby AM. Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2137-2142
- 42 Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio MC, Chambon P, Ryall G. Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 1989; 44: 806-812
- 43 Park WS, Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Kim YS, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 119: 691-698
- 44 Park WS, Oh RR, Park JY, Yoo NJ, Lee SH, Shin MS, Kim SY, Kim YS, Lee JH, Kim HS, An WG, Lee JY. Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. *Cancer Lett* 2000; 159: 15-21
- 45 Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000; 149: 125-134
- 46 Carvalho R, Kayademi T, Soares P, Canedo P, Sousa S, Oliveira C, Leistenschneider P, Seruca R, Gott P, Blin N, Carneiro F, Machado JC. Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 1319-1326
- 47 Yio X, Diamond M, Zhang JY, Weinstein H, Wang LH, Werther L, Itzkowitz S. Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology* 2006; 130: 1696-1706
- 48 Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, Malki S, Alderman BM, Grail D, Hollande F, Heath JK, Ernst M. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002; 8: 1089-1097
- 49 Giraud AS, Jackson C, Menhennott TR, Judd LM. Differentiation of the Gastric Mucosa IV. Role of trefoil peptides and IL-6 cytokine family signaling in gastric homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1-5
- 50 Clyne M, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, May FE, Westley BR, Drumm B. Helicobacter pylori interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7409-7414
- 51 Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2910-2915
- 52 Fox CA, Sapinoso LM, Zhang H, Zhang W, McLeod HL, Petroni GR, Mullick T, Moskaluk CA, Frierson HF, Hampton GM, Powell SM. Altered expression of TFF-1 and CES-2 in Barrett's Esophagus and associated adenocarcinomas. *Neoplasia* 2005; 7: 407-416
- 53 Kim DH, Kim JW, Cho JH, Baek SH, Kakar S, Kim GE, Sleisenger MH, Kim YS. Expression of mucin core proteins, trefoil factors, APC and p21 in subsets of colorectal polyps and cancers suggests a distinct pathway of pathogenesis of mucinous carcinoma of the colorectum. *Int J Oncol* 2005; 27: 957-964
- 54 Rodrigues S, Rodrigue CM, Attoub S, Flejou JF, Bruyneel E, Bracke M, Emami S, Gspach C. Induction of the adenoma-carcinoma progression and Cdc25A-B phosphatases by the trefoil factor TFF1 in human colon epithelial cells. *Oncogene* 2006; 25: 6628-6636

编辑 何燕 电编 郭海丽

Bcl-2在肝细胞癌变过程中凋亡抑制作用的动态分析

宗蕾, 姚登福, 吴玮, 邱历伟, 吴信华

宗蕾, 姚登福, 吴玮, 邱历伟, 吴信华, 南通大学附属医院医学实验中心 江苏省南通市 226001

宗蕾, 2006年南通大学肿瘤学硕士生, 主要从事肿瘤早期诊断及分子机制研究。

江苏省卫生厅项目, No. H200523

南通市社会发展科技计划, No. S5053

通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通大学附属医院医学实验中心. yaodf@ahnmc.com

电话: 0513-85052413

收稿日期: 2007-06-04 修回日期: 2007-06-17

Dynamic analysis of B-cell lymphoma-2 apoptotic inhibitory effects during the development of hepatocellular carcinoma

Lei Zong, Deng-Fu Yao, Wei Wu, Li-Wei Qiu, Xin-Hua Wu

Lei Zong, Deng-Fu Yao, Wei Wu, Li-Wei Qiu, Xin-Hua Wu, Research Center of Clinical Molecular Biology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: Jiangsu Provincial Bureau of Health, No. H200523; the Science and Technology Program of the Society Development in Nantong City, No. S5053

Correspondence to: Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Molecular Biology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2007-06-04 Revised: 2007-06-17

Abstract

AIM: To investigate the dynamic expression and clinicopathological alterations of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) during the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Hepatoma was induced by 2-fluorenylacetylacetamide (2-FAA) in male Sprague-Dawley rats. Morphological changes in rat livers were observed by pathological examination (HE staining). Dynamic changes in Bcl-2 in rat livers were quantitatively analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression and cellular distribution of liver Bcl-2 were simultaneously detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Histological examination confirmed that rat hepatocytes changed from granule-like

degeneration to atypical hyperplasia and HCC development after induction by 2-FAA. There were progressive increases in the level of hepatic Bcl-2 expression during the course. The levels of Bcl-2 in hepatoma tissues were significantly higher than those in normal and degenerative tissue (5.28 ± 1.10 nmol/g vs 2.78 ± 1.07 nmol/g, 1.77 ± 0.60 nmol/g, $F = 9.85$, $P < 0.01$). Immunohistochemical evidence indicated positive expression and hepatocyte distribution of Bcl-2 in rat hepatoma tissue.

CONCLUSION: Hepatic Bcl-2 protein may participate in the carcinogenesis of hepatocytes, and its overexpression may accelerate the occurrence and development of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; B-cell lymphoma-2; Immunohistochemistry; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zong L, Yao DF, Wu W, Qiu LW, Wu XH. Dynamic analysis of B-cell lymphoma-2 apoptotic inhibitory effects during the development of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2279-2283

摘要

目的: 观察肝细胞癌变过程中Bcl-2的动态表达与其病理学特征的关系。

方法: 以2-乙酰氨基芴(2-FAA)喂饲♂SD大鼠诱发肝癌发生, 分别观察肝细胞形态学和肝细胞质Bcl-2蛋白水平变化。以免疫组织化学法观察鼠肝组织中Bcl-2表达, 分析Bcl-2蛋白水平变化与其病理学特征在肝癌发生过程中的关系。

结果: 诱癌过程从肝细胞出现颗粒样变性, 不典型增生到原发性肝细胞癌(HCC)的形成过程中, 肝细胞质Bcl-2的表达水平随肝组织学形态的改变呈增高趋势, 表现为癌变组明显高于变性组和正常对照组(5.28 ± 1.10 nmol/g vs 2.78 ± 1.07 nmol/g, 1.77 ± 0.60 nmol/g, $F = 9.85$, $P < 0.01$), 而癌前组又高于癌变组(6.21 ± 3.34 nmol/g vs 5.28 ± 1.10 nmol/g), 但无统计学差异。

结论: Bcl-2参与肝细胞的癌变过程, Bcl-2过

背景资料

我国为肝癌高发区, 对肝癌的早期诊断是治疗的重点和难点。近年来, 通过监测癌基因或癌相关基因以提高肝癌早期诊断率的研究成为国际上的热点。B细胞淋巴瘤-2(*bcl-2*)基因是公认的最重要的抑制细胞凋亡基因, 在肿瘤组织中过量表达, 与肿瘤发生、发展密切相关, 其在肝癌发生、发展过程中的作用机制日益受到关注。

■ 研发前沿

目前,通过监测肝癌患者血清中Bcl-2水平以阐明其在肝癌发生发展过程中的意义的研究较为深入,但通过动物实验直接观察大鼠肝脏诱癌过程中Bcl-2表达与改变的研究尚较少见。

表达可能促进了肝癌的发生和发展。

关键词: 肝癌; Bcl-2; 免疫组化; 酶联免疫吸附试验

宗蕾, 姚登福, 吴玮, 邱历伟, 吴信华. Bcl-2在肝细胞癌变过程中凋亡抑制作用的动态分析. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2279-2283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2279.asp>

0 引言

B细胞淋巴瘤-2(*bcl-2*)基因是公认的最重要的抑制细胞凋亡基因,在肿瘤组织中过量表达,与肿瘤发生、发展密切相关^[1].细胞增殖和死亡是调节细胞数量的2个因素,两者相互作用.肿瘤的发生是不断增殖和抑制凋亡的结果^[2].Bcl-2异常增多使细胞数目增加,同时未成熟细胞和老化细胞亦增多,意味着肝细胞受到致癌因素攻击而发生变性可能性增加,易于致肝脏肿瘤产生,但其在肝细胞发生癌变过程中的作用与动态改变机制尚不清楚.我们以2-乙酰氨基苄(2-fluorenyl acetamide, 2-FAA)诱发肝细胞癌变^[3],以免疫组织化学法观察Bcl-2的胞内定位及其在肝细胞癌变过程中的动态表达,探讨Bcl-2在肝细胞癌变过程中凋亡抑制的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley(SD)大鼠48只,4-6周龄,体质量120-160 g,由南通大学实验动物中心提供,清洁级.分笼喂养于8个等大的笼中,普通大鼠颗粒饲料由南通大学实验动物中心提供.随机分为6只/笼,随机挑选1个笼子的大鼠作为正常对照组,其余为实验组(其中1组为备用组).对照鼠给予一般颗粒饲料,实验鼠以0.5 g/L的2-FAA颗粒饲料作恒环境饲养.实验期间剔除死亡鼠,以备用鼠补足.每2 wk取1只正常鼠和1组实验鼠,以乙醚轻度麻醉.从心尖取血5 mL分离血清,置-20℃冰箱保存;肝组织洗去血迹,部分用40 g/L中性甲醛液固定作病理学检查(HE染色)和免疫组织化学染色,其余组织置-80℃保存(Sanyo超低温冰箱).肝组织经40 g/L中性甲醛液固定,脱水、透明、石蜡包埋后,经切片(厚度4 μm)、展片、贴片、烤片后制成空白片.经脱蜡、水化,HE染色. Olympus BX 50光学显微镜下观察.

1.2 方法

1.2.1 SP法免疫组织化学染色 新鲜鼠肝组织经固定、浸蜡,做成厚度4 μm的组织切片;常规

脱蜡、水化;双氧水阻断内源性过氧化物酶;高压加热法修复抗原;正常动物血清封闭非特异性结合;滴加兔多克隆Bcl-2抗体,4℃过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗;滴加生物素标记的第二抗体(山羊抗兔),室温孵育10 min, PBS漂洗;滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育10 min, PBS冲洗;滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺(DAB)溶液,室温显色,蒸馏水洗涤;苏木素复染. Olympus BX 50光学显微镜观察、摄像.以0.01 mol/L PBS液(pH7.5)分别替代一抗、二抗和链霉素菌抗生物素蛋白过氧化酶(SP)试剂作阴性对照,已知表达Bcl-2的乳腺癌组织作阳性对照.组织中显示棕黄色颗粒为Bcl-2表达阳性.肝组织中Bcl-2表达强度:+,阳性细胞数为10%-25%;++,阳性细胞数为26%-50%;+++,阳性细胞数为>50%.

1.2.2 大鼠肝细胞质蛋白浓度测定 取肝组织60 mg左右,剪碎.按20:1混合适当量的细胞质蛋白抽提试剂(碧云天公司)A和B,加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)至终浓度为1 mmol/L配制成组织匀浆液.取匀浆液与组织混合充分匀浆.冰浴15 min,4℃ 15 000 g离心5 min.分离上清至预冷的塑料管中,为部分质蛋白.每20 μL沉淀加入添加了PMSF的试剂A 200 μL.高速剧烈振摇5 s,使沉淀完全悬浮分散开.冰浴15 min.加试剂B 10 μL.高速剧烈振摇5 s,冰浴1 min.高速剧烈振摇5 s,4℃ 12 000-16 000 g离心5 min.立即吸取上清至上述塑料管中,即为抽提得到的质蛋白.肝细胞质蛋白浓度以蛋白定量(BCA)法测定,按50:1混合BCA试剂A, B配制适量BCA工作液.蛋白标准品稀释10倍.稀释后的标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL加至标准品孔中,加水补足到20 μL.加适当体积样品至样品孔中,加水稀释到20 μL.各孔加入BCA工作液200 μL,37℃放置30 min.测定 A_{578} .根据标准曲线计算出蛋白浓度.

1.2.3 大鼠肝组织Bcl-2测定 从肝组织中制备匀浆液,以大鼠Bcl-2 ELISA试剂盒(BPB公司)分析.其方法为:浓缩洗涤液稀释50倍,加入标准品100 μL,已稀释标本100 μL于相应反应板孔中.加入50 μL酶标记物,轻轻混匀30 s,20℃温育90 min.反复洗板5次,每次静置10-20 s.加底物A, B液各50 μL,轻轻混匀10 s,20℃温育15 min.每孔加入终止液50 μL.轻轻混匀30 s;测定 A_{450} .根据标准曲线计算其浓度.

统计学处理 数据以mean±SD表示,多个样

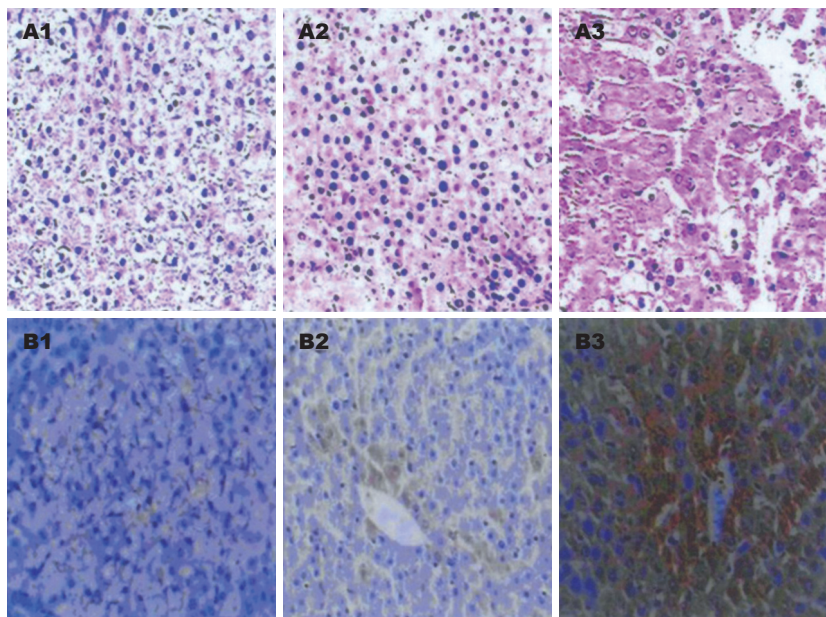


图 1 肝细胞癌变过程中肝组织HE染色Bcl-2分析. A: HE染色; B: Bcl-2(SP×100); 1: 诱癌早期; 2: 诱癌中期; 3: 诱癌晚期.

■创新盘点
关于Bcl-2水平与肝癌关系的研究目前大都集中在临床血清学检测及临床病理标本检测方面. 本文则在大鼠肝脏诱癌的动物实验中, 以病理学方法(HE染色, SP法)和酶联免疫吸附法(ELISA), 分别观察肝细胞形态、肝及血Bcl-2的动态变化, 以免疫组织化学法分析肝组织Bcl-2的表达、胞内定位及变化规律.

表 1 大鼠肝细胞癌变过程中肝组织Bcl-2的表达

分组	n	Bcl-2阳性				肝Bcl-2(nmol/g) mean ± SD
		+	++	+++	n(%)	
正常组	6	0	0	0	0(0)	1.77 ± 0.60
变性组	22	4	7	0	13(59)	2.78 ± 1.07
癌前组	6	3	2	1	6(100) ^a	6.21 ± 3.34 ^{bd}
癌变组	8	2	4	1	8(100) ^b	5.28 ± 1.10 ^{bd}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs正常组; ^cP<0.01 vs 变性组.

本均数间的比较先进行方差齐性检验, 再进行方差分析, 两样本均数的比较采用q检验, 样本率之间的比较采用Fisher确切概率法; 相关性用直线相关分析. P<0.05表示差异有显著性.

2 结果

2.1 诱癌过程中鼠肝细胞病理形态学变化 在2-FAA的诱癌过程中, 对照鼠肝细胞在形态学上无明显变化; 实验鼠在诱癌不同时期肝脏形态学发生动态变化. 对照组(n = 6), 肝细胞形态正常, 无改变; 变性鼠(n = 22), 肝细胞胞质出现颗粒样变性, 偶见大的异型胞核; 癌前鼠(n = 6), 肝板细胞、局灶细胞层次增多, 核质增粗, 核质比例增大; 癌变鼠(n = 8), 结构消失, 排列成巢状、条索状, 核大, 核质增粗, 核质比增大(图1A). 诱癌后6 wk绝大多数鼠肝细胞表现为肝细胞变性, 7-9 wk大部分鼠肝呈现癌前病变, 10-12 wk大部分实验鼠肝表现为已发生癌变, 且为高分化肝细胞癌.

2.2 癌变过程中Bcl-2表达及与组织学的关系 Bcl-2表达阳性物质呈棕黄色颗粒, 主要定位于

胞质, 少数细胞出现胞核着色, 胞膜未见着色(图1B). 随着大鼠肝组织癌变的发生, Bcl-2阳性率逐渐增高, 正常鼠无阳性表达, 变性组阳性率仅为59%, 癌前组与癌变组明显上升, 阳性率已达100%, 差别均有显著性意义(P<0.01). 而且Bcl-2表达强度呈增强趋势, 在变性鼠阳性中多呈“+”表达水平, 癌前鼠已有3例达“++”或“+++”水平, 而癌变组的8例中有4例为“++”和1例“+++”水平(表1).

2.3 诱癌过程中大鼠肝脏Bcl-2的动态改变 在大鼠肝细胞诱癌过程中, 肝细胞质Bcl-2的表达水平随肝组织学形态的改变呈增高趋势, 表现为癌前病变组>癌变组>肝细胞变性组>正常对照组, 其变化趋势有显著性意义(F = 9.85, P<0.01). 肝细胞质中Bcl-2平均浓度在癌前病变组明显高于正常组及变性组, 癌变组明显高于正常组和变性组(表1).

3 讨论

bcl-2基因位于18号染色体, 定位于细胞线粒体

■应用要点

本文为进一步探讨Bcl-2在肝癌发生发展过程中的作用机制及其表达规律提供了新的研究思路和方法,今后可从基因水平对Bcl-2的表达做进一步的研究。

膜、内质网膜和核膜孔周围。他是凋亡抑制基因,其功能是通过阻断程序性死亡或凋亡过程促进细胞生长^[4]。bcl-2原癌基因是重要的能抑制细胞凋亡的基因,他编码分子量为26 kDa的蛋白,正常情况下在各种组织均有表达,调节细胞凋亡速度,维持机体细胞数目的相对平衡。机体细胞的增殖和死亡是调节细胞数量的2个因素,两者相互作用,相互影响。Bcl-2的异常增多,使细胞数目增加,同时未成熟细胞和老化细胞亦增多,细胞受到致癌因素攻击而变性的可能性大大提高,更易于导致肿瘤的产生^[1-2]。研究表明在多种肿瘤组织中均发现Bcl-2的表达异常增多,与肿瘤的发生、发展密切相关^[5-7]。但他们在肝癌中表达情况尚不明确。本研究以免疫组织化学法分析了肝癌模型,并定量分析了诱癌过程中鼠肝Bcl-2蛋白水平的变化趋势,探寻Bcl-2表达在肝癌发生与发展中的动态变化与临床价值。

Bcl-2通过抑制细胞的凋亡而起作用:在肿瘤产生的早期,Bcl-2过表达抑制细胞凋亡,使肿瘤细胞增殖,使其数目大大增加,Bcl-2在肿瘤的早期扮演了较为重要的角色;而随着肿瘤的进展,Bcl-2表达却越来越弱(高于正常),提示癌前组高于癌变组,这时不仅肿瘤细胞增殖加快,而且凋亡率也增加,在增生活跃的基础上使细胞增殖和凋亡达到了新的平衡。而肿瘤晚期细胞凋亡之所以会增多,可能由于一方面使过度增殖过程中同样增殖的非肿瘤细胞凋亡,纯化肿瘤细胞群;另一方面也可以使“体质较弱”的肿瘤细胞凋亡掉,保证了侵袭性强的肿瘤细胞能够不断地生长,为肿瘤转移的发生提供了良好的物质基础。HCC组织中随癌细胞恶性程度的增高,凋亡细胞密度呈递减趋势,而肝硬化中不但有细胞增殖,同时存在大量细胞凋亡;HCC中由于细胞凋亡减少,细胞聚集速率相对明显增加,使HCC生长快,并表现为恶性行为增加。HCC组织中Bcl-2蛋白的表达强度明显高于肝硬化,推测Bcl-2可通过其表达产物调控肝硬化和HCC组织中的细胞凋亡,该基因蛋白的异常表达抑制细胞凋亡,阻止带有恶性潜能细胞的清除,促进HCC的发生与发展^[8-9]。本研究中Bcl-2蛋白的表达普遍存在于肝癌细胞中,其阳性细胞率均显著高于正常组织($P<0.05$),Bcl-2蛋白的过表达在肿瘤中起着重要的作用。提示Bcl-2过表达可促进肝癌发生、发展,但作用机制有待研究。

Bcl-2在多种肿瘤组织中呈高表达,并且转染bcl-2基因能够抑制多种因素诱导的多种细胞

凋亡:转染bcl-2基因表达能够防护fas分子与单抗形成二聚体而启动凋亡信号的传递或TGF- β 诱导的肝细胞凋亡,转染bcl-2基因可抑制化疗药物、加热、放射线、细胞生长因子、c-myc或p53基因等多种因素诱导的多种细胞的凋亡,延长细胞生存时间^[10-15],过表达Bcl-2蛋白对乙醇诱导的HCC-9204细胞凋亡具有明显的抑制作用^[16];bcl-2基因敲除的小鼠肝细胞也因抗氧化作用减弱而容易发生凋亡,说明Bcl-2对某些因素诱导的肝癌细胞凋亡具有一定的抑制作用^[17-18]。但有学者认为肝癌组织只能低度表达或不表达Bcl-2蛋白,并且其阳性率有时低于癌旁肝组织^[19-21]。且转染Bcl-2不能抑制肝细胞凋亡^[22]。在HBV或HCV导致原发性肝癌中,在肿瘤早期Bcl-2蛋白表达明显高于癌旁组织,推测Bcl-2过表达抑制由肝炎病毒导致的细胞凋亡,从而有利于阻止具有恶性潜能细胞的清除^[23-25]。另有研究指出,导入bcl-2基因并不抑制某些细胞的凋亡^[26],提示Bcl-2在不同细胞的凋亡过程中调控作用有差异,Bcl-2在肝癌细胞凋亡调控中的作用可能具有特殊性。

研究表明Bcl-2及其同源类似物Bcl-x1在调节正常和肝癌细胞凋亡时起了非常重要的作用,转染bcl-2基因不能抑制肝细胞凋亡,转染Bcl-x1基因却能抑制肝细胞凋亡,提示虽然bcl-2基因不参与某些情况下的肝细胞或肝癌细胞凋亡,bcl-2基因家族在肝细胞或肝癌细胞凋亡调控中可能仍具有重要的作用^[1,21]。Bcl-2主要通过与其家族成员Bax形成二聚体而发挥作用,当Bcl-2表达量较高时,Bcl-2与Bax形成异源二聚体而抑制细胞凋亡^[27]。当Bax表达量较高时,Bax之间形成同源二聚体而促进细胞凋亡^[28]。

4 参考文献

- 1 Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 249-257
- 2 Pierce RH, Vail ME, Ralph L, Campbell JS, Fausto N. Bcl-2 expression inhibits liver carcinogenesis and delays the development of proliferating foci. *Am J Pathol* 2002; 160: 1555-1560
- 3 Yao DF, Wu W, Yao M, Qiu LW, Wu XH, Su XQ, Zou L, Yao DB, Meng XY. Dynamic alteration of telomerase expression and its diagnostic significance in liver or peripheral blood for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4966-4972
- 4 Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 83-94
- 5 Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to

- smoking. *J Bras Pneumol* 2006; 32: 56-65
- 6 Zusman I, Gurevich P, Gurevich E, Ben-Hur H. The immune system, apoptosis and apoptosis-related proteins in human ovarian tumors (a review). *Int J Oncol* 2001; 18: 965-972
 - 7 Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep* 2004; 12: 955-965
 - 8 Garcia EJ, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 210-217
 - 9 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 1938-1945
 - 10 Chiu CT, Yeh TS, Hsu JC, Chen MF. Expression of Bcl-2 family modulated through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 670-676
 - 11 Tobiume K. Involvement of Bcl-2 family proteins in p53-induced apoptosis. *J Nippon Med Sch* 2005; 72: 192-193
 - 12 Takahashi M, Saito H, Okuyama T, Miyashita T, Kosuga M, Sumisa F, Yamada M, Ebinuma H, Ishii H. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J Hepatol* 1999; 31: 315-322
 - 13 Takahashi M, Saito H, Atsukawa K, Ebinuma H, Okuyama T, Ishii H. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepatol Res* 2003; 25: 192-201
 - 14 Delgado MB, Anderson JR, Whittle IR, Wharton SB. Expression of Bcl-2 and Bax in oligodendrogliomas and their relationship to apoptosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 400-407
 - 15 de La Coste A, Mignon A, Fabre M, Gilbert E, Porteu A, Van Dyke T, Kahn A, Perret C. Paradoxical inhibition of c-myc-induced carcinogenesis by Bcl-2 in transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59: 5017-5022
 - 16 Yang L, Si X, Wang W. Overexpression of bcl-2 protects hepatoma cell line HCC-9204 from ethanol-induced apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 8-11
 - 17 Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* 2006; 66: 2885-2888
 - 18 Hochman A, Liang H, Offen D, Melamed E, Sternin H. Developmental changes in antioxidant enzymes and oxidative damage in kidneys, liver and brain of bcl-2 knockout mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; 46: 41-52
 - 19 Duan XX, Ou JS, Li Y, Su JJ, Ou C, Yang C, Yue HF, Ban KC. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4740-4744
 - 20 Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, Rapaccini G, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegna L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M, Trevisani F. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 524-532
 - 21 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1059-1062
 - 22 Ravazoula P, Tsamandas AC, Kardamakias D, Gogos C, Karatza C, Thomopoulos K, Tepetes K, Kourelis T, Petsas T, Bonikos DS, Karavias D. The potential role of bcl-2 mRNA and protein expression in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2002; 22: 1799-1805
 - 23 Nakopoulou L, Stefanaki K, Vourlakou C, Manolaki N, Gakiopoulou H, Michalopoulos G. Bcl-2 protein expression in acute and chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 19-24
 - 24 Elgendy SM, Hessien M, Elsherbiny MM, Abd El-Salam IM, El-Attar IA, El-Asser Ael-B. A panel of molecular markers in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; 17: 270-278
 - 25 Sultan AS, S el G, Hessien M, Mahmoud el S, Ibrahim AS, Sherif ZA. Molecular markers of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 623-629
 - 26 Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 115-123
 - 27 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
 - 28 De Miglio MR, Muroli MR, Simile MM, Calvisi DF, Tolu P, Deiana L, Carru A, Bonelli G, Feo F, Pascale RM. Implication of Bcl-2 family genes in basal and D-amphetamine-induced apoptosis in preneoplastic and neoplastic rat liver lesions. *Hepatology* 2000; 31: 956-965

■同行评价

本研究采用2-乙酰氨基苄(2-FAA)喂饲♂SD鼠诱发肝癌发生。通过免疫组织化学和ELISA法检测鼠肝组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)的表达和分布,设计合理,实验方法可靠,结果清晰,研究内容具有实际意义,有一定的参考价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏

结肠特异性基因RELMβ的克隆及其真核表达载体构建

郑丽端, 童强松, 吕清, 杨秀萍, 董继华

■背景资料

寻求结肠特异性表达基因一直是众多学者致力研究的方向。抵抗素样分子β(RELMβ)是近年来发现的一种特异表达于人和小鼠结肠的分泌蛋白,与肠管细胞增殖、免疫反应密切相关,因而成为研究结肠疾病及其靶向治疗的新靶标。

郑丽端, 杨秀萍, 华中科技大学同济医学院附属协和医院理科学部湖北省武汉市 430022

童强松, 吕清, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科湖北省武汉市 430022

董继华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室湖北省武汉市 430022

郑丽端, 医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的分子病理研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30600278

通讯作者: 童强松, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科. qs_tong@hotmail.com

电话: 027-85726129

收稿日期: 2007-03-18 修回日期: 2007-04-13

Cloning of colon-specific gene resistin-like molecule beta and construction of its eukaryotic expression vector

Li-Duan Zheng, Qiang-Song Tong, Qing Lv,
Xiu-Ping Yang, Ji-Hua Dong

Li-Duan Zheng, Xiu-Ping Yang, Department of Pathology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Qiang-Song Tong, Qing Lv, Department of Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ji-Hua Dong, Department of Central Laboratory, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600278

Correspondence to: Dr. Qiang-Song Tong, Department of Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. qs_tong@hotmail.com

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

Abstract

AIM: To clone mouse resistin-like molecule beta (RELMβ), a colon-specific gene, and construct its eukaryotic expression vector.

METHODS: RELMβ expression in diverse organs and tissues in mice was investigated by Western and Northern blotting. Total RNA was extracted from mouse colon tissues. Full-length cDNA of the RELMβ gene was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(RT-PCR), inserted into T/A vector, validated by nucleic acid sequencing, and subcloned into the *EcoRI* restriction site of eukaryotic vector pcDNA3.1/Zeo(+). Under induction with Lipofectamine 2000, the recombinant cDNA was transferred into mouse embryonic fibroblast NIH/3T3 cells and colon cancer CT26 cells. Cellular expression levels of RELMβ were measured with Western blotting and RT-PCR.

RESULTS: RELMβ mRNA and protein were specifically expressed in mouse colon rather than in other organs. The mouse full-length RELMβ cDNA (318 bp) was successfully cloned, with 99% homology with the reported sequence. A GenBank access number was achieved as DQ157777. RELMβ mRNA and protein levels were enhanced after transfection of cells with eukaryotic vector pcDNA3.1-RELMβ ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The colon-specific gene RELMβ was cloned from mouse colon tissues, which established a basis for further exploring the biological functions of RELMβ and potential strategies for targeted therapy of colon diseases.

Key Words: Resistin-like molecule beta; Tissue specificity; Colon; Gene Expression; Western blotting; Northern blotting; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Zheng LD, Tong QS, Lv Q, Yang XP, Dong JH. Cloning of colon-specific gene resistin-like molecule beta and construction of its eukaryotic expression vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2284-2289

摘要

目的: 观察克隆小鼠结肠特异性基因RELMβ, 并构建其真核表达载体。

方法: 采用Western blot、Northern blot方法检测RELMβ基因在小鼠不同脏器中的表达; 从小鼠结肠组织中提取总RNA, 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增RELMβ全长cDNA, 克隆至T载体后进行核酸序列分析, 并将其正向插入到真核表达载体pcDNA3.1/Zeo(+)的限制性内切酶位点*EcoRI*; 重组子在阳离子

脂质体Lipofectamine 2000的介导下瞬时转染小鼠胚胎纤维母细胞NIH/3T3、结肠癌细胞系CT26, Western blot及RT-PCR法检测细胞RELM β 表达水平.

结果: RELM β mRNA和蛋白特异表达于小鼠结肠, 而其他脏器未见表达. 成功克隆了小鼠RELM β 全长cDNA(318 bp), 与已报道序列的同源性高达99%, 获得GenBank登录号DQ157777. 真核表达载体pcDNA3.1-RELM β 转染细胞后, 细胞内RELM β mRNA和蛋白水平均显著增高($P < 0.01$).

结论: 从小鼠结肠组织中克隆出RELM β 特异性表达基因, 为深入研究RELM β 基因的生物学作用及其在结肠疾病靶向治疗中的作用奠定了基础.

关键词: RELM β 基因; 组织特异性; 结肠; 基因表达; 免疫印迹; 逆转录聚合酶链反应

郑丽端, 董强松, 吕清, 杨秀萍, 董继华. 结肠特异性基因RELM β 的克隆及其真核表达载体构建. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2284-2289
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2284.asp>

0 引言

Resistin样分子家族(resistin-like molecules, RELMs)是新近确认的啮齿类和人类基因家族, 共有4个成员, 包括Resistin、RELM α 、RELM β 和RELM γ ^[1-5]. RELM β , 亦称发现于炎症带2(found in inflammatory zone 2, FIZZ2), 是一种特异表达于人和小鼠结肠的分泌蛋白, 与肠管细胞增殖、免疫反应密切相关^[1,6-8], 因而成为研究结肠疾病及其靶向治疗的新靶标. 我们观察了RELM β 在小鼠各脏器中的表达, 并克隆了小鼠RELM β 基因, 为深入研究RELM β 的生物学功能奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体pcDNA3.1/Zeo(+), T4DNA连接酶、感受态细胞TOP10购自Promega公司. RNeasy Mini Kit、QIAquick Gel Extraction Kit、QIA Prep Miniprep kit购自Qiagen生物公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis及地高辛核酸探针标记、检测试剂盒购自Roche公司; T/A克隆载体pCRII-TOPO购自Invitrogen公司; 限制性内切酶EcoR I购自New England Biolabs公

司; 第3代阳离子脂质体Lipofectamine2000购自Life Technologies公司; RELM β 多克隆抗体购自Abcam公司; GAPDH mAb购自Santa Cruz公司; ECL底物显色试剂盒购自Amersham公司. 核酸序列分析由大连宝生物公司完成. δ C57BL/6小鼠, 8-10 wk, 购自中国医学科学院肿瘤研究所, 以过剂量氟烷处死小鼠. 分别收集脑、心脏、肺、胃、结肠、小肠、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉等组织, 立即冷冻于-80 $^{\circ}$ C, 用于Western blot、Northern blot检测及RT-PCR扩增.

1.2 方法 参考GenBank提供的小鼠RELM β mRNA序列(登陆号: NM_023881), 采用Primer Premier 5.0软件设计RELM β 扩增引物序列: 上游引物P1: 5'-CACCATGAAGCCTACACTGTGT TTCC-3'(针对RELM β mRNA的244-265 bp); 下游引物P2: 5'-TTAAACCATTCGGCAGCAGCG G-3'(针对RELM β mRNA的540-561 bp). 预期扩增产物长度为322 bp, 包含RELM β 全长cDNA基因(318 bp). 引物由大连宝生物公司合成. 按照RNeasy Mini Kit说明书提取小鼠结肠总RNA. 逆转录反应参照Transcriptor First Strand cDNA Synthesis试剂盒说明书进行. GAPDH, 上游引物5'-GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG-3', 下游引物5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTGA TGTC-3', 扩增产物314 bp. 梯度PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 循环35次, 最后产物在72 $^{\circ}$ C延伸10 min. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离PCR条带, 以GAPDH作为反应内参照, 采用Phoretix 1D软件进行半定量分析. 参照说明书将RELM β RT-PCR产物连接至pCRII-TOPO载体上, 进行T/A克隆反应, 转化感受态细胞TOP10, 涂布于含Amp(50 mg/L)、20 μ L X-gal(80 g/L)的LB固体平皿, 进行蓝白斑筛选. 挑选白色菌落扩增, 碱裂解法小量提取质粒, 进行核酸序列分析, 将阳性重组子命名为pCRII-RELM β .

1.2.1 真核表达载体的构建和鉴定 重组子pCRII-RELM β 、表达载体pcDNA3.1/Zeo(+)经EcoR I酶切后, 从凝胶中分别回收目的基因和线性化载体片断. 对pcDNA3.1/Zeo(+)去磷处理, 以防止载体自身环化. 连接反应体系如下: 目的基因片断6 μ L, 线性化载体3 μ L, 5 \times T4连接酶buffer 4 μ L, T4DNA连接酶1 μ L, ddH $_2$ O 6 μ L, 16 $^{\circ}$ C反应16-20 h. 连接产物经转化、扩增后, 小量提取质粒, 以EcoR I单切重组子, 酶切产物经10 g/L琼脂糖电泳, 紫外灯下观察并拍照. 以重组子为模

■ 研发前沿

本研究的重点是观察RELM β 基因在小鼠各脏器中的表达情况, 并克隆了小鼠RELM β 基因, 旨在为进一步研究RELM β 的生物学功能奠定基础.

■ 创新盘点

目前,国际上只有3个实验室相继克隆出小鼠RELM β 基因.本研究从C57BL/6小鼠结肠组织中成功克隆出RELM β 基因全长cDNA序列,与GenBank对比同源率为99%,获得GenBank登录号DQ157777.说明RELM β 基因在不同种株间具有高度的保守性,但在其信号肽区域存在多态性.

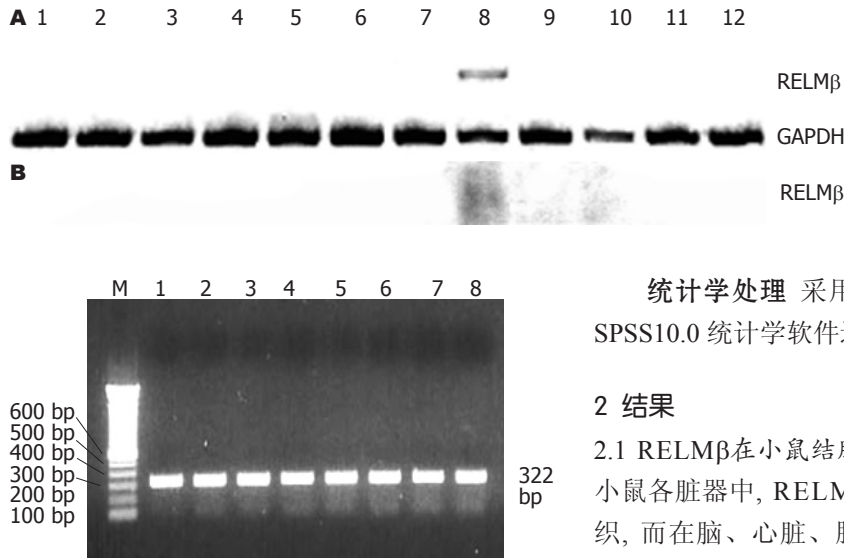


图1 小鼠各脏器组织中RELM β 的表达. A: Western blot; B: Northern blot. 1: 脑; 2: 心; 3: 肺; 4: 肝; 5: 脾; 6: 肾; 7: 胸腺; 8: 结肠; 9: 小肠; 10: 胃; 11: 肌肉; 12: 脂肪.

图2 小鼠结肠组织中RT-PCR扩增出RELM β 基因. M: 100 bp DNA marker; 1-8: PCR退火温度分别为65, 64.5, 63.3, 61.4, 58.9, 57.1, 55.8, 55°C.

板,采用T7通用型引物、RELM β 下游引物进行PCR扩增,鉴定RELM β cDNA插入方向,将正向插入的真核表达载体命名为pcDNA3.1-RELM β .
1.2.2 细胞培养和基因转染 小鼠胚胎纤维母细胞NIH/3T3、结肠癌细胞系CT26购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),在含有100 mL/L新生牛血清、青霉素100 KU/L及链霉素100 g/L的RPMI 1640培养基中,37°C、50 mL/L CO₂条件下培养,每3 d传代1次.取对数生长期细胞接种于6孔板,设置未转染对照组、空载体pcDNA3.1/Zeo(+)转染组、pcDNA3.1-RELM β 转染组.基因转染步骤参照Lipofectamine2000试剂盒说明书进行.转染48 h后,采用RT-PCR、Western blot法检测细胞RELM β mRNA及蛋白表达水平.

1.2.3 基因表达检测 制备不同脏器组织匀浆,每个样本取蛋白50 μ g或者培养基上清液50 μ L,在40-200 g/L预制的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,转膜至聚偏二氟乙烯膜,脱脂奶粉室温封闭1 h,分别与针对RELM β (1:1000滴度)^[9]、GAPDH(1:1000滴度)的一抗4°C孵育过夜,再与辣根过氧化酶标记的山羊抗兔二抗(稀释度为1:3000)室温孵育1 h,运用ECL底物试剂盒显色.提取小鼠不同脏器组织总RNA,每个样本取10 μ g RNA,在10 g/L变性琼脂糖凝胶中电泳,转膜至硝化纤维素膜.地高辛标记核酸探针的制备、封闭及杂交参照试剂盒说明书进行,CSPD工作液显色,X线胶片常温下曝光10 min检测信号.

统计学处理 采用t检验或方差分析,运用SPSS10.0统计学软件进行数据分析.

2 结果

2.1 RELM β 在小鼠结肠组织中的特异性表达 在小鼠各脏器中,RELM β 蛋白特异表达于结肠组织,而在脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉等组织无表达(图1A).Northern blot检测亦进一步发现RELM β mRNA主要表达于结肠组织,而在其他脏器缺如(图1B).

2.2 RELM β 基因的克隆及核酸序列分析 提取小鼠结肠组织总RNA,逆转录得到cDNA第1链,以此为模板,利用特异性引物进行PCR扩增,获得约322 bp的片段(其中包含RELM β cDNA 318 bp),与预期的片段大小相符(图2).对pCRII-RELM β 测序结果进行BLAST检索,结果表明,所克隆的序列与GenBank报道的RELM β 序列(NM_023881)同源率高达99%,在第43 bp碱基为“C”并非“T”,反应了基因多态性,获得GenBank序列登陆号(DQ157777,图3).

2.3 RELM β 真核表达载体的构建和鉴定 根据目的基因和载体的物理图谱,选定EcoR I单酶切pcDNA3.1-RELM β .重组体经EcoR I酶切后,释放出346 bp的基因片段(图4A);以重组子为模板,采用T7通用型引物、RELM β 下游引物进行PCR,扩增出423 bp大小产物者为正向插入,将真核表达载体命名为pcDNA3.1-RELM β (图4B).

2.4 外源性RELM β 基因在细胞中的表达 未转染对照组和空载体pcDNA3.1/Zeo(+)转染组NIH/3T3、CT26细胞中仅见微弱的RELM β mRNA表达,未检测到RELM β 蛋白表达.RELM β 真核表达载体pcDNA3.1-RELM β 转染细胞48 h后,Western blot检测到细胞培养上清中存在高水平的RELM β 蛋白,RT-PCR可检测到明显的322 bp扩增条带,证实所构建的表达载体能促使外源性RELM β 基因在小鼠多种细胞中高效表达(图5A-B).

3 讨论

Resistin是由脂肪细胞特异性分泌、具有胰岛素

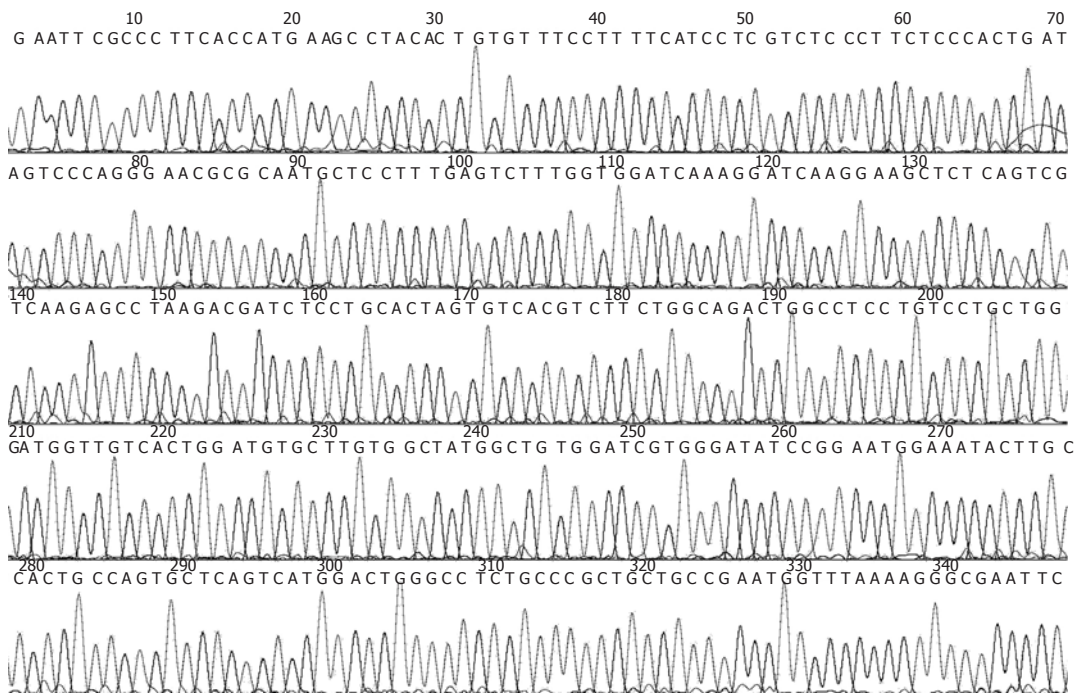


图 3 RELM β 基因核酸序列分析.

应用要点
RELM β 基因的成功克隆为进一步揭示RELM β 的生物学功能及其在结肠疾患发病机制中的作用奠定了基础. 同时, 如果以RELM β 基因为靶标, 通过靶向技术携带生物治疗性药物, 将为结肠疾病的靶向治疗提供全新的视野和重要途径.

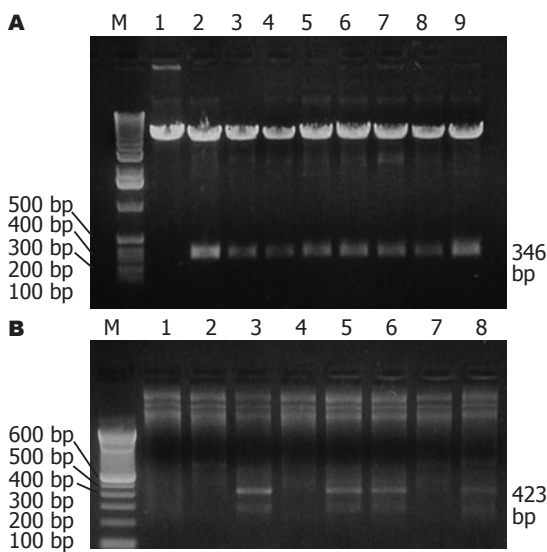


图 4 真核表达载体pcDNA3.1-RELM β 的鉴定. A: 酶切; M: 1 kb DNA marker; 1: pcDNA3.1/Zeo(+)/EcoR I; 2-9: 重组子1-8/EcoR I; B: PCR; M: 100 bp DNA marker; 1, 2, 4, 7: 反向插入的重组子; 3, 5, 6, 8: 正向插入的重组子.

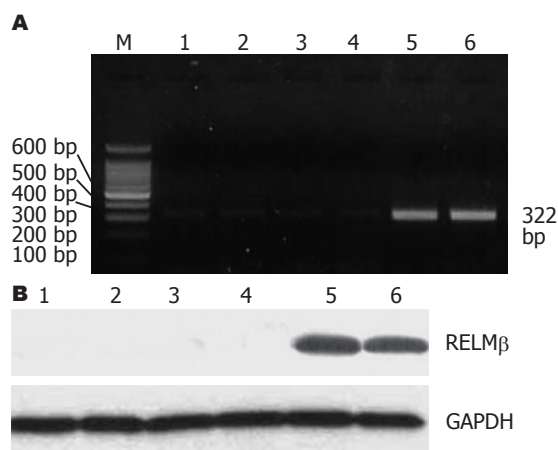


图 5 pcDNA3.1-RELM β 在小鼠细胞中的表达. A: RT-PCR; B: Western blot; M: 100 bp DNA marker; 1: NIH 3T3对照组; 2: CT26对照组; 3: NIH 3T3 pcDNA3.1转染组; 4: CT26 pcDNA3.1转染组; 5: NIH 3T3 pcDNA3.1-RELM β 转染组; 6: CT26 pcDNA3.1-RELM β 转染组.

抵抗作用的循环蛋白^[10-20]. 2001年, Steppan *et al*^[1]运用功能性基因组方法, 发现了一类具有独特半胱氨酸结构的小鼠和人类resistin样分子家族(resistin-like molecules), 即RELMs^[17]; 他们发现RELMs是具有特异性组织分布的分泌蛋白, 并且有可能是信号分子. 其中, RELM β 最初发现于结肠EST文库, 其晶体结构与resistin高度相关, 均可通过双硫键形成六聚体^[21-22]. 对小鼠组织的Northern blot分析表明, RELM β mRNA在结肠中

非常丰富, 但是在许多其他组织中, 包括resistin特异表达的白色脂肪组织, 都没有RELM β 表达. 人类和小鼠的RELM β 高度同源, 尤其是在富含半胱氨酸的C末端. Steppan *et al*^[1]运用人类RELM β 探针进行多个组织的Northern分析, 发现人的RELM β 特定分布于结肠和小肠. 本研究采用Western blot、Northern blot方法检测了小鼠多种脏器组织中RELM β 的表达, 发现RELM β 只特异分布在小鼠的结肠, 与文献报道结果一致^[1]. 目前, RELM β 的生物学功能尚未完全阐明.

■名词解释

抵抗素(Resistin): 是脂肪细胞分泌的一种信号分子, 参与了饮食诱导或遗传性肥胖小鼠胰岛素抵抗的发生. 抵抗素mRNA的表达可被噻唑烷二酮类药物抑制, 成为联系肥胖与胰岛素抵抗的中介环节之一.

在小鼠胚胎形成过程中, 直到第17天才能检测到RELM β 的表达, 值得注意的是, 这也是啮齿类结肠从未分化的层状上皮转变成简单的柱状上皮的时期^[1]. 运用原位杂交技术确定RELM β 在结肠中的表达定位, 发现RELM β mRNA在隐窝基底部增生性上皮中较为丰富, 从隐窝基底部到腔面, 其表达水平逐渐减弱. 在具有APC基因突变表型、易患肠道肿瘤的小鼠的肠道中, RELM β mRNA表达水平较野生型小鼠显著增高. 此外, RELM β 具有针对肠道病原体的免疫效应子功能, 在感染后的肠道中, RELM β 定位于杯状细胞, 表达显著上调, 且与Th2细胞因子、杯细胞增生及宿主保护性免疫^[6,23-27]同步. 新近研究表明, 在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型中RELM β 表达显著上调, 并且提示RELM β 可能通过活化巨噬细胞释放肿瘤坏死因子 α 等炎症因子加重肠道上皮的损伤^[28-30]. 由此可见, RELM β 可能与肠道上皮分化、细胞增殖、免疫反应和炎症密切相关.

基因克隆、基因转染已成为明确基因功能的主要研究手段. 目前国际上只有3个实验室相继克隆出小鼠RELM β 基因. 我们从C57BL/6小鼠结肠组织中成功克隆出RELM β 基因全长cDNA序列(318 bp), 提交并与GenBank RELM β 序列(NM_023881)进行对照, 结果发现克隆出的RELM β 全长cDNA序列的阅读框与后者(源于FVB/N小鼠)的同源性为99%, 说明RELM β 基因在不同种株间具有高度的保守性. 差异性核酸序列位于RELM β cDNA的第43个碱基. 运用Psort和SignalP软件预测RELM β N末端的信号肽序列, 均提示其信号肽切割位点位于第23和24个氨基酸之间, 预计切割后RELM β 分子质量是9 kDa^[21-22]. 因此, 我们认为RELM β 基因可能在其信号肽区域存在多态性, 将该序列上传至GenBank, 获得了登录号DQ157777. 至此, 我们在国际上第4个克隆出RELM β 全长cDNA基因序列. 为确定RELM β 能在细胞水平有效表达, 我们通过脂质体介导的基因转染方法, 将携带有RELM β 的真核表达载体转染入小鼠胚胎纤维母细胞和结肠癌细胞, 结果在培养上清中均能检测到RELM β 蛋白, 说明外源性RELM β 基因在细胞内高效表达, 并分泌至胞外. 而且, Western blot检测发现RELM β 的为M_r18 000, 符合其二聚体结构特点^[21-22].

总之, 我们成功克隆了RELM β 这一结肠组织特异性基因, 为进一步揭示RELM β 的生物学

功能及其在结肠疾患发病机制中的作用奠定了基础. 同时, 如果以RELM β 基因为靶标, 通过靶向技术携带生物治疗性药物, 将为结肠疾病的靶向治疗提供全新的视野和重要途径.

4 参考文献

- 1 Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 502-506
- 2 Gerstmayr B, Kusters D, Gebel S, Muller T, Van Miert E, Hofmann K, Bosio A. Identification of RELMgamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern. *Genomics* 2003; 81: 588-595
- 3 Tong Q, Zheng L, Lin L, Li B, Wang D, Li D. Hypoxia-induced mitogenic factor promotes vascular adhesion molecule-1 expression via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 444-456
- 4 Dai MH, Xia T, Chen XD, Gan L, Feng SQ, Qiu H, Peng Y, Yang ZQ. Cloning and characterization of porcine resistin gene. *Domest Anim Endocrinol* 2006; 30: 88-97
- 5 Pravenec M, Kazdova L, Landa V, Zidek V, Mlejnek P, Jansa P, Wang J, Qi N, Kurtz TW. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 2003; 278: 45209-45215
- 6 Artis D, Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain GP, Knight PA, Donaldson DD, Lazar MA, Miller HR, Schad GA, Scott P, Wu GD. RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13596-13600
- 7 Kawai Y, Yamauchi J, Soga K, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N. T cell-dependent and -independent expression of intestinal epithelial cell-related molecules in rats infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *APMIS* 2007; 115: 210-217
- 8 Dann SM, Eckmann L. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 115-120
- 9 Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Fujishiro M, Sakoda H, Kushiya A, Katagiri H, Anai M, Ono H, Fukushima Y, Horike N, Viana AY, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Serum concentrations of resistin-like molecules beta and gamma are elevated in high-fat-fed and obese db/db mice, with increased production in the intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia* 2005; 48: 984-992
- 10 Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004; 255: 439-447
- 11 Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9: RA55-61
- 12 Ukkola O. Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 571-574
- 13 Song H, Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Fukushima Y, Kikuchi M, Shimano H, Yamada N, Oka Y, Asano T. Resistin is regulated by C/EBPs,

- PPARs, and signal-transducing molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299: 291-298
- 14 Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 2002; 10: 1095-1103
- 15 Schinke T, Haberland M, Jamshidi A, Nollau P, Rueger JM, Amling M. Cloning and functional characterization of resistin-like molecule gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 356-362
- 16 Blagoev B, Kratchmarova I, Nielsen MM, Fernandez MM, Voldby J, Andersen JS, Kristiansen K, Pandey A, Mann M. Inhibition of adipocyte differentiation by resistin-like molecule alpha. Biochemical characterization of its oligomeric nature. *J Biol Chem* 2002; 277: 42011-42016
- 17 Kushiyama A, Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Sakoda H, Fujishiro M, Fukushima Y, Anai M, Ono H, Horike N, Viana AY, Uchijima Y, Nishiyama K, Shimosawa T, Fujita T, Katagiri H, Oka Y, Kurihara H, Asano T. Resistin-like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet. *J Biol Chem* 2005; 280: 42016-42025
- 18 Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 243-256
- 19 Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Panidis D. Resistin levels in hyperthyroid patients before and after restoration of thyroid function: relationship with body weight and body composition. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 217-221
- 20 Adeghate E. An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2485-2496
- 21 Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004; 304: 1154-1158
- 22 Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001; 276: 25970-25973
- 23 Li ZD, Ma QY, Xu J, Li M. Colocalized expression of Fas and Fas-ligand in acute pancreatitis and its correlation with cell apoptosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 25-29
- 24 Wang ML, Shin ME, Knight PA, Artis D, Silberg DG, Suh E, Wu GD. Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1074-1083
- 25 Hogan SP, Seidu L, Blanchard C, Groschwitz K, Mishra A, Karow ML, Ahrens R, Artis D, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rothenberg ME. Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 257-268
- 26 Reece JJ, Siracusa MC, Scott AL. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun* 2006; 74: 4970-4981
- 27 Artis D. New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol* 2006; 36: 723-733
- 28 McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TM, Kierstein S, Shin ME, Lehrke M, Lefterova MI, Shifflett DE, Barnes SL, Cominelli F, Cohn SM, Hecht G, Lazar MA, Haczku A, Wu GD. Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 2914-2923
- 29 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1027-1031
- 30 Nair MG, Gallagher IJ, Taylor MD, Loke P, Coulson PS, Wilson RA, Maizels RM, Allen JE. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun* 2005; 73: 385-394

■同行评价

本文检测了小鼠基因RELM β 的组织表达。克隆并构建了真核表达载体,并观察到藉由该基因的转染导致的表达增强,为研究该基因的功能奠定了基础,论文表达清晰,照片质量亦较好,是一篇较好的学术论文,有一定的学术价值。

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•

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。

阳明病肠热腑实证大鼠模型的建立与机制

樊新荣, 王荣田, 朱文锋, 伍参荣, 黄贵华, 王雨青, 张波涛

■背景资料

《伤寒论》是中医学的经典论著, 其对临床辨证用药的指导作用是毋庸置疑的, 但其辨证缺乏客观性, 疗效缺乏客观评价指标, 因此, 在进行文献整理与临床验证等研究的同时, 吸收现代科学知识的方法, 加强实验研究是十分必要的。基于脾胃病的多发性与《伤寒论》的相关论述并结合临床实际, 在中医病因理论的指导下复制了阳明病肠热腑实证大鼠模型, 并进一步并从模型大鼠的外观变化, 体温, 小肠吸收功能, 能量代谢相关酶以及组织形态学改变多方面探讨该模型的机制。探索研究中医经典的方法, 为中医辨证提供辅助客观指标。

樊新荣, 王荣田, 朱文锋, 湖南中医药大学中医诊断研究所 湖南省长沙市 410007
伍参荣, 湖南中医药大学病原免疫学教研室 湖南省长沙市 410007
黄贵华, 王雨青, 湖南中医药大学第一附属医院中医内科 湖南省长沙市 410007
张波涛, 湖南中医药大学第一附属医院眼科 湖南省长沙市 410007
樊新荣, 湖南中医药大学2005级博士生, 主要从事证的规范化与中医各家学说研究。
国家重点基础研究发展计划(973计划), No. 2003CB517101
通讯作者: 樊新荣, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学中2005级博士研究生班. fxr1973@126.com
电话: 0731-5505343
收稿日期: 2007-04-09 修回日期: 2007-05-11

Establishment and mechanism of a rat model with changre fushi syndrome in yangming disease

Xin-Rong Fan, Rong-Tian Wang, Wen-Feng Zhu, Can-Rong Wu, Gui-Hua Huang, Yu-Qing Wang, Bo-Tao Zhang

Xin-Rong Fan, Rong-Tian Wang, Wen-Feng Zhu, Traditional Chinese Medicine Diagnostic Research Institute, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hu'nan Province, China
Can-Rong Wu, Etiological Agent and Aminoacyl Teaching Section of Hu'nan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hu'nan Province, China
Gui-Hua Huang, Yu-Qing Wang, Internal Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Hu'nan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hu'nan Province, China
Bo-Tao Zhang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hu'nan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hu'nan Province, China
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2003CB517101
Correspondence to: Xin-Rong Fan, 410007, Doctor Student at Grade 2005 in Hu'nan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Central Road, Changsha 410007, Hu'nan Province, China. fxr1973@126.com
Received: 2007-04-09 Revised: 2007-05-11

Abstract

AIM: To investigate the indices of syndrome differentiation for changre fushi syndrome in yangming disease.

METHODS: The rat model with changre fushi syndrome in yangming disease was established

by perfusing chinese herb of the hot for 12 days and then with the rat dung in the 13th and 14th day. Manifestations of the disease including temperature and motor activity were observed in the rats, the small intestine absorption of D-xylose and activity of Na⁺-K⁺-ATPase were measured by phloroglucin method with rat's blood, and the morphological changes in the stomach, small intestine, liver, pancreas, colon and spleen were observed.

RESULTS: The temperature and small intestine absorption in model group were higher than that in normal group. The Na⁺-K⁺-ATPase activity in model group was also raised (2.8777 ± 0.4489 vs 2.4683 ± 0.4780, *P* < 0.01), and the structure of the tunica mucosa ventriculi was normal. The number of principal cells was reduced and the parietal cells were understained. The number of cells absorbed by the small intestine was increased and focal inflammation was observed. The liver showed vacuolar degeneration and swelling. And the colonic epithelial cells were strongly stained and in disorder, the number of goblet cells increased. Pancreas cells and the spleen corpuscles were in normal condition.

CONCLUSION: Changes in temperature, absorption of D-xylose, activity of Na⁺-K⁺-ATPase and morphological changes in the stomach, small intestine, liver, spleen and colon can be used as indices to diagnose changre fushi syndrome due to intestinal heat in yangming disease.

Key Words: Yangming disease; Changre fushi syndrome; Rat; Mechanism

Fan XR, Wang RT, Zhu WF, Wu CR, Huang GH, Wang YQ, Zhang BT. Establishment and mechanism of a rat model with changre fushi syndrome in yangming disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2290-2294

摘要

目的: 探求大鼠阳明病肠热腑实证客观性辨证指标。

方法: 大鼠先灌服热性中药连续12 d, 于13, 14 d自身粪便灌胃, 15 d ip细菌内毒素, 造阳明病肠热腑实证。观察模型大鼠的活动和体温, 取大鼠血用间苯三酚法测大鼠小肠对D-木糖的吸收功能, 能量代谢相关酶 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性并观察胃、小肠、肝、胰腺、结肠、脾组织形态学变化。

结果: 模型组大鼠好动, 体温升高, 大便干结, 小肠吸收功能增强, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的活性升高 (2.8777 ± 0.4489 vs 2.4683 ± 0.4780 , $P < 0.01$), 可见胃黏膜结构基本正常、主细胞数目减少、壁细胞淡染、轻度水肿及空泡样变和小肠吸收细胞数目较多, 可见局灶性炎性浸润, 肝细胞空泡样改变和肝细胞浊肿, 胰腺细胞结构基本正常; 结肠上皮深染、杯状细胞数目增多, 细胞排列紊乱, 脾小体体积正常、数目增多。

结论: 体温, D-木糖的吸收率, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的活性以及胃、小肠、肝、脾、结肠的部分组织形态学改变可作为此证的客观诊断指标。

关键词: 阳明病; 肠热腑实证; 大鼠; 机制

樊新荣, 王荣田, 朱文锋, 伍参荣, 黄贵华, 王雨青, 张波涛. 阳明病肠热腑实证大鼠模型的建立与机制. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2290-2294

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2290.asp>

0 引言

《伤寒论》辨阳明病脉证并治, 实质是辨阳明证范畴内的肠热腑实证等若干由具体病位与病性之证素所构成的证。在科学飞速发展的今天, 在进行文献整理与临床验证等研究的同时, 吸收现代科学知识的方法, 加强实验研究是十分必要的。基于脾胃病的多发性与《伤寒论》的相关论述并结合临床实际, 本实验复制了阳明病肠热腑实证大鼠模型, 并从大鼠的外观变化, 体温, 小肠吸收功能, 能量代谢相关酶以及胃、肝、脾、胰腺、小肠、结肠组织形态学改变方面探讨该模型的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar成年大鼠24只, 体质量200-220 g, 雌雄各半, 购于湖南省长沙市开福区东创实验动物科技服务部(scxk(湘)2006-0001)。附子、肉桂、干姜由湖南中医药大学附属第一医院中药房提供, 肉桂: 干姜以1:1:1比例作成水煎剂,

4℃保存; D-木糖由天津市光复精细化工研究所提供; D-木糖试剂盒, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶试剂盒, 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供; 大肠杆菌内毒素由湖南中医药大学病原免疫学教研室提供, DU-640型核酸/蛋白分析仪(美国·贝克曼库尔特), 80-2型离心沉淀机(上海手术器械厂), SYC型超恒温水槽(巩义市英峪予华仪器厂), DY89-I型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所)。

1.2 方法 参考文献^[1]根据每只大鼠的公斤体重计算其给药量。将动物随机分为2组, 阳明病肠热腑实证模型组(简称模型组)、空白对照组, 每组12只。造模方法参考梁念海 *et al*^[2]胃热证造模方法, 每天用附子、肉桂、干姜水煎剂, 按20 g/kg, ig, 用药12 d后; 禁食(不禁水)12 h, 给100 g/L大鼠自身粪便混悬液2 mL灌胃, 每天2次, 连续2 d; 3 d用 10^{11} 个/mL大肠杆菌灭活菌液, 0.1 mL, ip, 空白组灌等剂量的自来水。注射5 h后, 观察并记录造模中大鼠的毛发色泽、行为状态、饮食、大便等外观方面的变化。体温采用肛温测量法, 将体温表插入大鼠肛门(探头插入0.5 cm), 待读数稳定后, 读取数值。(1)血浆D-木糖测定(间苯三酚法)各组大鼠先灌服50 g/L D-木糖溶液0.3 g/kg, 1 h后眼球取血, 制备血浆, 严格按试剂盒说明操作。(2)肝脏三磷酸腺苷($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$)活性测定, 断头处死大鼠, 打开腹腔, 在冰台迅速取出肝脏, 称取0.5 g, 加9倍量的生理盐水, 在匀浆器中研磨成100 g/L的肝组织匀浆, 低温低速离心5 min, 将离心好的匀浆留上清备用, 按试剂盒说明操作, 蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法。另断头处死大鼠, 取出肝、胃、脾、胰腺、小肠、结肠, 用生理盐水冲洗干净, 制作切片, HE染色, 光镜观察。

统计学处理 实验数据以(mean±SD)表示, 用SPSS12.0统计软件进行统计学处理, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 外观, 血浆D-木糖含量及肝脏 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性 模型组大鼠灌服热性药后4 d出现体重降低, 竖毛, 活动增加, 饮水量增加, 尿量减少并发黄; 灌自身粪便当天出现排便时间延长, 排便粒数减少, 大便干结, 并成圆珠状或串珠; 注射大肠杆菌灭活菌液5 h后测体温升高。空白组大鼠饮食, 大便正常, 毛发有色泽、行为状态正常。体温、血浆D-木糖含量及肝脏($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$)

■创新盘点

本文在查阅大量资料的基础上, 综合多种造模方法, 采用内服热性药, 灌服大鼠自身粪便以及注射大肠杆菌的方法, 复合因素复制阳明病肠热腑实证中医证的动物模型, 较全面的体现中医证的特征, 克服单一素造模只能模拟中医证的部分特征的弊端。

■应用要点

在中医学理论指导下复制阳明病肠热腑实证中医证的动物模型,并从中医病因、症状、相关因素、客观指标等方面评价。为中医基础病理学、中医基础药理学研究提供服务,为中医临床辨证提供客观辅助辨证指标。

活性测定结果(表1)。

2.2 各组大鼠组织形态学变化 模型组大鼠胃黏膜结构基本正常,主细胞数目减少,壁细胞淡染,轻度水肿及空泡样变(图1A);空白对照组大鼠胃黏膜结构正常(图1B);模型组大鼠小肠上皮细胞排列整齐,吸收细胞数目较空白组多,黏膜层基底部可见局灶性炎性浸润(图1C);空白对照组大鼠肠绒毛及肠上皮细胞排列整齐(图1D);模型组大鼠可见肝细胞空泡样改变,部分肝细胞核消失,肝细胞浊肿(图1E);空白对照组肝细胞结构正常,肝细胞排列整齐,肝细胞核及胞质染色均匀(图1F);模型组大鼠胰腺基本正常(图1G);空白对照组大鼠腺泡、导管及胰岛正常(图1H);阳明病肠热腑实证模型组大鼠结肠上皮深染,杯状细胞数目增多,细胞排列紊乱(图1I);空白对照组大鼠结肠黏膜、黏膜下层、肌层、外膜结构正常(图1J);模型组大鼠,肉眼观脾体积较正常,镜下见脾小体数目增多,红髓减少,并见巨噬细胞数目增多(图1K);空白对照组大鼠脾结构正常(图1L)。

3 讨论

阳明腑证是消化器官分泌功能紊乱,消化腺分泌减少,胃肠蠕动减弱,食糜停滞,肠内发酵,腐败过程加剧,肠道菌群正常比例失调并大量繁殖,毒力剧增^[3]。附子、肉桂、干姜为大热之品,过服可致人体发热;大鼠粪便为糟粕难消化之物,其死的和活的细菌约占粪便固体重量的20%-30%,其中主要是大肠杆菌,葡萄球菌等,与肠中糟粕结成燥实后,必然引起肠腔内细菌的迅速繁殖并产生大量的内毒素。肠道内毒素还可泛滥进入全身循环,引起机体中毒反应,内毒素的热原性很强,注入微量的内毒素即可引起人体发热。其致热机制是内毒素可使机体内粒细胞释放内原性致热原,作用于下丘脑体温调节中枢而引起发热^[4-5]。内毒素还可刺激骨髓粒细胞的生成和成熟,使白细胞计数升高,低于发热量的内毒素即可引起白细胞的明显变化,因此发热反应和外周白细胞数目的变化是内毒素对机体毒性作用的表现^[6-7]。肠道内毒素80%可被肝脏所摄取,当肠道内毒素大量出现时,对肝细胞有损害^[8-10]。

中医学认为“阴静阳躁”。本实验中发现模型组动物出现活动增加、饮水量增加,尿量减少,出现排便时间延长,便干结,并成圆珠状或串珠,提示该造模法可模拟阳明病肠热腑实

表1 大鼠体温、血浆D-木糖含量及肝脏Na⁺-K⁺-ATPase活性(mean ± SD, n = 12)

分组	t/°C	D-木糖 (μmol/L)	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (umolpi/mgprot · h)
对照组	38.17 ± 0.42	379.9 ± 126.6	2.4683 ± 0.4780
模型组	38.60 ± 0.45 ^a	507.3 ± 142.6 ^b	2.8777 ± 0.4489 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

证的部分症状。中医学认为“阳盛则热,阴盛则寒”。本实验中发现阳明病肠热腑实证模型组动物体温高于空白对照组(P<0.05),提示该模型模拟了阳明病肠热腑实证的发热症状。提示体温可作为阳明病肠热腑实证的客观辨证指标之一。D-木糖在小肠内通过被动扩散的方式进行吸收,不需消化酶参与,吸收后在体内不被肝脏代谢,经肾排出,其吸收水平能够反映小肠的表面积及小肠吸收功能水平^[11-12]。因此,如果以定量木糖口服,在规定时间内测定血或尿内木糖量,即可了解小肠的吸收功能^[13-14]。本实验结果显示:阳明肠热腑实证模型组与空白对照组比较血浆D-木糖排泄率升高(P<0.01)。提示,D-木糖吸收率可作为阳明病肠热腑实证的客观辨证指标之一。从现代生化学观点看,细胞的物质代谢活动都伴随有能量转化,而三磷酸腺苷(ATP)是机体储能和直接供能的物质,与细胞的生理活动密切相关,细胞中消耗能量最多的是钠泵(Na⁺-K⁺-ATP酶),伴随能量代谢的改变还有耗氧量、代谢产物乳酸、肌酐、尿素氮等的改变,且物质能量的代谢还受神经-内分泌等因素的调节和影响,因此,组织中ATP水平是反映组织细胞功能状态及其生命力的重要参数之一^[15-16]。本实验结果表明:模型组与空白组比较,肝脏Na⁺-K⁺-ATPase活性升高(P<0.01);提示,肝脏Na⁺-K⁺-ATPase活性可作为阳明病肠热腑实证的客观辨证指标之一。

脾胃功能的失常与阳明病的发生、发展及转归关系极为密切。现代医学认为中医脾胃是以消化系统为基础的,涉及多系统、多器官的功能单位,包括能量代谢和水液代谢,并与血液、内分泌、免疫和神经系统等有密切联系的一个概念^[17-20]。因此,本实验选取胃、肝、脾、胰腺、小肠、结肠观察组织形态学改变。实验结果表明模型组大鼠胃黏膜结构基本正常,主细胞数目减少,壁细胞淡染,轻度水肿及空泡样变;小肠上皮细胞排列整齐,吸收细胞数目较空

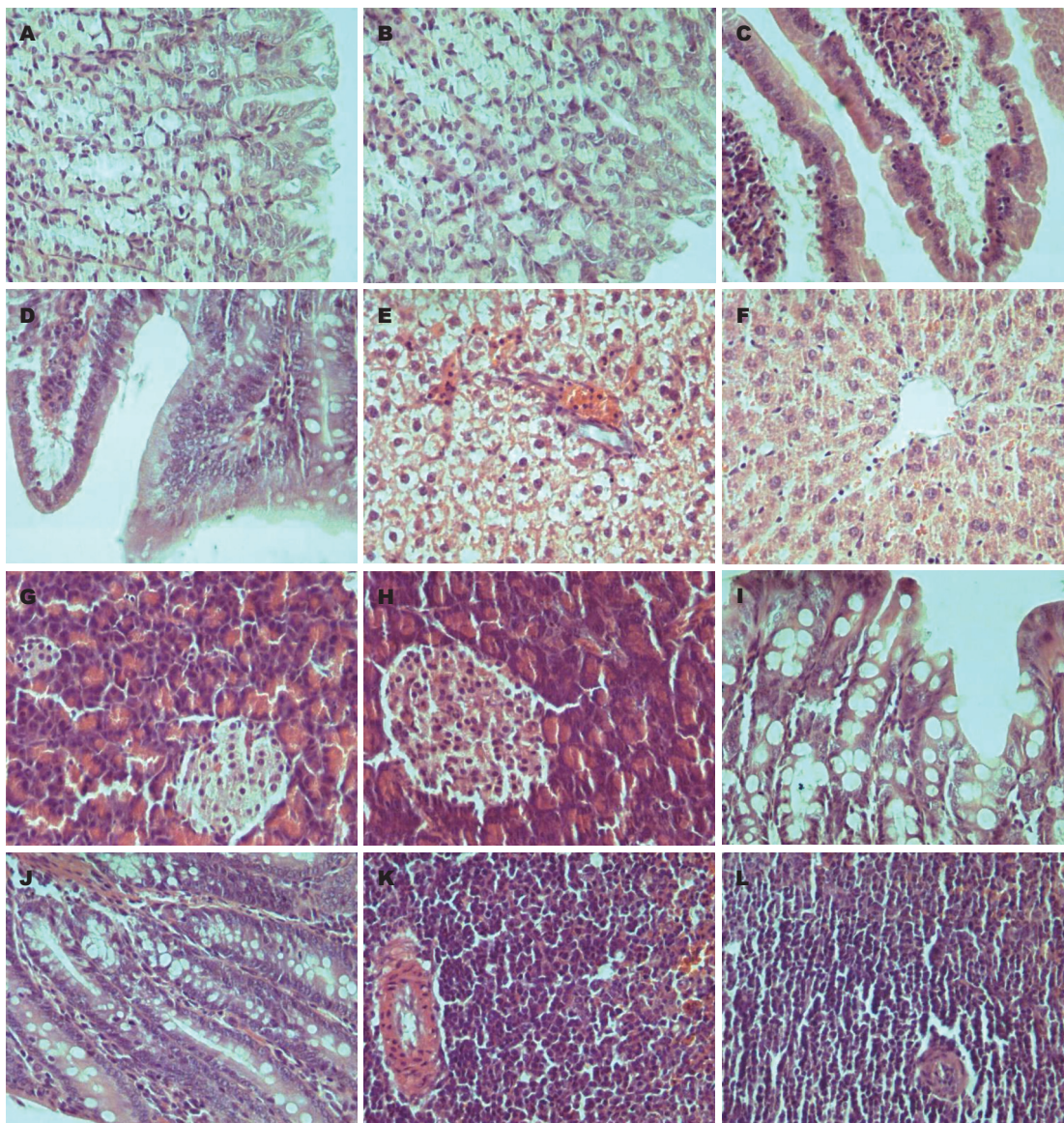


图 1 阳明病肠热腑实证大鼠模型组(HE × 200). A: 胃; B: 胃对照; C: 小肠; D: 小肠对照; E: 肝; F: 肝对照; G: 胰; H: 胰对照; I: 结肠; J: 结肠对照; K: 脾; L: 脾对照.

■名词解释
证素:即辨证的基本要素,是中医学中最近出现的新概念,“证素”是通过对“证候”(症状、体征等病理信息)的辨识,而确定的病位和病性,是构成“证名”的基本要素.证素是中医辨证的核心和关键.

白组多,可见局灶性炎性浸润;肝细胞空泡样改变,部分肝细胞核消失,肝细胞浊肿;胰腺基本正常;结肠上皮深染,杯状细胞数目增多,细胞排列紊乱;脾小体数目增多,红髓减少,并见巨噬细胞数目增多.

辨证论治是中医独特的理论体系,是中医的特色和精华^[21],复方和中药的使用都是针对相应的“证”.因此,中医证的动物模型应在中医理论指导下,为中医基础病理学、中医基础药理学提供服务.理想的中医证的动物模型应该从中医病因、症状、相关因素、客观指标等方面评价.症状在中医临床诊断中起至关重要的作用,因此动物模型诊断依据也应以此为主;证候由病因引起,病因与证之间有相互特异

性,所以病因也是一个重要的依据;中医证要结合时、地、人等,所以动物的种类年龄性别,也是中医证模型的相关因素;客观指标辅助中医证的诊断不论在临床还是动物模型上,都属于有广阔前景的新事物,寻求与证有相关的特异的客观指标,对中医诊断的客观化,中医学的现代化都有重要意义.肠热腑实证是指由于邪热入里,与肠中糟粕相搏,燥屎内结所表现的里实热证候.目前缺少理想的动物模型,有些学者根据中医理论结合现代医学理论探索性的复制里实证动物模型或热证动物模型.如田在善 *et al*^[22]采用静注醋酸铅和5-羟色胺,同时口服灌脂多糖的方法,对大鼠进行肠源性内毒素血症造模.另有学者复制了自身粪便里实证(便秘)模型^[23]以及

■同行评价

本文建立了探索阳明病肠热腑实证客观性辨证指标的模型,对研究中医证的模型及方剂作用机制具有一定作用。

热证动物模型^[24]等。本研究在参考多种造模方法的基础上以中医理论为指导复制阳明病肠热腑实证模型,比较符合中医病因病机。并从外观行为、体温、小肠吸收功能、能量代谢等方面以及胃、肝、胰腺、小肠、脾、结肠形态等改变探讨其机制,本造模方法造价低廉,反应症状较全面,可为临床实验研究提供一个较好的平台。

4 参考文献

- 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学.第3版.北京:人民卫生出版社,2003:468
- 梁念海,寇穗卿,胡瑞德,王培训.胃热证动物模型的建立.中药新药与临床药理 2004; 15: 82-86
- 田在善,沈长虹,李东华,刘英云.大承气汤治疗痞满燥实机理的实验研究.中国中药杂志 1993; 18: 170-174, 192
- 刘瑞东,崔颖,高颖,刘庆增,王金兰.内毒素致热的热型和热限研究.中华医院感染学杂志 2003; 13: 421-423
- 刘智勤,蒋玉凤,岳晓莉,樊永平,王文荣,任丽薇,黄启福,胡以明.脑热清对内毒素性发热家兔下丘脑、脑脊液cAMP及腹中隔区AVP含量的影响.中国病理生理杂志 2003; 19: 1504-1507
- 蒋玉凤,张丹卉,黄启福,严京,贾旭,路雪雅.清开灵对家兔内毒素性发热的作用及机制研究.中国病理生理杂志 2003; 19: 1103-1105
- 崔颖,刘俊媛,王金兰,刘庆增.内毒素的致热特性.天津药学 2002; 14: 29-30
- 王强,张涛,陈叶恒,余和斌,游海波.甘氨酸对内毒素性肝损害保护作用的机制.世界华人消化杂志 2006; 14: 1561-1565
- 刘亮明,邓欢,张吉翔,罗杰.内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立.世界华人消化杂志 2006; 14: 12-18
- Liu D, Li C, Chen Y, Burnett C, Liu XY, Downs S, Collins RD, Hawiger J. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279: 48434-48442
- Rolston DD, Mathan VI. Xylose transport in the human jejunum. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 553-558
- Scott RB, Kirk D, MacNaughton WK, Meddings JB. GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G911-921
- 龚剑峰,朱维铭,刘放南,罗楠,谭力,李宁,黎介寿. D-木糖吸收试验评价短肠综合征病人的吸收功能.肠外与肠内营养 2006; 13: 88-91
- 但汉雷,张亚历,张振书,周殿元.小肠功能障碍与衰竭的诊断和评分.世界华人消化杂志 2002; 10: 1170-1176
- Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30: 121-138
- 丁晓东,范建高,徐正婕,郑晓英,田丽艳,王国良.高脂饮食性脂肪性肝炎大鼠肝脏线粒体损伤和ATP储备改变.世界华人消化杂志 2005; 13: 1524-1528
- Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun* 2000; 68: 6954-6961
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, Xavier RJ, Terhorst C, Podolsky DK, Bhan AK. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 134-144
- 米娜,陈其御,吴敏毓,孙卫民.补中益气汤中黄芪对脾虚小鼠免疫调节的君药地位.世界华人消化杂志 2005; 13: 963-966
- 任平,黄熙,张航向,黄裕新,杨喜忠,赵保民,赵艳玲.脾气虚证患者胃泌酸、胃肠运动和胃肠电活动的变化.世界华人消化杂志 2004; 12: 726-729
- 朱文锋.构建“证素辨证”新体系的意义.浙江中医药大学学报 2006; 30: 135-142
- 郑小伟.腑病证动物模型研究.浙江中医学院学报 2000; 24: 46-47
- 唐铁军,别平华.三承气汤对里实证模型小鼠肠道菌群的影响.山东中医杂志 2004; 23: 104-105
- 杨进.中医温病动物模型的研制.中国实验动物学杂志 2002; 12: 61-64

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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

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

NO体外对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响

刘冬妍, 崔巍

刘冬妍, 中国医科大学附属盛京医院检验科 辽宁省沈阳市 110004

崔巍, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

刘冬妍, 副教授, 博士, 主要从事感染免疫和肠道免疫.

通讯作者: 刘冬妍, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院检验科. dongyan.liu@yahoo.com.cn

电话: 024-81805756

收稿日期: 2007-04-17 修回日期: 2007-05-11

Effects of NO on the tight junction protein occludin in intestinal epithelial cells *in vitro*

Dong-Yan Liu, Wei Cui

Dong-Yan Liu, Department of Medical Laboratory, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wei Cui, Department of Digestion Diseases, the Affiliated First Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Yan Liu, Department of Medical Laboratory, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. dongyan.liu@yahoo.com.cn

Received: 2007-04-07 Revised: 2007-05-11

Abstract

AIM: To study the effects of NO on the intestinal mucosal barrier and on the tight junction protein occludin in intestinal epithelial cells *in vitro*.

METHODS: Colon cancer cell line (Caco-2 cells) was treated with Sin1, a NO donor, in a dose-dependent manner for 24 hours. The protein and total RNA of Caco-2 cells were extracted. Changes in occludin protein mRNA in Caco-2 cells stimulated by NO were determined by Western blotting and real-time quantitative polymerase chain reaction, respectively.

RESULTS: The killing effect of NO on Caco-2 cells was dose-dependent. When treated with Sin1 at 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ doses, the levels of occludin protein (375 ± 0.5 , 374 ± 0.8 , 363 ± 0.3 , 363 ± 0.7) and mRNA (0.689 ± 0.01 , 0.578 ± 0.09 , 0.554 ± 0.03 , 0.619 ± 0.04) were significantly decreased compared with those in untreated Caco-2 cells (398 ± 0.7 , 1, respectively, $P < 0.01$).

CONCLUSION: NO can directly kill intestinal epithelial cells. NO may affect protein and mRNA expression of the tight junction protein occludin in a dose-dependent manner.

Key Words: NO; Sin1; Caco-2 cell line; Tight junction protein occludin; Western blotting; Real time polymerase chain reaction

Liu DY, Cui W. Effects of NO on the tight junction protein occludin in intestinal epithelial cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(21): 2295-2299

摘要

目的: 探讨一氧化氮(NO)对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响, 以研究NO对肠黏膜屏障的作用机制.

方法: 将NO的供体Sin1与肠上皮细胞株Caco-2共培养24 h, 采用MTT方法观察NO对肠上皮细胞的作用, 并分别提取细胞蛋白和总RNA, 采用免疫蛋白印迹(Western blot)蛋白半定量方法和实时定量聚合酶链式反应(RQ-PCR)方法检测不同NO浓度对Caco-2细胞表达紧密连接蛋白Occludin蛋白和mRNA表达的影响.

结果: 随着Sin1浓度升高(125, 250, 500和1000 $\mu\text{mol/L}$)NO对细胞的杀伤作用产生并逐渐增大, Occludin蛋白表达量和mRNA的相对表达量与无Sin1刺激时蛋白及mRNA的表达量相比明显降低(蛋白: 375 ± 0.5 , 374 ± 0.8 , 363 ± 0.3 , 363 ± 0.7 vs 398 ± 0.7 ; mRNA: 0.689 ± 0.01 , 0.578 ± 0.09 , 0.554 ± 0.03 , 0.619 ± 0.04 vs 1, 均 $P < 0.01$).

结论: NO可直接损伤肠上皮细胞, 同时以剂量依赖形式在蛋白和分子水平影响紧密连接蛋白Occludin的表达.

关键词: 一氧化氮; Sin1; Caco-2细胞; 紧密连接蛋白Occludin; 免疫印迹; 实时定量聚合酶链式反应

刘冬妍, 崔巍. NO体外对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2295-2299
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2295.asp>

背景资料

国内报道NO对紧密连接影响甚少, 本文采用NO与Caco-2细胞共培养, 观察NO对Occludin的影响. 尽管许多国外学者在NO对紧密连接的影响上做了大量工作, 但NO影响紧密连接的机制还有待解决.

■创新盘点

NO是细胞内和细胞间的信使,参与多种胃肠道的生理和病理过程,本文采用NO的供体Sin1与Caco-2细胞共培养来观察NO体外对紧密蛋白的影响。

0 引言

Occludin是一种整体膜蛋白,是紧密连接的重要组成部分,对上皮细胞的紧密连接至关重要^[1]。紧密连接的建立和稳定是由生长因子、细胞因子和激素等严密调节的^[2-3]。NO是细胞内和细胞间的信使,广泛分布于消化道,参与多种胃肠道的生理和病理过程,如胃肠道运动、内脏的血流量调节、黏膜的保护以及炎症反应等,是机体生理和病理生理过程中的一种重要化学介质。NO是否对紧密连接有影响,国内报道甚少。我们采用NO的供体Sin1与Caco-2细胞共培养,观察NO对Occludin的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 Caco-2细胞株(美国ATCC公司), NO供体-Sin1、抗人Occludin抗体和 β -actin(Sigma公司), RNeas Mini kit, T7体外转录试剂盒和Real time quantitative PCR试剂盒(大连宝生物工程有 限公司)。

1.2 方法 参照文献^[4]培养Caco-2细胞,即应用含有200 mL/L胎牛血清, 10 g/L非必需氨基酸, 10 g/L谷氨酰胺, 1 g/L的丙酮酸钠, 青霉素-链霉素双抗液和用NaHCO₃调pH值的DMEM培养液将Caco-2细胞在37°C, 50 mL/L CO₂条件下进行培养,每7 d按1:2传代,传代后7 d细胞生长达融合状态,每次实验分为对照组(Sin1非添加组)和实验组(Sin1添加组),实验时取5组非同代7 d生长达融合的细胞,添加1000 μ mol/L, 500 μ mol/L, 250 μ mol/L, 125 μ mol/L, 0 μ mol/L Sin1继续培养24 h后并收集Caco-2细胞提取总蛋白和总RNA, -130°C保存以待做Western blot和Real-time PCR使用。

1.2.1 MTT检测Sin1对Caco-2杀伤 取同代细胞接种于96孔板上,待细胞生长达融合状态时用不同浓度Sin1处理24 h后每孔加入MTT 20 μ L(5 g/L), 37°C孵箱孵育4 h,用二甲亚砜终止反应,492 nm波长酶标仪检测。

1.2.2 Western blot检测Sin1对Caco-2表达Occludin蛋白影响 6孔板培养细胞达融合状态后,加入Sin1(浓度为1000 μ mol/L, 500 μ mol/L, 250 μ mol/L, 125 μ mol/L, 0 μ mol/L)培养24 h,加入蛋白裂解液,提取蛋白,分装, -130°C保存待用;用紫外分光光度计进行蛋白浓度测定,然后经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、染膜,观察结果并照相,用天能GIS凝胶图象处理系统进行分析。

1.2.3 用Real-time PCR检测Caco-2细胞Occludin mRNA表达 取5组非同代7 d生长达融合状态的

细胞,添加1000 μ mol/L, 500 μ mol/L, 250 μ mol/L, 125 μ mol/L, 0 μ mol/L Sin1在CO₂孵箱中继续培养24 h,用大连Takara公司提供的试剂提取RNA,提取的RNA利用凝胶电泳定量。在体外将每个样本RNA 100 ng转录为cDNA,然后进行定量PCR反应。Occludin的引物为: Occludin-F5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAAC-3', Occludin-R5'-ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG-3'; GAPDH的引物: GAPDH-F5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', GAPDH-R5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'。将构建的RNA标准品分别梯度稀释(10¹⁰, 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶ copies/L)作为模板进行Real-time PCR反应,分别制作目的基因occludin和管家基因GAPDH的标准曲线。同时使用提取RNA样品在标准曲线上分别进行定量,PCR反应条件为95°C 10 s,然后95°C 5 s和60°C 20 s循环45次,最后经60°C 1 min和95°C 5 s。按下列公式进行相对表达量分析: Occludin mRNA的相对表达量 = occludin基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数,校正结果以0 μ mol/L为1,其余组与之比较。

2 结果

2.1 MTT检测结果 Sin1浓度为250 μ mol/L, 500 μ mol/L, 1000 μ mol/L时对细胞有杀伤作用,125 μ mol/L无损害作用(图1)。

2.2 NO对Caco-2细胞表达Occludin蛋白的影响 利用Western blot方法进行蛋白的半定量分析。Occludin的分子量为65 kDa,结果表明在65 kDa位置有明显条带,加入Sin1后蛋白表达量明显下降, Sin1浓度为125 μ mol/L, 250 μ mol/L, 500 μ mol/L, 1000 μ mol/L时Occludin蛋白表达量分别为375 \pm 0.5, 374 \pm 0.8, 363 \pm 0.3, 363 \pm 0.7,与无Sin1刺激Caco-2的Occludin蛋白表达量398 \pm 0.7相比明显降低(P <0.01,图2)。

2.3 NO对Caco-2细胞Occludin mRNA相对表达量的影响 应检测的mRNA以0 μ mol/L Sin1时Occludin mRNA的相对表达量设为1,通过管家基因GAPDH的校正得出Sin1浓度为125 μ mol/L, 250 μ mol/L, 500 μ mol/L, 1000 μ mol/L时Occludin mRNA的相对表达量分别为0.689 \pm 0.01, 0.578 \pm 0.09, 0.554 \pm 0.03, 0.619 \pm 0.04, Sin1浓度为125 μ mol/L, 250 μ mol/L, 500 μ mol/L, 1000 μ mol/L刺激Caco-2表达Occludin的mRNA相对含量与无Sin1刺激Caco-2表达Occludin的mRNA相对含量相比明显下降(P <0.01),在500 μ mol/L达最低,1000 μ mol/L轻微升高接近125 μ mol/L(图3)。

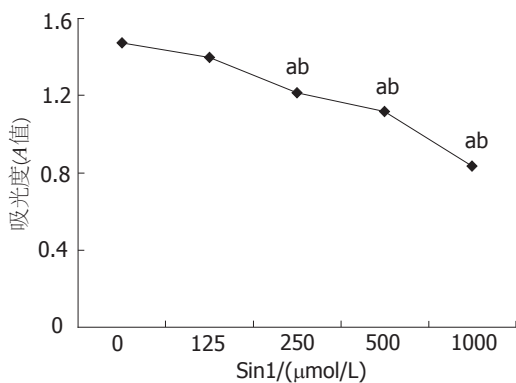


图 1 Sin1对细胞的杀伤作用. ^a $P < 0.05$ vs 125 μmol/L, ^b $P < 0.01$ vs 0 μmol/L.

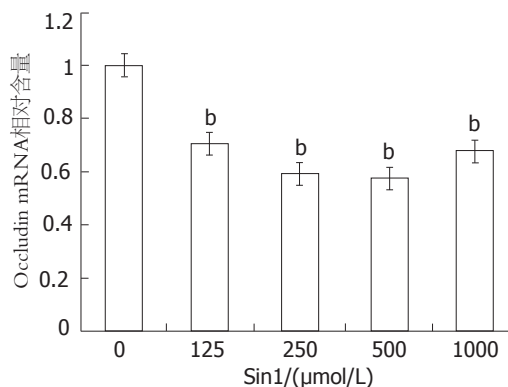


图 3 Occludin mRNA相对含量. ^b $P < 0.01$ vs 0 μmol/L.

■应用要点

本文分别利用Western blot方法和Real-time PCR方法得出加入Sin1后Occludin蛋白和mRNA表达都明显减少,从而得出NO在分子和蛋白水平影响紧密连接蛋白Occludin的表达,并可直接杀伤肠上皮细胞,损伤肠黏膜屏障。

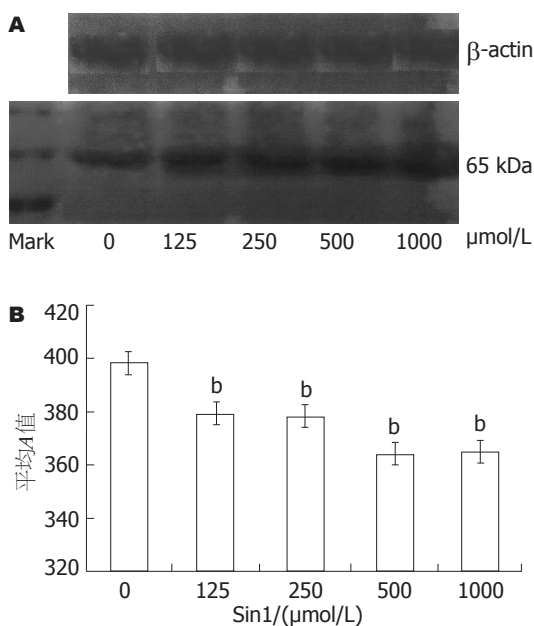


图 2 Occludin蛋白表达量随Sin1浓度升高明显下降. ^b $P < 0.01$ vs 0 μmol/L.

3 讨论

单层Caco-2细胞类似正常人肠上皮细胞,在形态学与人体肠上皮细胞相同,并可分泌与人体相同的酶类、转化因子等^[5],此细胞来源于人体结肠癌细胞株,在生长至融合后有柱状突起,类似于小肠微绒毛.向培养液一侧形成刷状缘并有分化良好的紧密连接,是目前很好的体外肠屏障模型^[6],特别是在紧密连接蛋白表达研究中得到广泛应用^[7-9].紧密连接是上皮屏障的一种重要的因子,对相邻细胞的相互连接中起重要的作用.他维持着细胞顶部和嗜碱性部位的分离,是上皮渗漏的调节屏障^[10].作为转膜蛋白的Occludin是紧密连接的重要组成部分,他是分子质量为65 kDa的跨膜蛋白.NO由3型一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)催化L-精氨酸合成,他是

一种多效性生物气体分子,可参与调节血管舒张、突触传递、巨噬细胞的杀伤活性和免疫反应等,是机体生理和病理生理过程中的一种重要化学介质^[11].内生的NO能通过调节小肠的运动而调节肠道营养的运转^[12],他是胃肠道主要的非肾上腺素能-非胆碱能的神经递质^[13],他参与紧密连接蛋白包括Occludin的表达^[14],调节紧密连接的关和开^[15],他是紧密连接的重要调节因子^[16].此外NO还是肠道黏膜防御的重要因子^[17],他调节黏膜免疫细胞的活性;减少白细胞与内皮的相互黏附;并调整黏膜血流;减少上皮的渗漏;刺激黏液的产生和碳酸氢盐的分泌^[18-19];他还通过细胞毒特性进行黏膜防御^[20],由实验证实长期少量NO注射可减少实验性结肠炎症并加速其治愈^[21].尽管在正常情况下NO对黏膜有防御作用,但有研究显示NO对组织损伤起作用^[22],更有研究证明NOS抑制剂减弱结肠损伤和炎症反应^[23-25],此外NO还通过抑制CAMP依赖的CFTR(一种上皮细胞离子通道和氯分泌调节蛋白)抑制氯的分泌^[26],他能使细胞间紧密连接变得松弛而导致肠黏膜通透性增高,能直接作用于肠黏膜,导致高通透和细菌易位^[27],而且通过形成过氧化硝酸盐来损伤肠黏膜上皮^[28].在体外NO作用于肠上皮细胞可导致钠、钾ATP酶抑制^[29].

Sin1是NO的供体,他可产生NO和等量的超氧化物,用Sin1与细胞共培养24 h可引起大约50%细胞死亡^[30].我们用Sin1刺激Caco-2,观察NO对肠上皮表达Occludin的影响.MTT结果显示Sin1随浓度的加大对Caco-2细胞有杀伤作用,这证明NO可直接作用于肠上皮细胞,引起肠上皮细胞的损伤.NO的生物学作用除作为生物信使外,还具有细胞毒作用,NO可作用于巯基使能量代谢或与抗氧化有关的酶失活,并可直接

■同行评价

本研究得出NO可直接损伤肠上皮细胞,同时以剂量依赖形式在蛋白和分子水平影响紧密连接蛋白Occludin的表达,方法成熟,设计合理,有一定的可读性。

损伤细胞DNA. 国外有学者利用NO另一供体—DETA-NONOate处理Caco-2发现, NO从分子和蛋白水平降低了紧密连接蛋白的表达^[31-32]. 我们利用Western blot方法进行蛋白半定量检测发现加入Sin1后Occludin蛋白表达下降,应用Real-time PCR检测加入Sin1后Caco-2表达Occludin mRNA水平得出加入Sin1后Occludin mRNA表达也明显减少,这与国外学者报道相符. 由此得出NO在分子和蛋白水平影响紧密连接蛋白Occludin的表达,并可直接杀伤肠上皮细胞,损伤肠黏膜机械屏障。

4 参考文献

- Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T, Keledjian KM, Boneva D, Marasa BS, Wang JY. Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1159-G1169
- Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1091-1099
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G851-G857
- Hamada T, Ikeda I, Takashima K, Kobayashi M, Kodama Y, Inoue T, Matsuoka R, Imaizumi K. Hydrolysis of micellar phosphatidylcholine accelerates cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1726-1732
- Yokomizo A, Moriwaki M. Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1774-1776
- Cruz N, Qi L, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *J Burn Care Rehabil* 1994; 15: 207-212
- Sappington PL, Han X, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 464-476
- Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2004; 279: 796-804
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1028-G1036
- Hollande F, Lee DJ, Choquet A, Roche S, Baldwin GS. Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 1187-1197
- Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 719-728
- Fraser R, Vozzo R, Di Matteo AC, Boeckxstaens G, Adachi K, Dent J, Tournadre JP. Endogenous nitric oxide modulates small intestinal nutrient transit and activity in healthy adult humans. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1290-1295
- Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992; 262: G379-G392
- Han X, Uchiyama T, Sappington PL, Yaguchi A, Yang R, Fink MP, Delude RL. NAD⁺ ameliorates inflammation-induced epithelial barrier dysfunction in cultured enterocytes and mouse ileal mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 443-449
- Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod* 2004; 70: 267-276
- Lee NP, Mruk DD, Wong CH, Cheng CY. Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/beta-catenin (CATNB) signaling pathway: an in vitro and in vivo study. *Biol Reprod* 2005; 73: 458-471
- Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; 119: 512-520
- Wallace JL. Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostaglandins and nitric oxide. *Clin Invest Med* 1996; 19: 346-351
- Martin GR, Wallace JL. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 130-137
- Marcinkiewicz J, Chain B, Nowak B, Grabowska A, Bryniarski K, Baran J. Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res* 2000; 49: 280-289
- Wallace JL, Vergnolle N, Muscara MN, Asfaha S, Chapman K, McKnight W, Del Soldato P, Morelli A, Fiorucci S. Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology* 1999; 117: 557-566
- Rachmilewitz D, Stampler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite-induced rat colitis—a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* 1993; 105: 1681-1688
- Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Sandoval M, Rossi JL, Eloby-Childress S, Beckman JD. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995; 109: 1475-1483
- Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: G673-G684
- Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995; 37:

- 247-255
- 26 Skinn AC, MacNaughton WK. Nitric oxide inhibits cAMP-dependent CFTR trafficking in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G739-G744
- 27 Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 2002; 17: 139-145
- 28 Nadler EP, Upperman JS, Dickinson EC, Ford HR. Nitric oxide and intestinal barrier failure. *Semin Pediatr Surg* 1999; 8: 148-154
- 29 Suzuki Y, Lu Q, Xu DZ, Szabo C, Hasko G, Deitch EA. Na⁺,K⁺-ATPase activity is inhibited in cultured intestinal epithelial cells by endotoxin or nitric oxide. *Int J Mol Med* 2005; 15: 871-877
- 30 Meij JT, Haselton CL, Hillman KL, Muralikrishnan D, Ebadi M, Yu L. Differential mechanisms of nitric oxide- and peroxynitrite-induced cell death. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1043-1053
- 31 Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003; 19: 229-237
- 32 Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004; 21: 261-270

编辑 王晓瑜 电编 张强

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

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

胃肠道间质瘤组织中PDGFR α 和C-kit基因突变和蛋白表达的关系

王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈

■背景资料

2003年有学者在C-kit突变阴性的GIST中检测到PDGFR α 的表达及突变, 由于PDGFR α 与C-kit的相似之处使得对于GIST中PDGFR α 的相关研究成为热点。

王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 上海市 200433
王彦丽, 2006年第二军医大学毕业, 硕士, 主要从事肿瘤分子病理的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471702

通讯作者: 马大烈, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科. drwyl@126.com

收稿日期: 2007-03-23 修回日期: 2007-04-21

Relationship of Platelet-derived growth factor receptor α and C-kit gene mutations and expression in gastrointestinal stromal tumors

Yan-Li Wang, Xiang-Rong Zhao, Chen-Guang Bai, Lei Yang, Da-Lie Ma

Yan-Li Wang, Xiang-Rong Zhao, Chen-Guang Bai, Lei Yang, Da-Lie Ma, Department of Pathology, the Affiliated Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471702

Correspondence to: Dr. Da-Lie Ma, Department of Pathology, the Affiliated Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. drwyl@126.com

Received: 2007-03-23 Revised: 2007-04-21

Abstract

AIM: To detect platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) and C-kit gene mutations and protein expression, and to discuss the relationship between the two genes. In addition, to discuss the important role of the PDGFR α mutation in the tumorigenesis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs).

METHODS: PDGFR α and C-kit gene mutations and protein expression in 52 cases of GIST were detected by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism, immunohistochemistry and Western blotting.

RESULTS: PDGFR α gene mutations were detected in five cases (9.6%) among the 52 GISTs. Most had spindle histology and were of gastric

origin. The C-kit mutation was found in 28 cases (53.8%). Most were small intestinal origin; tumors with C-kit mutation were not examined for PDGFR α mutation. The rate of PDGFR α protein expression was 100%. In five cases of GIST with PDGFR α gene mutations, the corresponding protein expression was higher than that in cases with C-kit gene mutations, or in normal GI tissues and schwannomas. The rate of C-kit protein expression was 94.2% (49/52). Mutations were unrelated to C-kit protein expression ($P = 0.5332$). The presence of mutations correlated with PDGFR α protein expression ($P < 0.0001$).

CONCLUSION: Our results suggest that PDGFR α and C-kit mutations play an important role in the tumorigenesis of GIST. The location of mutations is associated with the site of origin and histological phenotype. Protein expression will not always be associated with a corresponding gene mutation and is only a diagnostic aid.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumor; Platelet-derived growth factor receptor α gene; Proto-oncogene C-kit; Gene mutation; Western blotting; Single strand conformation polymorphism

Wang YL, Zhao XR, Bai CG, Yang L, Ma DL. Relationship of Platelet-derived growth factor receptor α and C-kit gene mutations and expression in gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2300-2305

摘要

目的: 检测胃肠道间质瘤(GIST)中PDGFR α 和C-kit基因突变及其蛋白表达的关系及在肿瘤形成中的作用。

方法: 采用单链象多态性聚合酶链式反应(PCR-SSCP), 免疫组化和蛋白印迹(Western blot)方法, 检测GIST 52例中PDGFR α 和C-kit基因突变及蛋白表达情况。

结果: GIST 52例中PDGFR α 基因突变5例(9.6%), 多见于梭形细胞型的胃源性GIST, C-kit基因突变28例(53.8%), 多发生于小肠, 并

且这两种基因突变互相独立; PDGFR α 蛋白表达率100%, C-kit蛋白的表达率为94.2%, 突变的5例GIST PDGFR α 强于C-kit突变的GIST, 正常胃肠道组织和神经鞘瘤; 突变与C-kit蛋白表达之间没有显著相关性($P = 0.5332$), 而突变与PDGFR α 蛋白表达之间呈显著相关性($P < 0.0001$).

结论: GIST中PDGFR α 和C-kit突变在部分GIST肿瘤发生过程中发挥了重要作用; 突变位点与起源部位和组织学类型有关; 大多GIST中蛋白表达与其基因突变关系密切.

关键词: 胃肠道间质瘤; 血小板源性生长因子受体 α ; C-kit; 基因突变; 蛋白印迹; 单链构象多态性

王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈. 胃肠道间质瘤组织中PDGFR α 和C-kit基因突变和蛋白表达的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2300-2305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2300.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(GIST)是胃肠道最常见的间质肿瘤, 是完全不同于平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经鞘瘤和其他间叶源性肿瘤的实体^[1], GIST以C-kit的免疫组化表达为其典型特征. 1998年Hirota *et al*^[2]首次报道在GIST中不仅可特异性的高表达C-kit蛋白, 还存在C-kit基因的功能获得性突变. 最近的研究发现在少部分GIST中, 还存在血小板衍生生长因子受体 α (PDGFR α)基因的突变, 并发现大多数GIST中都能检测到PDGFR α 在转录水平的表达^[3-4]. PDGFR α 为一种单链跨膜糖蛋白, 与C-kit同属III型酪氨酸蛋白激酶家族. 关于PDGFR α 在GIST中的表达情况研究较少, 并且GIST中PDGFR α 和C-kit突变及与蛋白表达的关系仍不清楚. 为此, 我们对1组GIST进行PDGFR α 和C-kit突变和蛋白的检测, 分析两者的关系, 探讨他们在GIST中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-2004年资料完整、诊断明确的GIST新鲜肿瘤标本52例. 男27例, 女25例; 发病年龄23-78(中位50.5)岁; 胃间质瘤34例, 肠间质瘤16例, 肠系膜间质瘤2例; 按照肿瘤最大径可分为0-5.0 cm组26例, 5.0-10 cm组19例, ≥ 10 cm 7例; 梭形细胞型37例, 上皮细胞型5例, 混合型10例. 均经手术切除治疗, 所有患者术前均未接受化疗和放疗. 同时收集神经鞘瘤、平滑肌瘤各3例作为阴性对照.

1.2 方法

1.2.1 银染PCR-SSCP GIST组织用蛋白酶K-酚-氯仿法抽提基因组DNA进行PCR. 引物序列、大小和退火温度见文献(插入的)^[5]. 取PCR产物10 μ L与950 g/L甲酰胺变性缓冲液10 μ L和石蜡油30 μ L混合后变性, 冷却后将水相全部上样于PAGE胶电泳至指示剂二甲苯青到达胶底部. 凝胶经固定、银染、显影后观察并照相. 与正常对照相比, 凡SSCP条带有单链条带泳动变位、缺失或多带提示该标本中存在突变. PCR产物50 μ L经胶回收纯化后直接测序(上海英骏生物技术有限公司).

1.2.2 免疫组化 石蜡切片进行Envision二步法免疫组化染色. 兔抗人PDGFR α 和C-kit多克隆抗体(1:200, Santa Cruz公司; 1:100, Dako公司), Envision试剂盒(Dako公司). 每次实验设立阳性和阴性对照. 结果判定: 在组织结构良好和清晰的背景下, 阳性信号为定位于肿瘤细胞质和细胞膜上清晰的黄色或棕黄色、棕褐色颗粒状着色. $< 10\%$ 为阴性, $10\% - 50\%$ 为弱阳性, $\geq 80\%$ 为强阳性.

1.2.3 Western blot印迹 裂解抽提组织总蛋白, BCA法蛋白定量. 以各泳道50 μ g的蛋白样品电泳并转膜. 兔抗人PDGFR α 一抗和羊抗人GAPDH一抗(1:500, Santa Cruz公司)孵育过夜后加入二抗, 洗膜后进行ECL(Santa Cruz公司)化学发光, X光片曝光并显影, 定影, 分析结果.

统计学处理 应用CMH(cochran-mantel-haenszel) χ^2 检验进行统计学分析.

2 结果

2.1 PCR-SSCP检测结果 所有检测标本的PDGFR α exon18, exon12和C-kit exon11, exon9的PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶电泳中均显示为一条带, 长度分别为212, 233, 223和310 bp. 在GIST 52例中共检测出PDGFR α 基因突变5例(9.6%), exon18和exon12分别为4例(7.7%)和1例(1.9%). C-kit基因突变28例(53.8%), exon11(46.2%)和exon9(7.7%)分别为24例和4例. 19例GIST、平滑肌瘤、神经鞘瘤和正常胃肠道组织中未检测到C-kit和PDGFR α 基因突变.

2.2 测序结果 5例PDGFR α 突变经测序分析, 4例exon18突变, 2例为843位点突变异亮氨酸变为丝氨酸(I843S, ATC-TCC); 1例为839位点突变亮氨酸变为脯氨酸(L839P, CTG \rightarrow CCG); 1例为点突变和插入突变共存, 点突变为851位, 插入突变

■ 研发前沿

回顾国内外GIST的相关研究, 目前亟待研究解决的问题有: (1)GIST中PDGFR α 表达量的高低和突变类型与各病理临床指标的相关性方面无明确资料; (2)GIST中PDGFR α 和C-kit突变和蛋白表达的关系尚不明瞭; (3)GIST的生物学行为难以预测.

■ 相关报道

Hirota *et al*发现大多数GIST中都能检测到PDGFR α 在转录水平的表达, 并且在无C-kit突变的GIST中PDGFR α 的表达水平要比有C-kit突变的GIST中PDGFR α 的表达水平强, 但也可能会在无C-kit突变的GIST中PDGFR α 的表达水平较弱. 他们之间的关系还需进一步研究.

■创新盘点

关于PDGFR α 在GIST中的表达情况研究较少,并且GIST中PDGFR α 和C-kit突变及与蛋白表达的关系仍不清楚.

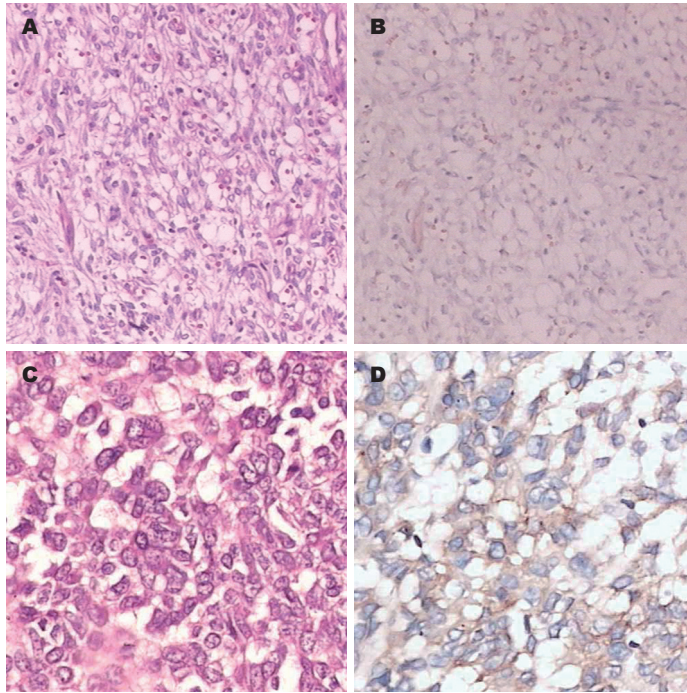


图1 间质瘤. A-B: 例17, 胃PDGFR α exon18的1843S(ATC→TCC)点突变; C-D: 例2, 直肠C-kit exon11的E561K(GAG→AAG), N567I(AAT→ATT), 1571L(ATA→CTA)的点突变; A, C: HE; B, D: C-kit.

为833和834位之间插入一个碱基G, 1例exon12突变, 585位R删除突变AGA→TGA终止密码子. C-kit exon11检测了10例, 突变均在密码子556-586之间, 其中仅点突变7例, 删除突变或删除突变和点突变都有的2例, 插入突变、删除突变和点突变都有的1例.

2.3 突变、部位和类型 5例PDGFR α 突变阳性的GIST中C-kit突变均为阴性, 28例C-kit突变阳性的GIST中PDGFR α 突变均为阴性, 19例GIST中PDGFR α 突变和C-kit突变均为阴性. 5例PDGFR α 基因突变的肿瘤均为胃源性GIST; 其中梭形细胞型4例, 混合细胞型1例. C-kit突变的肿瘤胃源性17例, 肠源性11例, 其中4例C-kit exon9突变的肿瘤均为肠源性; 梭形细胞型21例, 上皮细胞型2例, 混合细胞型4例.

2.4 免疫组化 PDGFR α 蛋白的表达率100%, GIST 52例, 平滑肌瘤、神经鞘瘤和正常胃肠道组织都表达PDGFR α , 但表达强弱不同. 存在PDGFR α 基因突变的5例GIST呈强阳性表达, 无PDGFR α 基因突变的47例GIST、平滑肌瘤、神经鞘瘤和正常胃肠道组织呈弱阳性表达. C-kit蛋白的表达率为94.2%, 但在平滑肌瘤和神经鞘瘤中不表达. 在PDGFR α 基因突变的GIST 5例中C-kit蛋白强阳性表达4例, 阴性表达1例(图1A-B); 在C-kit基因突变的GIST 28例中C-kit蛋白强阳性表达24例(图1C-D), 弱阳性表达2例, 阴性表达2例. 突变与C-kit蛋白表达之间没有显著相关性($P = 0.5332$), 而突变与PDGFR α 蛋白表达

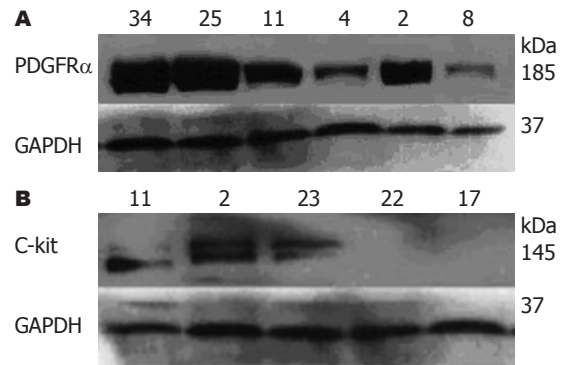


图2 蛋白表达的Western blot结果. A: PDGFR α , 2, 4, 11: C-kit exon11突变; 34: PDGFR α exon18突变; 25: PDGFR α exon12突变; 8: 神经鞘瘤; B: C-kit, 2, 11, 22, 23: C-kit exon11突变; 17: PDGFR α exon18突变.

之间呈显著相关性($P < 0.0001$, 表1).

2.5 Western blot PDGFR α 蛋白普遍表达在各种组织中, 但表达水平高低不等, 5例PDGFR α 突变的GIST均强于C-kit突变的GIST, 正常胃肠道组织和神经鞘瘤; C-kit突变的GIST, 其PDGFR α 的表达水平强弱不等, 但均弱于PDGFR α 突变的GIST(图2A). C-kit蛋白在C-kit突变的GIST中大多高表达, 但有2例C-kit突变的GIST却没有C-kit蛋白的表达; 5例PDGFR α 突变的GIST中C-kit蛋白表达阴性或弱阳性(图2B).

3 讨论

PDGFR α 基因定位与C-kit极为相近, 均位于人类4q12-13, 他的产物: PDGFR α 为一种单链跨膜

表 1 突变和蛋白表达的关系

突变	n	C-kit					PDGFR α			
		强阳性	弱阳性	阴性	χ^2	P	强阳性	弱阳性	χ^2	P
C-kit	28	24	2	2	0.3882	0.5332	0	28	32.0000	<0.0001
PDGFR α	5	4	0	1			5	0		
合计	33	28	2	3			5	28		

糖蛋白, 分子质量185 kDa, 与C-kit同属III型酪氨酸蛋白激酶家族, 且结构相似. 当PDGFR α 与配体PDGF结合后可激发酪氨酸残基磷酸化, 从而调节细胞的生长、增殖、黏附、转移、分化和凋亡^[6]. 现在, 大多研究认为, 受体酪氨酸激酶C-kit的激活突变是大多数GIST发生、发展的重要分子事件^[7]. 最近, 在少数病例中又发现存在PDGFR α 功能获得性突变^[3-4], 其突变方式与C-kit突变相似, 集中在近膜区和激酶区. 提示PDGFR α 突变可能是产生GIST的另一个原因, 尤其是在C-kit突变阴性的GIST肿瘤形成过程中起重要作用.

PDGFR α 的突变类型多样, 有功能获得性突变, 也有非功能性突变, 不仅在肿瘤组织中, 在正常组织中也可发生. Corless *et al*^[8]研究并总结了1105例GIST的突变类型, 其中最多见的是exon18 D842V(约占62.6%); 其次为exon18 Del DIMH842-845和exon12 V561D(共占14.9%). 本组5例PDGFR α 突变中2例为exon18的843位点突变, 由Ile \rightarrow Ser; 1例exon12的585位删除突变, 文献中未报道过这两种类型, 其余均不在突变热点位置. 这可能与人种有关. 本组这5例突变是否为功能获得性突变, 现在还不清楚, 需体外的PDGFR α 功能分析加以证实. 本组C-kit突变类型和情况与文献[9-10]报道基本一致, 检测的10例exon11突变均在密码子556-586之间. 目前, STI571是不能手术的GIST患者的一线治疗药物, 他选择性抑制原癌基因abl, Abl-Bcr, C-kit和PDGF受体酪氨酸激酶, 从而阻断信号的传导, 达到治疗的目的^[11]. 研究发现检测突变位点对预测药物疗效可能是有用的^[11], 如C-kit exon11和PDGFR α exon12突变的GIST比C-kit exon9和PDGFR α exon18对STI571的疗效好. 另外疗效与突变类型也有关, 如Debiec-Rychter *et al*^[12]和Weisberg *et al*^[13]发现PDGFR α -D842V突变体对STI571产生耐药性, 由此引出PKC412等新药的研究.

众多研究发现, C-kit基因外显子突变率

达40%-90%, 其中exon11的突变率最高, 本组前期研究的C-kit exon11的突变率为40.4%^[14]; PDGFR α 主要有2个外显子突变, 突变率exon18(5.6%), exon12(1.5%); 剩下约12%的GIST没有这两种突变^[15]. 在本组的GIST中C-kit exon11, 9的突变率分别为46.2%和7.7%; PDGFR α 的突变率9.6%, 其中exon18(7.7%)和 exon12(1.9%); 剩下19例(36.5%)的GIST未检测到这两种突变. 说明这两种基因突变是GIST发生的重要分子机制, 但不是唯一的机制, 还存在其他机制. Miettinen *et al*^[16]和Andersson *et al*^[17]报道, 儿童、青少年和伴有神经纤维瘤 I 型(NF1)的GIST中未检测到C-kit exon9, 11, 13, 17和PDGFR α exon12, 18突变, 说明有不同的发病机制. 但是, 关于这些GIST发病机制的更进一步研究还没有进行. 另外, 突变率的不同, 可能有2种原因, 一个是用于DNA抽提的组织不同, 另一个是研究方法不同.

我们发现, GIST有PDGFR α 突变就没有C-kit突变, 与大多数研究结果相符^[18]. Wasag *et al*^[19]发现, PDGFR α 的突变大多发生于胃, 且病理形态以上皮及混合型细胞为多; 而C-kit突变多发生于小肠, 病理形态以梭形细胞为主. 并且, 黏液上皮样GIST大多有PDGFR α 的突变^[20]. 本组5例PDGFR α 突变的肿瘤均为胃源性, 但在上皮细胞型GIST中未检测到PDGFR α 突变, 这与国外文献不太相符, 可能与人种有关, 因为有关华人GIST的研究报道中, 上皮细胞型GIST均较少见^[21]. 相比更普通的C-kit原癌基因突变的GIST, 在PDGFR α 突变的GIST中, 致瘤机制由PDGFR α 代替C-kit, 因此C-kit表达减少而PDGFR α 表达是增加的. 本组PDGFR α 免疫组化结果提示其不是一种GIST特异性标记物, 但表达强度与PDGFR α 基因突变相关($P < 0.0001$). Pauls *et al*^[22]发现, 正常情况下PDGFR α 表达在肌间神经丛和施沃恩细胞的神经结体上, 但不表达在间质的卡哈尔细胞上, 当PDGFR α 突变时其蛋白就会在间质表达. 另外, 与抗体特异性较差

■应用要点

本文提示PDGFR α 和C-kit蛋白的表达并不能完全代表基因突变, 只能作为诊断GIST的辅助手段. 这些问题的深入探讨必将为GIST在今后临床病理诊断及靶向治疗提供重要的科学依据.

■名词解释

血小板衍生生长因子受体 α (PDGFR α): 是一种单链跨膜糖蛋白, 分子质量185 kDa, 与C-kit同属III型酪氨酸蛋白激酶家族, 且结构相似。

也有关, 目前众多学者^[23]还没有找到有意义和可重复的商业化抗体, 因此, PDGFR α 抗体仍未应用于临床. 本组病例C-kit蛋白免疫组化及突变与蛋白表达的关系($P = 0.5332$)显示与以往文献^[2,24]报道一致, 即C-kit基因突变一般不影响其蛋白产物的表达. 进一步分析2例无C-kit蛋白表达的GIST, 均发现有C-kit基因突变, 但突变方式未检测. 原因可从2个方面解释: (1)用免疫组化所检测的C-kit蛋白包括野生型和突变型; (2)C-kit基因突变会引起他的生物学功能发生改变, 但此时不影响他在免疫组化中的染色^[25]. 进一步用免疫印迹发现这2例C-kit蛋白表达仍为阴性, 其生物学基础还不清楚, 有学者认为, 可能是突变片段太大导致的蛋白失表达^[26]. 另外可能也有技术的原因.

本组蛋白表达的半定量分析结果与Hirota *et al*^[4], Sokurai *et al*^[20]和Kang *et al*^[27]的文献报道相似, 这说明蛋白表达与相应基因的突变联系密切, 即PDGFR α 的突变与PDGFR α 的活性表达水平直接相关, 激活蛋白的不同表达水平也在III型受体酪氨酸激酶家族的下游起重要作用, 这样我们可以根据蛋白表达水平预测突变情况来指导临床用药. 另外, 本组还发现, 有时基因突变和蛋白表达是不同步的, 在PDGFR α 突变的GIST中C-kit蛋白也表达, 在2例C-kit突变的GIST中却没有C-kit蛋白的表达. 这与有些学者^[6]的发现相符, 即虽然两种基因突变相对独立发生, 他们的蛋白表达与基因突变关系密切, 但他们的蛋白表达有时是相互重叠的. 所以蛋白的表达并不能完全代表基因突变, 只能作为诊断GIST的辅助手段.

总之, PDGFR α 基因突变率为9.6%, 多见于梭形细胞型的胃源性GIST, 并且GIST中PDGFR α 和C-kit突变是相互独立的. 大多GIST中PDGFR α 的蛋白表达与其基因突变关系密切, 但是存在PDGFR α 突变的肿瘤PDGFR α 和C-kit蛋白大多同时表达. 所以蛋白的表达并不能完全代表基因突变, 只能作为诊断GIST的辅助手段.

4 参考文献

- 1 Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranckx H, Scurr M, Hagemeyer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT. Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone

- 2 Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004; 40: 689-695
- 3 Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580
- 4 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFR α activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
- 5 Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003; 125: 660-667
- 6 Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechttersheimer G. The location of KIT and PDGFR α gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005; 58: 634-639
- 7 Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002; 33: 484-495
- 8 Duensing A, Heinrich MC, Fletcher CD, Fletcher JA. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest* 2004; 22: 106-116
- 9 Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC. PDGFR α mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5357-5364
- 10 Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, Nupponen NN, Joensuu H. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 49-57
- 11 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
- 12 Roskoski R Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 709-717
- 13 Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeyer A, Van Oosterom A, Marynen P. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005; 128: 270-279
- 14 Weisberg E, Wright RD, Jiang J, Ray A, Moreno D, Manley PW, Fabbro D, Hall-Meyers E, Catley L, Podar K, Kung AL, Griffin JD. Effects of PKC412, nilotinib, and imatinib against GIST-associated PDGFR α mutants with differential imatinib sensitivity. *Gastroenterology* 2006; 131: 1734-1742
- 15 Feng F, Liu XH, Xie Q, Liu WQ, Bai CG, Ma DL. Expression and mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2548-2551
- 16 Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura

- N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M. c-kit and PDGFRA mutations in extragastrintestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 479-488
- 16 Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1373-1381
- 17 Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom LG. NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1170-1176
- 18 Burger H, den Bakker MA, Kros JM, van Tol H, de Bruin AM, Oosterhuis W, van den Ingh HF, van der Harst E, de Schipper HP, Wiemer EA, Nooter K. Activating mutations in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1270-1274
- 19 Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, Oosterom AV, Hagemeyer A, Sciort R. Differential expression of KIT/PDGFR mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Mod Pathol* 2004; 17: 889-894
- 20 Sakurai S, Hasegawa T, Sakuma Y, Takazawa Y, Motegi A, Nakajima T, Saito K, Fukayama M, Shimoda T. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol* 2004; 35: 1223-1230
- 21 Li CF, Chuang SS, Lu CL, Lin CN. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) in southern Taiwan: a clinicopathologic study of 93 resected cases. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 1-9
- 22 Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Buttner R, Wardelmann E. PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 2005; 46: 166-175
- 23 Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 889-894
- 24 Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF Jr. Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 1999; 18: 1897-1902
- 25 马大烈, 刘晓红, 蔡在龙, 谢强. 胃肠道间质瘤中原癌基因c-kit突变及其蛋白表达. *中华肿瘤杂志* 2002; 24: 461-464
- 26 侯英勇, 孙孟红, 谭云山, 魏永昆, 陆孝禹, 张大明, 杜祥, 王坚, 朱雄增. 胃肠道间质瘤c-kit基因突变的研究. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 89-92
- 27 Kang HJ, Nam SW, Kim H, Rhee H, Kim NG, Kim H, Hyung WJ, Noh SH, Kim JH, Yun CO, Liu ET, Kim H. Correlation of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2005; 24: 1066-1074

■同行评价

本文应用分子生物学技术检测了在52例GIST病理标本中PDGFR α 和C-kit突变和蛋白表达的变化, 研究方法和技术较先进, 结果较客观, 对深入认识我国GIST患者的临床病例特点有一定的借鉴价值, 能较好地反映我国胃肠病学临床基础研究的先进水平。

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)

*H pylori*感染及根除对慢性糜烂性胃炎患者IL-18水平的影响

张卫平, 朱金水, 王如华, 孙群, 张强, 陈尼维

■背景资料

关于IL-18的研究近几年颇多. IL-18与胃肠道疾病的关系也有相关报道.

张卫平, 朱金水, 王如华, 孙群, 张强, 陈尼维, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233

张卫平, 硕士生, 研究方向胃癌及癌前疾病的基础与临床.

通讯作者: 朱金水, 200233, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com

电话: 021-64369181

收稿日期: 2007-05-29 修回日期: 2007-07-16

Effects of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on IL-18 level in chronic erosive gastritis patients

Wei-Ping Zhang, Jin-Shui Zhu, Ru-Hua Wang, Qun Sun, Qiang Zhang, Ni-Wei Chen

Wei-Ping Zhang, Jin-Shui Zhu, Ru-Hua Wang, Qun Sun, Qiang Zhang, Ni-wei Chen, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Professor Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2007-05-29 Revised: 2007-07-16

Abstract

AIM: To explore the effects of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on Interleukin-18 (IL-18) level in patients with chronic erosive gastritis, and to detect levels of *H pylori* IgG antibody before and after eradication.

METHODS: Sixty patients with chronic gastritis were randomly divided into two groups: chronic erosive gastritis (40 cases, group A) and chronic superficial gastritis (20 cases, group B). Group A patients who were *H pylori*-positive received triple therapy [20 mg omeprazole (Losec) plus 500 mg clarithromycin and 1000 mg amoxicillin, twice daily) for 1 week; while those positive for *H pylori* in group B were treated orally with only 20 mg omeprazole once daily until the end of week 4. Gastric endoscopy and ¹³C breath testing were performed 1 mo after anti-*H pylori* therapy. CagA-IgG, VacA-IgG, Ureases-IgG and *H pylori* IgG antibody, IL-18 were detected by Western

blotting and ELISA, respectively.

RESULTS: The levels of IL-18 were significantly different between groups A and B (267.18 ± 148.23 ng/L, and 119.31 ± 45.34 ng/L, $P < 0.05$) in *H pylori*-positive patients. *H pylori* IgG level was not related to the presence of erosion; with no significant difference between *H pylori* negative patients in groups A and group B. The levels of IL-18 and IgG antibody decreased after anti-*H pylori* therapy compared with those before therapy (267.18 ± 148.23 ng/L vs 93.82 ± 22.15 ng/L; 31.36 ± 23.26 kU/L vs 21.00 ± 9.47 kU/L; respectively, $P < 0.05$), IL-18 level showed no difference among different types of *H pylori* infection and erosion scores.

CONCLUSION: The decrease in IL-18 level after *H pylori* eradication may play a crucial role in the treatment of patients with chronic erosive gastritis.

Key Words: Chronic erosive gastritis; Interleukin-18; *Helicobacter pylori*; Efficacy

Zhang WP, Zhu JS, Wang RH, Sun Q, Zhang Q, Chen NW. Effects of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on IL-18 level in chronic erosive gastritis patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2306-2310

摘要

目的: 探讨*H pylori*感染及根除对慢性糜烂性胃炎患者IL-18水平的影响, 同时检测抗*H pylori*治疗前后抗体水平的变化.

方法: 60例上消化道患者分两组, 慢性糜烂性胃炎组(实验组)40例, 慢性浅表性胃炎组(对照组)20例. 实验组*H pylori*阳性者予口服洛赛克20 mg和克拉霉素500 mg及阿莫西林1000 mg, 1 wk后症状缓解者, 开始口服洛赛克20 mg/d至4 wk实验结束, 对照组仅口服洛赛克抗*H pylori*治疗, 1 mo后复查¹³C呼气实验和胃镜. *H pylori*免疫印迹法进行蛋白抗体分型, 同时ELISA法检测*H pylori*-IgG, IL-18水平.

结果: 治疗前*H pylori*阳性者实验组血清IL-18

水平高于对照组(267.18 ± 148.23 ng/L vs 119.31 ± 45.34 ng/L; $P < 0.05$). 抗*H pylori*治疗后慢性糜烂性胃炎患者的IL-18, 抗体水平均有明显下降(267.18 ± 148.23 ng/L vs 93.82 ± 22.15 ng/L; 31.36 ± 23.26 kU/L vs 21.00 ± 9.47 kU/L; $P < 0.05$). *H pylori*感染类型及糜烂的严重程度与IL-18水平无明显的相关性.

结论: 抗*H pylori*治疗后IL-18水平的下降在慢性糜烂性胃炎糜烂的治疗过程中发挥重要作用.

关键词: 慢性糜烂性胃炎; *H pylori*感染; IL-18; 疗效

张卫平, 朱金水, 王如华, 孙群, 张强, 陈尼维. *H pylori*感染及根除对慢性糜烂性胃炎患者IL-18水平的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2306-2310

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2306.asp>

0 引言

*H pylori*是一种革兰阴性微需氧的细菌, 他定植于人体内, 在人体内的持续性存在引起了慢性炎症的发展. 尽管过去的10 a在确认*H pylori*相关性疾病的细菌致病成分的研究中作了很大的努力, 但与慢性糜烂性胃炎相关的*H pylori*致病成分知之甚少^[1-4]. 关于*H pylori*的致病机制目前有诸多研究报道, 主要是集中在两方面: *H pylori*自身的毒力成分CagA蛋白, VacA蛋白^[5]等; *H pylori*感染后产生的胃黏膜上皮的免疫和炎症反应损伤作用^[6]. 许多研究证明*H pylori*感染患者血清细胞因子水平显著改变. 目前有关的研究的细胞因子主要有IL-6, 8, 10, 1, IFN- γ , TNF- α 等而关于IL-18的研究较少^[7-8]. 另有报道认为*H pylori*感染患者的胃癌发生率与血清抗体有明显的相关性, 事实上所有的*H pylori*感染患者都产生IgG抗体, 且抗体持续一定时间存在^[9-13]. 而关于*H pylori*的抗体水平与糜烂性胃炎的相关研究国内外少见报道, 本文以慢性糜烂性胃炎患者为基础研究*H pylori*感染与否及不同毒力类型感染与IL-18的关系, 同时观察治疗前后IL-18, 抗体水平的变化关系.

1 材料和方法

1.1 材料 经电子胃镜证实慢性糜烂性胃炎患者40例, 浅表性胃炎患者20例, 均由同一位经验胃镜医师操作. 1 mo内均存在下列上消化道症状之一: 上腹不适、腹痛、腹胀、暖气、反酸、早饱、恶心、呕吐、厌食. 结合病史不符合下列排除标准之一: (1)妊娠; (2)既往接受过抗

*H pylori*治疗或使用过非甾体抗炎药(NASID); (3)1 mo内未服用过以下药物: 抗生素, 质子泵抑制剂, 铋剂, 类固醇激素, 免疫抑制剂; (4)饮酒等所致的糜烂形成. 免疫印迹试剂盒由上海元古科技发展有限公司提供. *H pylori*-IgG抗体ELISA法试剂盒购自biocheck inc公司. IL-18 ELISA试剂盒购自MBL(medical biological laboratories co.LTD)公司

1.2 方法

1.2.1 胃镜常规操作 胃窦2块取自距幽门2-3 cm处的大弯和小弯, 留取治疗前及治疗后1 mo静脉血3 mL, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C, 保存备测. 所有标本黏上滤纸, 放入40 g/L甲醛固定液中, 常规石蜡包埋, 5 μ m厚切片, HE染色后按悉尼标准对患者慢性胃炎进行组织学分级(5种形态学变量要分级(*H pylori*、慢性炎症、活动性、萎缩和肠化), 分成无、轻度、中度和重度4级(或0、+、++、+++)记分0、1、2、3分). 对患者糜烂程度参照慢性胃炎的内镜分型分级标准: I级: 糜烂单发, II级: 多发局部 ≤ 5 , III级: 多发广泛 ≥ 6 . Giemsa染色确认*H pylori*若可疑, 再行甲苯胺蓝染色, 两者皆阴性为*H pylori*染色阴性, 否则为染色阳性. 同时所有患者均行¹³C呼气实验检查, 呼气及染色均阳性者为*H pylori*阳性, 均阴性为*H pylori*阴性. 单一阴性或阳性者排除.

1.2.2 免疫印迹法和ELISA法 *H pylori*免疫印迹法 具体方法按说明书进行, 结果判读: 以VacA(+)和/或CagA(+)为*H pylori* I型阳性, UreA(+)和/或UreB(+)为*H pylori* II型阳性, 以上4条带均无为*H pylori*感染阴性. *H pylori*-IgG抗体和IL-18水平分别由ELISA法和双抗体夹心法检测, 具体的操作方法均按说明书进行.

统计学处理 应用SPSS11.5统计分析软件包进行统计学处理, 实验结果以mean \pm SD表示. 计数资料采用 t 检验和单因素方差分析, 治疗前后的比较采用配对 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 实验组与对照组之间IL-18水平、IgG抗体水平、年龄的相关性 *H pylori*阳性患者实验组与对照组之间的IL-18水平具有明显的差异, 阴性患者两组间差异无统计学意义, 且*H pylori*感染与否在两组的抗体水平及年龄的差异无统计学意义. *H pylori*感染患者的慢性糜烂性胃炎的形成与IL-18存在着一定的相关性(表1).

2.2 慢性糜烂性胃炎内镜分型分级 40例患者中

■ 研发前沿

*H pylori*根除后的IL-18下降在慢性糜烂性胃炎的治疗过程中具有重要作用, 具体机制需进一步研究.

■创新盘点

本文通过血清IL-18及*H pylori*抗体水平的变化来探讨IL-18、*H pylori*及糜烂性胃炎之间的关系。

表 1 两组患者*H pylori*感染与IL-18、IgG抗体、年龄相关性(mean ± SD)

分组		<i>n</i>	IL-18(ng/L)	IgG(kU/L)	年龄
实验组	<i>H pylori</i> 阳性	16	267.18 ± 148.23 ^a	31.36 ± 23.26	41.81 ± 13.98
	<i>H pylori</i> 阴性	24	109.49 ± 40.02	12.70 ± 12.24	53.33 ± 14.90
对照组	<i>H pylori</i> 阳性	7	119.31 ± 45.34	37.32 ± 14.77	33.57 ± 10.95
	<i>H pylori</i> 阴性	13	92.24 ± 25.57	6.02 ± 6.71	33.15 ± 10.70

^a*P*<0.05 vs 对照组.

I级18例, II级16, III级6例, 具体的关系见表2, 不同级别糜烂患者体内IgG和IL-18水平无明显差异, 但I与III之间患者的年龄有差异, 年龄越大糜烂程度越重. *H pylori*阳性患者经抗细菌治疗后复查胃镜见糜烂程度有不同程度的减轻.

2.3 慢性糜烂性胃炎病理分级 慢性糜烂性胃炎病理分级统计(表3), 慢性炎症程度及炎症活动性与抗体水平和IL-18水平存在相关性, 中度慢性炎症患者抗体水平和IL-18水平显著高于轻度患者, 活动者高于非活动者, 差异有统计学意义. *H pylori*感染患者免疫反应和炎症反应同时存在. *H pylori*感染存在与否与IL-18, 抗体水平及年龄相关, 差异有统计学意义. 年龄越轻越易发生*H pylori*感染. *H pylori*现症感染患者体内抗体水平高于曾感染者. *H pylori*感染患者体内细胞因子IL-18的水平高于*H pylori*阴性患者(表4).

2.4 *H pylori*抗体分型 糜烂性胃炎组不同类型*H pylori*感染患者体内的IL-18水平和年龄之间差异无统计学意义, *H pylori*的毒力不同免疫反应的程度不同, 高毒力型*H pylori*感染可产生强的免疫反应加强组织损伤, 产生的抗体成分可通过补体途径和抗体介导通路加强损伤. 但不同的毒力成分对IL-18的产生无相关性(表2).

2.5 慢性糜烂性胃炎抗*H pylori*治疗前后IL-18及抗体水平变化 慢性糜烂性胃炎组16例*H pylori*阳性患者均予抗细菌治疗, 其中2例经三联疗法治疗1 wk后呼气试验仍阳性加用铋剂治疗1 wk后呼气实验阴性, 同时复查胃镜检查组织染色*H pylori*阴性, 治疗前后患者的IL-18和抗体水平均有明显的下降(表5).

3 讨论

慢性糜烂性胃炎又称疣状胃炎或痘状胃炎, 他常和消化性溃疡、浅表性或萎缩性胃炎等伴发, 亦可单独发生. 主要表现为胃黏膜出现多个疣状、膨大皱襞状或丘疹样隆起, 直径5-10 mm, 顶端可见黏膜缺损或脐样凹陷, 中心有糜烂, 隆

表 2 慢性糜烂性胃炎组内镜分型分级与IL-18、IgG抗体、年龄相关性(mean ± SD)

	<i>n</i>	IgG(kU/L)	IL-18(ng/L)	年龄
分级				
I级	18	17.73 ± 15.49	115.02 ± 89.47	41.72 ± 13.94
II级	16	24.39 ± 24.08	187.09 ± 159.84	51.25 ± 15.09
III级	6	16.18 ± 18.11	186.47 ± 123.08	63.00 ± 8.76 ^a
分型				
I型	23	29.10 ± 21.68 ^a	204.35 ± 139.48	46.74 ± 16.57
II型	5	7.40 ± 1.91	144.35 ± 155.06	44.0 ± 6.96
未感染	12	8.34 ± 4.44	123.39 ± 47.41	57.75 ± 13.81

^a*P*<0.05 vs I级, 未感染.

表 3 慢性糜烂性胃炎组患者悉尼评分数据表(*n*(%))

分级	0分	1分	2分	3分
慢性炎症	0(0)	22(55.0)	18(45.0)	0(0)
活动性	23(57.5)	8(20.0)	10(22.5)	0(0)
萎缩	35(87.5)	5(12.5)	0(0)	0(0)
肠化	31(77.5)	8(20.5)	1(2.5)	0(0)
<i>H pylori</i> ¹	24(60.5)	15(37.5)	0(0)	1(2.5)

¹同时呼气实验检查结果一致.

起周围多无红晕, 但常伴有大小相仿的红斑, 以胃窦部多见. 由多种病因刺激所致, 如药物, 尤其是阿司匹林和非类固醇抗炎药, 克罗恩病, 以及细菌和病毒的感染. *Helicobacter pylori*是慢性糜烂性胃炎的重要致病原因之一^[14-15].

IL-18是由kuffer细胞和激活的单核巨嗜细胞在刺激因子如LPS, 革蓝阳性菌释放的外毒素和各种微生物代谢产物的刺激下产生. IL-18与许多疾病相关如: 肿瘤, 自身免疫性疾病, 克隆恩病, 关节炎等. 也有研究认为IL-18与*H pylori*相关, 该菌能诱导IL-18的产生, Day *et al*^[16]利用不同类型的*H pylori*体外作用于胃上皮细胞发现, 在*H pylori*的作用下IL-18的分泌明显增加. 同时不同类型的*H pylori*产IL-18作用无统

表 4 慢性糜烂性胃炎组悉尼评分标准与IL-18、IgG抗体、年龄相关性(mean ± SD)

分级	评分	n	年龄	IL-18(ng/L)	IgG(kU/L)
<i>H pylori</i>	0	24	53.33 ± 14.90 ^a	109.49 ± 40.02 ^a	12.70 ± 12.24 ^a
	1-3	16	41.81 ± 13.98	267.18 ± 148.23	31.36 ± 23.26
慢性炎症	1	22	50.64 ± 14.07	113.70 ± 46.24 ^a	9.26 ± 6.59 ^a
	2	18	46.39 ± 17.11	244.51 ± 151.62	33.49 ± 21.93
活动性	0	23	51.96 ± 14.68	125.29 ± 75.67 ^a	12.16 ± 12.38 ^a
	1-3	17	44.35 ± 15.82	236.52 ± 149.64	30.99 ± 22.45

^a*P*<0.05.

计学差异, Tomita *et al*^[17]也认为*cagA*基因的存在与否与*H pylori*诱导IL-18产生无明显的相关性. Toshihiko *et al*研究胃窦部和胃体部的IL-18 mRNA表达发现*H pylori*感染患者胃窦部IL-18 mRNA的表达高于未感染者, 前体和成熟IL-18 mRNA的表达在感染和未感染者中均存在, 胃体部也存在IL-18 mRNA的表达^[18]. 但具体机制尚未明确. 胃黏膜中IL-18的存在提高了TH1型细胞免疫反应, 同时增加了IFN- γ 的产生和NK细胞的毒性作用, 然而局部的IL-18可能通过提高IL-13, IL-15的产生增加TH2型体液免疫反应. IL-18在骨骼系统, 血管系统和免疫系统发挥重要作用. 在免疫系统方面, IL-18刺激TH1细胞分化、促进IFN- α , TNF- α , GM-CSF的分泌和提高NK细胞的毒性作用等. 相反IL-18与IL-12共同诱导宿主免疫系统的TH2型免疫反应, 加强炎症损伤作用, *H pylori*与IL-18共同作用于胃黏膜导致糜烂性胃炎的形成^[19-22]. 另外慢性糜烂性胃炎患者的炎症程度不同与IL-18的水平存在相关性, IL-18通过各种通路激发炎症反应过程加强组织损伤, IL-18与各种炎症因子共同招募中性粒细胞聚集. *H pylori*根除后他的致IL-18产生作用削弱, 但IL-18的降解能力弱因此即使*H pylori*根除后血清IL-18的水平仍持续一定的时间存在. 在根除*H pylori*后抗体水平有明显的下降但并不一定到正常的水平, 抗体水平能持续一定的时间存在.

我们实验研究还认为*H pylori*抗体水平与慢性糜烂性胃炎患者的炎症程度、活动性及其现症感染存在相关性, *H pylori*感染后人体体液免疫反应产生IgG抗体, 抗体水平代表着免疫反应程度, 可见免疫反应与炎症反应是共同存在于*H pylori*感染患者, 且存在协同作用, 抗体水平越高炎症反应程度越强, 中性粒细胞越聚集^[23-26]; 本实验研究了年龄因素与糜烂程度, 病理分级

■应用要点

临床上通过检测血清抗体及IL-18水平评估*H pylori*治疗的疗效及糜烂性胃炎的治疗.

表 5 慢性糜烂性胃炎组16例*H pylori*阳性患者抗*H pylori*治疗前后IL-18、IgG抗体水平的变化

分组	IgG(kU/L)	IL-18(ng/L)
治疗前	31.36 ± 23.26	267.18 ± 148.23
治疗后	21.00 ± 9.47 ^a	93.82 ± 22.15 ^a

^a*P*<0.05 vs 治疗前.

及不同类型感染者的差异, 随着年龄的增加, 糜烂程度越重, 这可能与糜烂的病程和机体免疫力有关; *H pylori*感染者与非感染者年龄存在差异, 年龄越轻越易发生*H pylori*感染, 但不同类型的感染与年龄因素无关, 这可能与饮食习惯, 经济状况等因素有关^[27-29]; 事实上局部胃黏膜的IL-18水平与血清间存在差异, 故本研究存在一定的局限性, IL-18对慢性糜烂性胃炎患者的具体作用机制尚需进一步研究.

4 参考文献

- Hatakeyama M, Brzozowski T. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2006; 11 Suppl 1: 14-20
- Sugiyama T. Development of gastric cancer associated with Helicobacter pylori infection. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54 Suppl 1: S12-20
- Basso D, Plebani M. H. pylori infection: bacterial virulence factors and cytokine gene polymorphisms as determinants of infection outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 313-337
- Kononov AV. Inflammation as a basis for Helicobacter pylori-associated diseases. *Arkh Patol* 2006; 68: 3-10
- Olivares D, Gisbert JP. Factors involved in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 374-386
- Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to H. pylori. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5593-8
- Shimada T, Terano A. Chemokine expression in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol* 1998; 33: 613-617
- Berg K, Chatterjee A, Yasmin T, Shara M, Bagchi D. Cytokine expression due to Helicobacter pylori in a tissue culture model. *Mol Cell Biochem* 2007; 300:

■同行评价

本文通过探讨血清中IL-18及*H pylori*抗体水平的变化研究了两者与糜烂性胃炎之间的关系,具有一定的先进性和科学性,得出的结果较可信,有一定的理论意义和实际应用价值。

- 171-175
- 9 Kato S, Furuyama N, Ozawa K, Ohnuma K, Iinuma K. Long-term follow-up study of serum immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies after *Helicobacter pylori* eradication. *Pediatrics* 1999; 104: e22
 - 10 Akhiani AA. The role of type-specific antibodies in colonization and infection by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 223-227
 - 11 Miernyk KM, Bruden DL, Bruce MG, McMahon BJ, Hennessy TW, Peters HV, Hurlburt DA, Sacco F, Parkinson AJ. Dynamics of *Helicobacter pylori*-specific immunoglobulin G for 2 years after successful eradication of *Helicobacter pylori* infection in an American Indian and Alaska Native population. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 85-86
 - 12 Lazebnik LB, Tsaregorodtseva TM, Serova TI, Sokolova GN, Klishina MV, Gubina AV. Antibodies to *Helicobacter pylori* in gastric diseases. *Ter Arkh* 2006; 78: 15-19
 - 13 Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, Moricke A, Vogt K, Triantafilou M, Hahn P, Schneider EM, Lepper PM. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 223-228
 - 14 Glickman JN, Antonioli DA. Gastritis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001; 11: 717-740
 - 15 Toljamo KT, Niemela SE, Karvonen AL, Karttunen TJ. Evolution of gastritis in patients with gastric erosions. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1275-1283
 - 16 Day AS, Su B, Ceponis PJ, Jones NL, Yau E, Sieveking D, Sherman PM. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-18 production in gastric epithelial (AGS) cells. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1830-1835
 - 17 Tomita T, Jackson AM, Hida N, Hayat M, Dixon MF, Shimoyama T, Axon AT, Robinson PA, Crabtree JE. Expression of Interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 2001; 183: 620-627
 - 18 Fera MT, Carbone M, Buda C, Aragona M, Panetta S, Giannone M, La Torre F, Giudice A, Losi E. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and IL-18 mRNA expression in human gastric biopsy specimens. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 963: 326-328
 - 19 Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 2003; 187: Suppl 2: S370-384
 - 20 Kawakami K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother* (1997) 2002; 25 Suppl 1: S12-19
 - 21 Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 399-410
 - 22 Ye ZB, Ma T, Li H, Jin XL, Xu HM. Expression and significance of intratumoral interleukin-12 and interleukin-18 in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1747-1751
 - 23 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H. pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 755-758
 - 24 Zhang L, Blot WJ, You WC, Chang YS, Kneller RW, Jin ML, Li JY, Zhao L, Liu WD, Zhang JS, Ma JL, Samloff IM, Correa P, Blaser MJ, Xu GW, Fraumeni JF Jr. *Helicobacter pylori* antibodies in relation to precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 627-630
 - 25 Barbosa J, Dinis-Ribeiro M, Guilherme M, Filipe T, Lomba-Viana R, Guimaraes MA, Lopes C. Use of *Helicobacter pylori*-specific antibodies in the evaluation of intestinal metaplasia and gastric dysplasia. *Br J Biomed Sci* 2003; 60: 175-179
 - 26 Bhat N, Gaensbauer J, Peek RM, Bloch K, Tham KT, Blaser MJ, Perez-Perez G. Local and systemic immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1393-1400
 - 27 Kim N. Epidemiology and transmission route of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 153-158
 - 28 Seyda T, Derya C, Fusun A, Meliha K. The relationship of *Helicobacter pylori* positivity with age, sex, and ABO/Rhesus blood groups in patients with gastrointestinal complaints in Turkey. *Helicobacter* 2007; 12: 244-250
 - 29 Kanbay M, Gur G, Arslan H, Yilmaz U, Boyacioglu S. The relationship of ABO blood group, age, gender, smoking, and *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1214-1217

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

Glypican-3蛋白在肝细胞癌患者血清和组织中的表达及意义

缪辉来, 谢贵林, 温继育, 陈念平, 陈明, 包仕廷

缪辉来, 温继育, 陈念平, 陈明, 包仕廷, 广东医学院附属医院肝胆外科 广东省湛江市 524001
谢贵林, 宁波市第二人民医院 浙江省宁波市 315000
缪辉来, 1995年广东医学院本科毕业, 2001年广东医学院硕士研究生毕业, 副教授, 副主任医师. 主要从事肝胆疾病的基础和临床研究.
广东省第二批科学事业费计划项目, No. 2004B30301001
湛江市科技招标项目, No. 20040025
通讯作者: 缪辉来, 广东省湛江市霞山区人民大道南57号, 广东医学院附属医院肝胆外科. miaohuilai@tom.com
电话: 0759-2387417 传真: 0759-2231754
收稿日期: 2006-12-10 修回日期: 2007-04-13

Glypican-3 protein expression in serum and tissues and its clinical significance in hepatocellular carcinoma

Hui-Lai Miao, Gui-Lin Xie, Ji-Yu Wen, Nian-Ping Chen, Ming Chen, Shi-Ting Bao

Hui-Lai Miao, Ji-Yu Wen, Nian-Ping Chen, Ming Chen, Shi-Ting Bao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China
Gui-Lin Xie, the Second People's Hospital of Ningbo City, Ningbo 315000, Zhejiang Province, China
Supported by: the Second Group of Scientific Project of Guangdong Province, No. 2004B30301001 and the Technological Bidding Program of Zhanjiang City, No. 20040025
Correspondence to: Hui-Lai Miao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, 57 Renmin Street, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China. miaohuilai@tom.com
Received: 2006-12-10 Revised: 2007-04-13

Abstract

AIM: To investigate glypican-3 (GPC3) protein expression and its clinical significance in serum and tissues in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Serum and tissues from 27 patients with HCC and 28 with benign liver disease were collected the day before operation. Expression of GPC3 in serum was detected by Western blotting, and expression in tissues was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: In the 27 patients with HCC, GPC3 expression in the HCC, paracarcinomatous and

non-tumor liver tissues was 81.5, 0 and 0%, respectively (HC: 23.4689, $P < 0.001$), and that in the serum before operation was 55.6%. There was no expression of GPC3 in the tissue and serum of the 28 patients with benign liver disease. The sensitivity, specificity and false-positive rates were 55.6, 100 and 0%, respectively, with serum GPC3 protein standard alone in the diagnosis of HCC. GPC3 protein expression in serum had no correlation with patient age or sex, alpha feta protein and hepatitis B surface antigen of HCC ($P > 0.05$), but was correlated with tumor size and pathological grade ($P < 0.05$).

CONCLUSION: GPC3 protein expression in serum and tissue in HCC is higher than in non-HCC tissue. There is also greater sensitivity and specificity, and over-expression of GPC3 in HCC serum, which may be of value for the early diagnosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Glypican-3; Gene expression; Diagnosis

Miao HL, Xie GL, Wen JY, Chen NP, Chen M, Bao ST. Glypican-3 protein expression in serum and tissues and its clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2311-2315

摘要

目的: 探讨肝细胞癌(HCC)患者血清和组织中Glypican-3(GPC3)蛋白的表达及临床意义。

方法: 收集HCC患者27例和肝良性病变患者28例的术前1 d空腹血清及组织标本, 采用Western blot检测血清中GPC3蛋白, 同时采用免疫组织化学SP法检测组织标本中GPC3的表达情况。

结果: 27例HCC患者HCC组织、癌旁组织和远癌肝组织中GPC3蛋白阳性的表达率分别为81.5%, 0%和0%(HC: 23.4689, $P < 0.001$), 术前血清中GPC3蛋白阳性率分别为55.6%; 28例肝良性病变患者组织和血清中阳性率均为

■背景资料

α -甲胎蛋白(AFP)是临床诊断肝细胞癌的主要手段, 但我国肝细胞癌中有30%-40%属AFP阴性, 单凭AFP用于肝细胞癌的临床诊断和普查易造成漏诊和误诊. GPC-3(GPC3)影响多种生物效应分子, 与这些肿瘤的发生、发展有密切关系. 有研究表明肝细胞癌血清中的GPC3蛋白阳性率高, GPC3能否作为满意的肝细胞癌肿瘤标记物令人关注.

0%; GPC3蛋白对HCC诊断的敏感性为55.6%, 特异性为100%, 误诊率为0%。HCC患者血清中GPC3蛋白表达与其瘤体大小和病理分级之间差异有显著性($P<0.05$), 而与患者年龄、性别、HBsAg及AFP值之间差异无显著性($P>0.05$)。

结论: GPC3蛋白在HCC患者血清和组织中有较高的表达, 对诊断HCC有较高的敏感性和特异性, 可作为HCC早期诊断的标志物。

关键词: 肝细胞癌; Glypican-3; 基因表达; 诊断

缪辉来, 谢贵林, 温继育, 陈念平, 陈明, 包仕廷. Glypican-3蛋白在肝细胞癌患者血清和组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2311-2315
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2311.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)目前仍是世界上最常见的实体肿瘤^[1-2], AFP是目前筛选、检测和随访HCC最常用的肿瘤标记物, 但仍然面临在分化程度好的HCC或退化发育的HCC可能仅有轻度或没有AFP水平升高^[3-4], 对于肿瘤直径小于1 cm的微小HCC的检出率仍不高, 约30%-40%早期、可切除性HCC患者中血清AFP可以没有明显升高, 而良性或特殊疾病等情况下AFP可为阳性^[5-6]等诸多问题, 对于HCC的诊断、特别是早期诊断还没有可靠的血清学指标. Glypican-3(GPC3)蛋白是一种膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白, 影响多种生物效应分子^[3,7-10], 在HCC中的诊断价值评估成为当今热门研究课题之一^[11-13], 本课题组发现GPC3在肝细胞癌中的表达比AFP基因更敏感, AFP表达阴性的HCC组织中表达阳性率也高^[14-15]; 但Glypican-3的特异性、灵敏度等诊断试验价值究竟如何, 能否作为满意的肝癌肿瘤标记物值得进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2005-03术后病理证实为HCC患者27例, 男23例, 女4例, 年龄23-70(平均50.7±10.7)岁. HCC大体分型、组织学分类按1982年全国肝癌协作组制定的分类标准, 病理分级按Edmondson HCC分级标准, 肝硬化命名和分类按WHO标准. 另随机收集肝良性病变患者28例的组织学和血清. 术前1 d空腹取血清标本, 立即放于4℃冰箱, 分离血清, -20℃保存待测. 组织标本均在手术中收集, 取材离体后速冻于液氮中,

并于-70℃超低温冰箱中贮存备用. 标本取材大小均约1 cm×1 cm×0.2 cm; 肿瘤组织均在原发灶取材, 避开坏死、炎症区域, 癌旁组织取自相应肿块旁2 cm, 远癌组织取自距肿块边缘5 cm以上的肝脏组织. 兔抗人GPC3多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, GAPDH、Anti-goat及anti-mouse IgG(H+L) 购自康成生物工程公司, 免疫组化试剂盒购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用链霉抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)法, GPC3一抗工作浓度1:50. 均用PBS代替一抗作阴性对照. 采用双盲法, 观察切片至少5个具有代表性高倍视野, 不少于1000个细胞, 染色以胞质中染成淡黄或棕黄色为阳性, 对免疫组化结果进行评估。

1.2.2 Western blot检测 蛋白裂解液(Brij液) 1 mol/L Tris 1 mL, 0.5 mol/L EDTA, 0.5 mol/L 0.4 mL, 5 mol/L NaCl 3mL、10% Brij 96 8.75 mL、10% NP40 1.25 mL补水至总体积为100 mL; 蛋白酶抑制剂: Leupeptin 25 μmol/L, Aprotinin 25 μmol/L, AEBSF 25 μmol/L, Brij液100 mL需加入至少两种蛋白酶抑制剂共100 μL. BCA蛋白质定量: BCATM试剂A, BCATM试剂B, BSA标准溶液(2 g/L); 配制BSA标准浓度梯度并准备BCATM工作液, 96孔板测量(标准品或样品: 工作液= 1:8)four-parameter法曲线拟合. 根据拟合标准曲线进行每个样品浓度的计算. 变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE): 制备分离胶(pH8.8), 制备积层胶(pH6.8), 样品准备, 加入电泳缓冲液, 上样, 电泳. 蛋白质转移. 膜的封闭和抗体孵育: GPC3抗体稀释比例为1:400, Anti-goat稀释比例为1:1500. GAPDH稀释比例为1:10000 anti-mouse IgG(H+L)稀释比例为1:4000. 结果检测以X光胶片曝光, 图片扫描保存为电脑文件, 并用Tanon分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。

统计学处理 应用SAS8.0 for windows软件处理, 两组间计量资料比较采用 t 检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果 GPC3蛋白阳性细胞常簇集形成克隆样区域, 阳性细胞和阴性细胞有明显的不同形态, HCC组织(A组)、癌旁组织(B组)和远癌肝组织(C组)中的表达率分别为81.5%, 0%和0%(HC: 23.4689, $P<0.001$). HCC

表 1 以病理诊断为金标准血液中GPC3蛋白诊断肝细胞癌的评价

研究试验结果	病理诊断结果		合计
	肝细胞癌	肝良性病变	
GPC3蛋白 (+)	14	0	14
GPC3蛋白 (-)	13	28	41
合计	27	28	55

灵敏度(Sen)55.6%; 特异度(Spe)100%; 假阳性(误诊率 α)0%; 假阴性(漏诊率 β)44.4%; Youden指数(正确诊断指数)0.516; 准确度76.4%; 阳性预测值(PV₊)100%; 阴性预测值(PV₋)70.3%.

组织与非HCC组织(癌旁组织和正常组织)之间的GPC3蛋白表达阳性率差异有非常显著意义($P < 0.01$, 图1A-B). 以病理诊断为金标准血清中GPC3蛋白诊断HCC结果的有效性评价见表1.

2.2 Western blot检测结果 GPC3蛋白在HCC患者、肝良性病变患者血清中的表达率分别为55.6%, 0%. 阳性结果为66 kDa的致密条带. 相对含量为0.78-2.20, 平均值为1.30, 过表达率为53.3%(图2A-B). 血清中GPC3蛋白表达和HCC患者临床、病理资料的关系见表2.

3 讨论

GPC3蛋白作为一种膜性间质蛋白, 其表达方式与生长因子(如成纤维细胞生长因子等)及其受体表达方式一致^[16-17], 能通过一系列细胞表面受体传导的信号来调节细胞形态和各种细胞行为如: 黏附、增殖、迁移、存活和分化^[3,10,18]. Hsu *et al*^[19]应用Northern blotting检测到胚胎期GPC3蛋白表达于发育中的小肠和中胚层来源组织中, 而在成人除在胎盘、卵巢、乳腺、间皮、肺及肾组织有弱表达之外, 其他正常分化组织中未发现表达^[20-24]. 同时, 有少量报道称GPC3C末端融合蛋白在HCC中有高表达^[25-26]. 我们采用了免疫组织化学SP法显示阳性染色主要位于细胞质及细胞膜, 呈细颗粒状; 阳性细胞常簇集形成克隆样区域, 阳性细胞和阴性细胞有明显的不同形态^[11], 发现81.5%的HCC组织不同程度地表达GPC3蛋白, 而正常肝细胞、胆管细胞、血管内皮细胞、Ito细胞及成纤维细胞均未见表达, 癌旁组织不表达GPC3蛋白; 我们还发现直径>5 cm HCC中GPC3蛋白的阳性表达率高于直径≤5 cm HCC中的阳性表达率($P < 0.05$), HCC组织与非HCC组织(癌旁组织和正常组织)之间的GPC3蛋白表达阳性率差异有非常显著意义($P < 0.01$), 这说明GPC3蛋白在HCC组织中有广泛而稳定

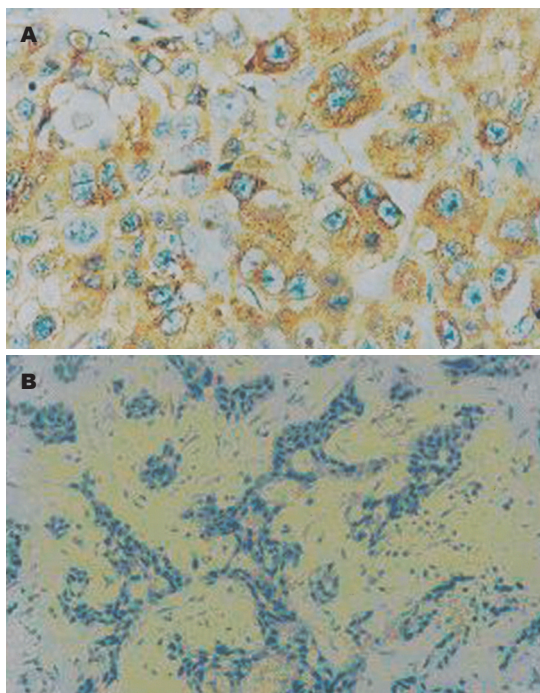


图 1 HCC GPC3蛋白表达(SP × 200). A: 阳性; B: 阴性.

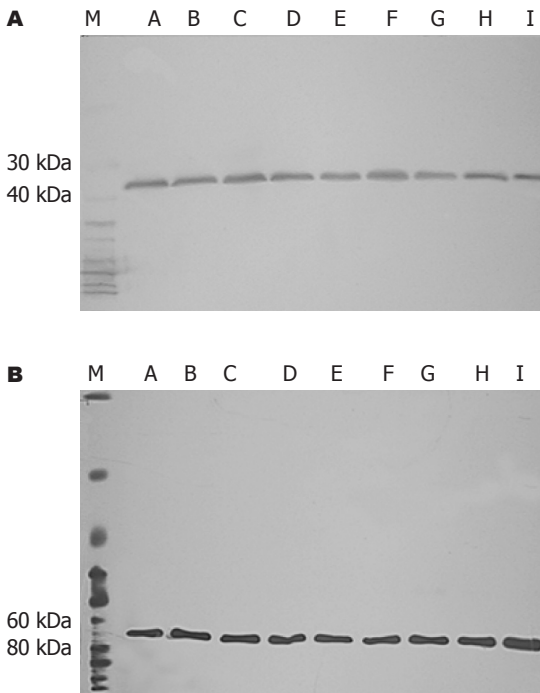


图 2 HCC血清GPC3表达. A: GAPDH; B: 肝癌.

的表达, 癌旁肝组织中未发现GPC3蛋白表达, 主要原因为GPC3蛋白作为靶基因被其他基因激活来发挥抑癌作用, 可在肝肿瘤的发生中起抑癌作用^[27-28], 假如在癌旁组织中发现该蛋白表达, 可能已有转移性卫星灶了.

有研究提示GPC3在肝细胞癌的发生、发展中是较AFP更早期的事件^[6,24,29-30], 本研究Western blot发现55.6% HCC患者血清中不同程度的表

■创新盘点

本实验进行之初尚无GPC3蛋白的商品化的ELISA检测试剂盒, 我们采用 Western blot 方法检测血清的 GPC3 蛋白水平. 通过诊断试验来探讨GPC3对HCC早期诊断的敏感性、特异性、误诊率.

■应用要点

本研究发现GPC3蛋白在HCC患者血清和组织中有较高的表达,对诊断HCC有较高的敏感性和特异性,可作为HCC早期诊断的标志物。

表 2 血清GPC3表达和HCC临床病理的关系

病理因素	n	GPC3蛋白		
		(+)	(-)	
年龄	≤50岁	14	8	6
	>50岁	13	7	6
性别	男	18	10	8
	女	9	5	4
肿瘤分级	I, II	10	3	7
	III, IV	17	12 ^a	5
血HBsAg	+	20	12	8
	-	7	3	4
血AFP	+	16	9	7
	-	11	6	5
包膜	有	8	4	4
	无	19	11	8
瘤体大小	≤5 cm	7	2	5
	>5 cm	20	13 ^a	7

^a*P*<0.05.

达GPC3蛋白,而肝良性病变患者血清中不表达GPC3蛋白.通过诊断实验的评价分析,Western bolt方法检测血清中GPC3蛋白有较高的敏感性(55.6%)和特异性(100%),有很低的误诊率,鉴别诊断价值较大.我们还发现GPC3蛋白表达与患者的性别、年龄、肝功Child分级、HBsAg、临床分期、肿瘤有无包膜、瘤灶数等并无显著相关性,而与肿块直径、病理分级等有显著相关性(*P*<0.05),GPC3蛋白在直径>5 cm HCC的阳性表达率明显高于直径≤5 cm HCC的阳性表达率;GPC3蛋白在低分化(Edmonson-Steiner III和IV级)的阳性表达率明显高于在高分化(Edmonson-Steiner I和II级)的阳性表达率.这提示检测HCC组织和/或血液中的GPC3蛋白的表达对于预测肿瘤的恶性程度、病情轻重及预后具有重要价值.GPC3蛋白作为一个特异性的肿瘤标记物,可能在细胞癌变的初始即有稳定的表达,是HCC发生的一个较早期事件,表达的质和量与HCC的直径、恶性程度大小和病程的进展有关.由此可见检测GPC3蛋白可作为诊断HCC的肿瘤特异性标记物,对区别肝脏肿瘤结节的良恶性、HCC的早期诊断上有重要意义.

4 参考文献

- 1 Tsuda M, Kamimura K, Nakato H, Archer M, Staatz W, Fox B, Humphrey M, Olson S, Futch T, Kaluza V, Siegfried E, Stam L, Selleck SB. The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 1999; 400: 276-280
- 2 Lin X, Perrimon N. Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless

- 3 signalling. *Nature* 1999; 400: 281-284
- 3 Xiang YY, Ladeda V, Filmus J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* 2001; 20: 7408-7412
- 4 Tangkijvanich P, Anukulkarnkusol N, Suwangool P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, Poovorawan Y. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 302-308
- 5 Peters MG, Farias E, Colombo L, Filmus J, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 221-232
- 6 Kwack MH, Choi BY, Sung YK. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cells* 2006; 21: 224-228
- 7 Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-1181
- 8 Li M, Choo B, Wong ZM, Filmus J, Buick RN. Expression of OCI-5/glypican 3 during intestinal morphogenesis: regulation by cell shape in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1997; 235: 3-12
- 9 Veugeliers M, Cat BD, Muylldermans SY, Reekmans G, Delande N, Frints S, Legius E, Fryns JP, Schrandt-Stumpel C, Weidle B, Magdalena N, David G. Mutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1321-1328
- 10 Kim H, Xu GL, Borczuk AC, Busch S, Filmus J, Capurro M, Brody JS, Lange J, D'Armiento JM, Rothman PB, Powell CA. The heparan sulfate proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 694-701
- 11 Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, Korc M, Kleeff J, Buchler MW. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001; 48: 558-564
- 12 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- 13 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 16-25
- 14 谢贵林, 林木生, 缪辉来, 陈念平, 陈明. Glypican-3 mRNA在人原发性肝细胞癌组织中的表达及意义. *海南医学院学报* 2005; 11: 262-265
- 15 Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 2418-2423
- 16 Grisaru S, Cano-Gauci D, Tee J, Filmus J,

- Rosenblum ND. Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis. *Dev Biol* 2001; 231: 31-46
- 17 Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 2003; 103: 455-465
- 18 Powell CA, Xu G, Filmus J, Busch S, Brody JS, Rothman PB. Oligonucleotide microarray analysis of lung adenocarcinoma in smokers and nonsmokers identifies GPC3 as a potential lung tumor suppressor. *Chest* 2002; 121: 65-75
- 19 Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res* 1997; 57: 5179-5184
- 20 Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, Song H, Testa JR, Penn LZ, Filmus J. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998; 141: 1407-1414
- 21 Pellegrini M, Pilia G, Pantano S, Lucchini F, Uda M, Fumi M, Cao A, Schlessinger D, Forabosco A. Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev Dyn* 1998; 213: 431-439
- 22 Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1999; 59: 807-810
- 23 Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, Lee WC, Ferriola PC, Jhanwar SC, Mossman BT, Filmus J, Testa JR. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene* 2000; 19: 410-416
- 24 Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt RW, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D. Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23: 496-499
- 25 丁光辉, 王红阳, 陈汉, 吴孟超. GPC3C末端融合蛋白在肝细胞癌中的分布及其临床意义. *解剖学杂志* 2001; 24: 499-503
- 26 Lu ZL, Luo DZ, Wen JM. Expression and significance of tumor-related genes in HCC. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3850-3854
- 27 Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 259-262
- 28 Sung YK, Hwang SY, Farooq M, Kim JC, Kim MK. Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling. *Exp Mol Med* 2003; 35: 257-262
- 29 Fujioka M, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Immunohistologic study on the expressions of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist II in surgically resected small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001; 34: 1128-1134
- 30 Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, Vander Borcht S, Pirenne J, Nevens F, Verslype C, van Pelt J, Roskams T. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1405-1411

■同行评价
本文研究了CPC3蛋白在肝细胞癌患者血清和组织中有较高的表达, 诊断肝癌的灵敏性, 和特异性较高. 论证有据, 层次清楚, 对基础和临床的肝癌研究有一定的指导意义.

编辑 何燕 电编 郭海丽

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.

细胞角质素19及消减基因P02在肝细胞癌组织及卵圆细胞中的表达

李蔚, 李继昌, 段芳龄

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一。对于其发病机制的研究从两方面展开: (1) 细胞学起源的探讨, 即肝细胞癌可能起源于肝内未分化的卵圆细胞的假说; 并有不少学者从肝癌组织中发现了肝卵圆细胞的存在。(2) 是HCC相关基因的研究, 如*c-myc*, *c-met*, *N-ras*, *c-fos*等。而P02基因是肝细胞癌消减cDNA文库中一个在肝细胞癌中高表达的基因, 他已作为表达序列标签(expression sequence tag, EST)登录到了GenBank/EMBL/DBJ数据库。

李蔚, 李继昌, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

段芳龄, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450006

李蔚, 1998年河南医科大学(现郑州大学医学院)本科毕业, 2003年郑州大学硕士研究生毕业, 2005级郑州大学第一附属医院消化内科博士, 讲师, 主要从事肝脏疾病的研究。

通讯作者: 李蔚, 450052, 河南省郑州大学第一附属医院消化内科。moonlanders@tom.com

电话: 0371-66862182

收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2007-05-24

Expression of cytokeratin 19 and subtractive gene P02 in hepatocellular carcinoma and oval cells

Wei Li, Ji-Chang Li, Fang-Ling Duan

Wei Li, Ji-Chang Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Fang-Ling Duan, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450006, Henan Province, China

Correspondence to: Wei Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. moonlanders@tom.com

Received: 2007-04-16 Revised: 2007-05-24

Abstract

AIM: To observe the expression of cytokeratin 19 (CK19) and subtractive gene P02 in hepatocellular carcinoma (HCC), cirrhosis of the liver and oval cells.

METHODS: An immunohistochemical streptavidin-peroxidase method was used to examine the expression of CK19 in eight normal livers, 27 with cirrhosis, and 43 HCC samples. A DIG Probe Synthesis kit was used to prepare a P02 probe using a polymerase chain reaction, and in situ hybridization was used to detect the expressions of subtractive gene P02 in 15 pairs of specimens from HCC and liver cirrhosis, and in oval cells.

RESULTS: The positive rate for CK19 in cirrho-

sis of the liver was not significantly different to that for the control group. There were significant differences between HCC and cirrhosis of the liver (69.77 vs 25.93%, $P < 0.01$). Oval cells with strongly positive staining were seen in the portal area of cirrhosis, and at the brink of a carcinoma. There were significant differences (5.74 ± 1.05 vs 10.51 ± 1.78 , $P < 0.01$) between the numbers of oval cells in cirrhosis of the liver and HCC. The positive rate for P02 in HCC and cirrhosis of the liver was 80 and 26.7%, respectively, and there was a significant difference ($P < 0.01$) between the two groups.

CONCLUSION: CK19 is associated with hepatocarcinogenesis. Oval cells are strongly positive for CK19 in cirrhosis of the liver and HCC. Oval cells are associated with regeneration of the liver, and are probably the original cells of HCC. P02 is overexpressed in HCC and plays an important role during hepatocarcinogenesis by promoting oval cell proliferation.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Cirrhosis; Oval cell; Cytokeratin 19; Subtractive gene P02; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization

Li W, Li JC, Duan FL. Expressions of cytokeratin 19 and subtractive gene P02 in hepatocellular carcinoma and oval cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2316-2321

摘要

目的: 观察细胞角质素19(CK19)及消减基因P02在肝细胞癌, 肝硬化组织及卵圆细胞中的表达情况。

方法: 采用免疫组化SP法观察8例正常肝组织, 27例肝硬化组织和43例肝细胞癌组织中CK19的表达。采用DIG-probe synthesis kit, 聚合酶链反应方法制备P02探针, 通过原位杂交方法检测P02在肝细胞癌, 肝硬化组织及卵圆细胞中的表达。

结果: CK19在肝硬化组与正常肝组织之间表达率无明显差异, 但在肝细胞癌组与肝硬

化组之间差异有显著性(69.77% vs 25.93%, $P < 0.01$). 肝硬化组织与肝细胞癌组织中CK19标记的卵圆细胞数量有显著性差异(5.74 ± 1.05 vs 10.51 ± 1.78 , $P < 0.01$). P02在肝硬化和肝细胞癌中的阳性表达率分别为26.7%和80%, 二者之间表达有显著性差异($P < 0.01$).

结论: CK19可能参与了肝硬化到肝细胞癌的癌变过程. 卵圆细胞与肝脏损伤后再生及癌变有关, 可能是P02通过促进卵圆细胞的增殖来介导肝细胞癌的发生.

关键词: 肝细胞癌; 肝硬化; 卵圆细胞; 细胞角质素19; 消减基因P02; 免疫组化; 原位杂交

李蔚, 李继昌, 段芳龄. 细胞角质素19及消减基因P02在肝细胞癌组织及卵圆细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2316-2321

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2316.asp>

0 引言

目前对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病机制的研究主要从两方面展开: 一是细胞学起源的探讨, 即肝细胞癌可能起源于肝内未分化的卵圆细胞的假说^[1]; 并有不少学者从肝癌组织中发现了肝卵圆细胞的存在^[2-4]. 卵圆细胞被证实是肝脏干细胞(stem cell)的子代细胞, 是肝干细胞的一种^[5-6]. 二是HCC相关基因的研究, 如*c-myc*, *c-met*, *N-ras*, *c-fos*等. 而P02基因是肝细胞癌(HCC)消减cDNA文库中一个在肝细胞癌中高表达的基因^[7], 他已作为表达序列标签(expression sequence tag, EST)登录到了GenBank/EMBL/DDBJ数据库, 登录号为GenBank Acc: BQ125043, GenBank Gi: 20178634, dbEST-Id: 12094454, 长度为479 bp.

我们通过免疫组化方法, 检测卵圆细胞标志物细胞角质素19(CK19)在正常肝组织, 肝硬化组织和肝细胞癌组织中的表达, 并观察卵圆细胞在不同组织中的增生状况, 以期了解卵圆细胞在肝细胞癌发生中的作用; 通过原位杂交方法, 观察P02基因在肝细胞癌中的表达定位, 检测其在卵圆细胞中是否表达, 将基因研究和肝细胞癌细胞源学说结合起来, 探讨肝细胞癌的发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 免疫组化标本源于新乡医学院病理教研室, 郑州大学第一附属医院, 第二附属医院病理科, 河南省肿瘤医院共43例肝细胞癌, 27例肝

硬化及8例肝囊肿, 血管瘤及肝硬化组织旁经病理证实为正常的蜡块或组织. 原位杂交组织标本来自郑州大学第一附属医院, 第二附属医院, 河南省肿瘤医院肝细胞癌及其对应的癌旁肝硬化组织15对(均经病理证实). 所有标本均经1 mL/L DEPC处理的无RNA酶水冲洗, 液氮速冻, -80°C 保存, 冰冻切片及HE染色. P02 EST序列 长度为479 bp, 见GenBank EST数据库(GenBank Acc: BQ125043, GenBank Gi: 20178634, dbEST-Id: 12094454); P02 EST PCR引物序列(使用软件Oligo6.44设计): 退火温度 55°C 产物长度281 bp: P02 5': 5'-AGA CCA GAA AGA GTA AAA CC-3', P02 3': 5'-TCC ACT CCA AAT AAA TCA CAG-3'.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 常规石蜡切片, HE染色. 免疫组化染色按试剂盒(北京中山公司)说明书进行: 二甲苯及梯度酒精脱蜡水化; 30 mL/L H_2O_2 , 室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 枸橼酸盐缓冲液抗原修复10 min; 正常山羊血清封闭, 室温孵育20 min; 倾去血清、勿洗、滴加一抗(CK19购自福建迈新公司)工作液, 4°C 孵育过夜; 加二抗, 室温孵育20 min; SP室温孵育20 min; DAB镜下显色2 min-5 min; 苏木精复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固. 设空白对照, 用PBS缓冲液代替一抗孵育已知阳性切片, 结果阴性.

1.2.2 P02的扩增 采用PyrobestTM DNA polymerase (TaKaRa Biotechnology Co.Ltd) 反应体系 $10 \times$ Pyroest Buffer 2.5 μL , dNTP Mixture 1.5 μL , 上游引物1.4 μL , 下游引物1.6 μL , P02 cDNA模板(本所)0.5 μL , PCR级水17.375 μL , Taq酶0.125 μL , 总体积25 μL . 将PCR-Mix混匀后, 94°C 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 45 s, 30个循环, 最后 68°C 延伸7 min.

1.2.3 P02探针制备 采用DIG-probe Synthesis kit (Roche Molecular Biochemicals), PCR方法制备探针. 反应体系为 $10 \times$ Buffer 5 μL , PCR DIG Labeling Mix 5 μL , 上游引物2.8 μL , 下游引物3.2 μL , P02 cDNA模板1 μL , PCR级水32.25 μL , Enzyme Mix 0.75 μL , 总体积50 μL . 将PCR-Mix混匀后, 94°C 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 40 s, 30个循环, 72°C 延伸7 min. 探针制备后用High Pure PCR Product Purification kit (Roche Molecular Biochemicals)纯化并测其浓度.

1.2.4 原位组织杂交(武汉博士德敏感加强性原位杂交试剂盒) 切片取出后, 用新鲜配制的

■ 研发前沿

(1)进一步研究卵圆细胞与肝坏死、再生、纤维化、硬化及癌变等病理生理过程的关系, 从而探讨对其进行定向诱导的可能; (2)以卵圆细胞作为种子细胞进行肝细胞移植, 应用于终末期肝衰竭的临床治疗.

■ 相关报道

薛玲 *et al* 在体外诱导培养卵圆细胞向肝癌细胞转化, 并研究 *c-Ha-ras*, *c-myc* 及 *Ki-ras* 癌基因表达的动态变化, 认为卵圆细胞在致癌剂的作用下, 可能成为癌前细胞, 继而在癌基因及其产物的作用下分化为多种形态的恶性肿瘤。Huang *et al* 研究 *Hoxa-13* 基因在乙型肝炎病毒/丙型肝炎病毒相关的肝癌病例中的表达情况时发现 *Hoxa-13* 基因在来源于肝干细胞的肝癌细胞系中表达, 而在来源于肝细胞及胆管细胞的肝癌细胞系中表达, 因而推测其对于肝干细胞对肝癌的转化具有重要意义。Fang *et al* 在大鼠肝癌模型中测得卵圆细胞贯穿于造模全过程, 其 *c-myc* 的表达量随肝癌的进展增高, 由此推测 *c-myc* 作为致癌基因可能对卵圆细胞恶性转化起重要作用。

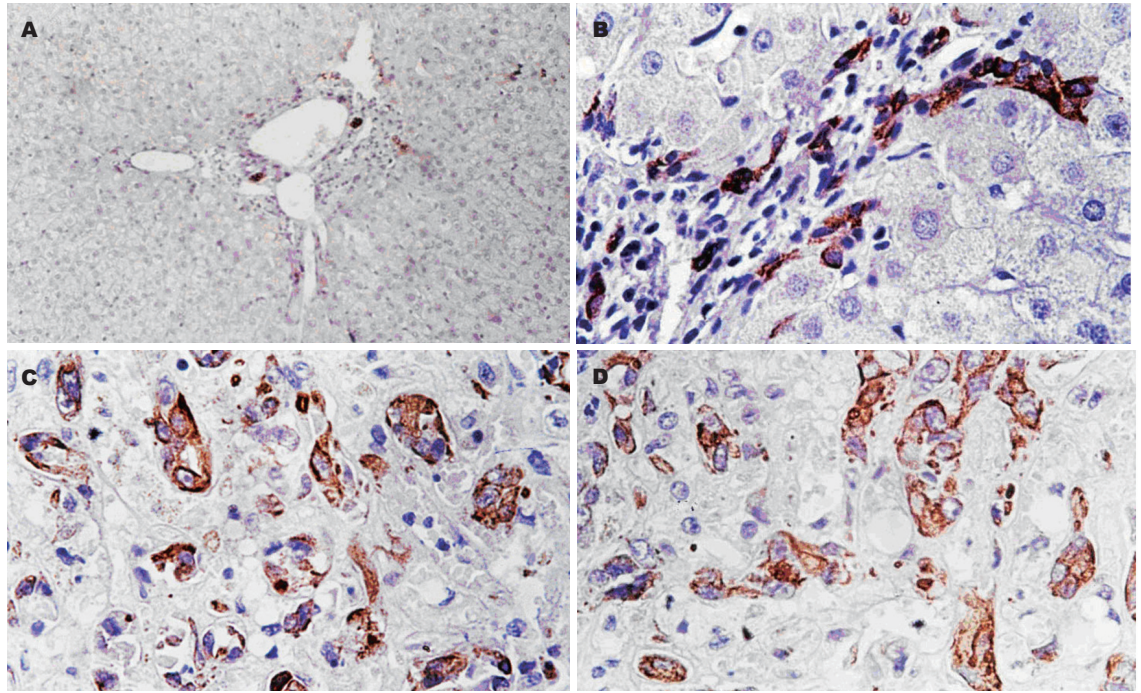


图 1 CK19在不同组织中的表达。A: 正常肝组织($\times 100$); B: 肝硬化组织($\times 400$); C: 肝细胞癌组织($\times 400$); D: 肝细胞癌组织中CK19标记的卵圆细胞($\times 400$)。

5 mL/L H_2O_2 /甲醇室温处理30 min以灭活内源性过氧化物酶; 滴加3 mL/L 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37°C 消化30-60 s, 以暴露mRNA核酸片段; 滴加预杂交液, 恒温箱41°C 预杂交3 h; P02探针于PCR仪中94°C 变性3 min后用杂交液稀释至1 $\mu\text{g/L}$ 并加至切片上, 将原位杂交专用盖玻片保护膜揭开后, 盖在切片上, 恒温箱41°C 杂交12 h-16 h; 杂交后揭掉盖玻片, 依次用37°C 水温的2 \times SSC, 0.5 \times SSC, 0.2 \times SSC洗涤; 用37°C 封闭液孵育30 min并甩去多余液体, 不洗; 依次滴加生物素化鼠抗地高辛, 37°C 60 min, SABC 37°C 20 min, 生物素化过氧化物酶37°C 20 min; 加新鲜配制的DAB; 显微镜下显色2-5 min, 棕黄色染色为阳性信号; 以PBS代替含探针杂交液为阴性对照。

1.2.5 结果判定 根据阳性细胞所占的比例及显色程度, 将染色结果分为弱阳性(+), 阳性(++), 强阳性(+++)及阴性(-)。分别为25%-50%, 50%-70%, 70%以上及小于25%的细胞着色(参照1997年全国免疫组化技术诊断标准化专题研讨会意见)。

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件进行统计学处理, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 CK19在不同类型肝组织中的表达 CK19在正

表 1 CK19在不同类型肝组织中的表达

组织学类型	阴性	阳性	<i>n</i>	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>
正常肝	8	0	8	0		
肝硬化	20	7	27	25.93%		0.166 ^{fisher}
肝细胞癌	13	30	43	69.77% ^b	12.793	0.000

Fisher's精确概率法; ^b $P < 0.01$ vs 肝硬化组。

常肝组织中, 胆管上皮细胞阳性表达, 肝细胞呈阴性表达, 在肝硬化组织中, 间质中胆管、假胆管呈阳性着色, 间质中可见强阳性着色的卵圆细胞, 肝细胞不着色, 在正常肝组织和肝硬化组之中的阳性表达率分别为0%和25.93%, 二者之间无明显差异($P > 0.05$)。在HCC中, 癌细胞, 间质中假胆管中呈阳性表达, 相对正常肝细胞呈阴性表达, 并见卵圆细胞的阳性表达(图1)。HCC的阳性表达率为69.77%, HCC和肝硬化组之间表达有显著差异($P < 0.01$, 表1)

2.2 卵圆细胞在不同肝组织中的增生状况 在正常肝组织中未见到卵圆细胞, 在20/27例肝硬化组织中, 靠近肝小叶边缘汇管区周围可见到CK19染色较深的小细胞, 体积约为正常肝细胞的1/2-1/4, 胞核呈卵圆形, 胞质稀少, 即卵圆细胞。在35/43例肝细胞癌组织中亦可见到卵圆细胞的增生, 他们位于癌巢周边, 成簇分布或散

在分布. CK19标记的卵圆细胞在肝硬化组织和肝细胞癌组织中的数量分别为 5.37 ± 1.17 和 10.45 ± 2.15 , 两者比较有显著性差异($t = 9.75$, $P < 0.01$).

2.3 P02探针浓度 合成P02探针(图2). InGenius Bio imaging system凝胶成像系统扫描并经Gene snap form syngene图像分析软件分析得出2次合成的探针的量分别为140 ng和50 ng, 上样量均为5 μ L, 计算探针浓度分别为28 mg/L和10 mg/L.

2.4 P02在不同肝组织中的表达 P02在肝硬化组织中主要定位于肝细胞中, 在肝细胞癌中主要定位于癌细胞中(图3). P02在肝硬化和肝细胞癌中的阳性表达率分别为26.7%(4/15)和80%(12/15), 二者之间表达有显著差异($\chi^2 = 8.571$, $P < 0.01$). 在13对肝硬化的汇管区和肝细胞癌癌巢周边可见到肝卵圆细胞的增殖且胞质呈强阳性染色, 所见到的肝卵圆细胞核呈卵圆形, 胞质较少, 细胞体积较小, 约相当于肝细胞体积的1/2-1/4(图3).

2.5 不同肝组织卵圆细胞数的定量比较 各标本均选取3个不重复且肝卵圆细胞比较多的区域, 400倍视野下对符合其形态特征且P02染色呈阳性的细胞进行计数, 取其均值作为该标本的卵圆细胞数P02标记的卵圆细胞在13例肝硬化组织和肝细胞癌组织中的数量分别为 5.74 ± 1.05 , 10.51 ± 1.78 , 两者比较有显著性差异($t = 9.38$, $P = 0.000$).

3 讨论

目前对于肝细胞癌的发病机制的研究主要从两方面展开, 一方面, 肝细胞癌的发生与基因的突变或异常表达有密切的关系. P02基因就是对肝癌组织和癌周肝硬化组织进行抑制性消减杂交(suppressed subtractive hybridization, SSH)时获得的在肝细胞癌中高表达的EST^[7], 通过SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)、RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术已获得了该基因的全长cDNA序列^[8], 同源性分析表明, 该基因即TPT1. 从来源背景以及他的同源类似物的研究结果强烈提示:TPT1的高表达与肿瘤有着密切的关系. 高天慧 *et al*^[9-10]构建了TPT1真核表达载体并研究了其在肝癌细胞系SMMC-7721中的表达状况, 结果提示TPT1可在肝系细胞内高效表达, 并可增强肝癌细胞系SMMC-7721的恶性表型. 另一方面是肝细胞癌的细胞学起源问题, 认为癌变由肝内未分化

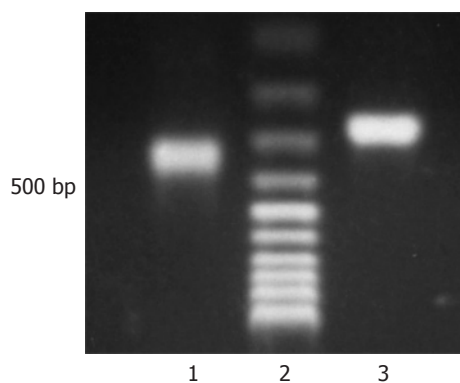


图2 P02探针. 1: 未标记P02; 2: DNA marker; 3: P02探针.

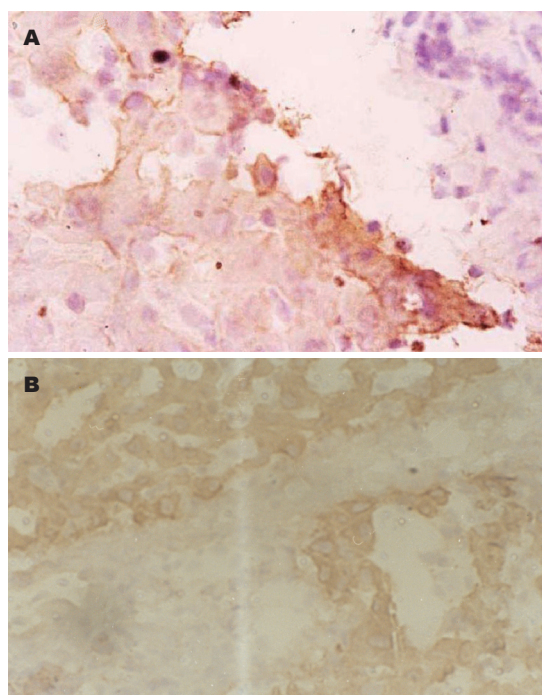


图3 P02在不同组织中的表达($\times 200$). A: 肝硬化; B: 肝癌.

的肝干细胞或卵圆细胞异常分化而来, 并根据卵圆细胞的形态, 表型特征, 癌基因表达及体外转化等大量间接证据^[11-29], 认为肝细胞癌来源于卵圆细胞.

我们实验结果提示CK19在正常肝组织中, 胆管上皮细胞阳性着色, 肝细胞无阳性着色; 在肝硬化组织中, 间质中胆管, 假胆管呈阳性着色, 间质中可见阳性着色的卵圆细胞, 肝细胞不着色. 而在肝细胞癌组织中, 癌细胞和间质中假胆管呈阳性着色, 并可见卵圆细胞强阳性着色, 表明卵圆细胞具有向上皮分化的潜能, 当分化为正常肝细胞时, 表达CK19的表型被抑制, 而当细胞癌变时就表现干细胞的某些表型, 如表达CK19; CK19在肝硬化组与正常组中的表达率相

■创新盘点

该论文利用肝细胞癌消减cDNA文库中已确定在肝细胞癌中高表达的P02基因并和肝细胞癌卵圆细胞源学说结合起来, 从独到的角度探讨肝细胞癌的发病机制, 揭示了卵圆细胞在肝细胞癌发生中的作用, 为卵圆细胞在临床的应用提供了理论依据.

■名词解释

1 干细胞: 干细胞是一类具有无限或较长的自我更新和增殖分化能力的细胞, 能产生表现型和基因型与其自身完全相同的子代细胞, 同时还能分化出定向祖细胞。

2 表达序列标签 (EST): 1991年, 美国公共卫生研究所 (NIH) 的 Adams *et al.*, 在用核苷酸自动测序仪每日分析96个模板的基础上, 开始了ESTs工作计划, 即开始运用表达序列标记法寻找新基因。为了加快速度, 通常不读出基因的全部序列, 而是得到一部分序列, 称作表达序列标签 (EST), EST要有足够长以至于能特异地标记基因。通常他含有足够的结构信息指出这个基因与其他基因的关系。

比无明显差异, 而在肝细胞癌组与肝硬化组中的表达率相比有明显差异, 表明CK19主要参与了从肝硬化到肝细胞癌的癌变过程。结合他们在卵圆细胞中的强阳性表达, 提示肝细胞癌可能起源于卵圆细胞。

在正常生理情况下及在半肝切除时, 肝脏干细胞并未激活及参与肝细胞的再生^[30]。据推测, 仅在各种内源或外源性毒素等的刺激下, 肝细胞自身的复制能力受到损害时, 肝脏的干细胞才被激活^[31]。本实验中正常肝组织中未见到卵圆细胞, 但在肝硬化组织中和肝细胞癌组织中却有卵圆细胞的存在, 且其数量在两种组织中有显著性差异, 而90%的肝细胞癌由肝硬化发展而来, 肝硬化被认为是肝细胞癌的癌前病变, 验证了卵圆细胞在肝脏损伤后再生和癌变中的作用, 进一步支持肝细胞癌的卵圆细胞源学说。

我们实验从形态学的角度探讨了P02的表达状况, 结果显示P02的表达定位于肝硬化组织肝细胞和肝细胞癌细胞中。P02在肝硬化和肝细胞癌组织中的阳性表达率分别为26.7%和80%, 二者之间表达有显著性差异 ($P < 0.01$)。由于90%的肝细胞癌发生于肝硬化, 肝硬化已被认为是肝细胞癌的癌前病变。消减基因P02在肝硬化和肝细胞癌组织中表达的显著差异性, 进一步确定其为肝细胞癌相关的差异表达基因的表达序列标签, 是一个在肝细胞癌发生发展中起重要作用的基因。实验结果还显示: 在13对肝硬化的汇管区和肝细胞癌巢周边可见到肝卵圆细胞的增殖且胞质呈强阳性染色, 所见到的肝卵圆细胞核呈卵圆形, 胞质较少, 细胞体积较小, 约相当于肝细胞体积的1/2-1/4。统计学结果显示二者的数量之间有显著性差异 ($P < 0.01$), 体现了肝细胞癌发生发展过程卵圆细胞的增殖情况, 有力的支持肝细胞癌的卵圆细胞源学说, 在卵圆细胞向肝细胞癌转化过程中, P02可能起着重要的作用。由此我们得出初步结论, P02可能通过促进卵圆细胞的增殖来介导肝细胞癌的发生。至于其具体机制还需要进一步的深入研究。

4 参考文献

- 1 Becker R, Luthgens B, Oesch F, Dienes HP, Steinberg P. Ha-rasVal12 but not p53Ser247 leads to a significant neoplastic transformation rate of the putative rat liver stem cells (oval cell). *Carcinogenesis* 1996; 17: 2635-2640
- 2 Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E. Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings. *Am J Pathol* 1996;

- 148: 321-329
- 3 Robrechts C, De Vos R, Van den Heuvel M, Van Cutsem E, Van Damme B, Desmet V, Roskams T. Primary liver tumour of intermediate (hepatocytobile duct cell) phenotype: a progenitor cell tumour? *Liver* 1998; 18: 288-293
- 4 Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999; 154: 537-541
- 5 Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33: 130-141
- 6 Petersen BE. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 590-600
- 7 朱武凌, 段芳龄, 韩有志, 刘东亮, 张玲, 马军, 白经修. 肝硬化患者发生的肝细胞癌差异表达基因文库的构建及初步筛选. *胃肠病学和肝病学杂志* 2000; 9: 252-254
- 8 高天慧, 段芳龄, 周云, 朱武凌, 韩娜, 李蔚. 肝细胞癌高表达基因片段P02的全长RACE扩增和序列分析. *胃肠病学和肝病学杂志* 2005; 14: 141-144
- 9 高天慧, 段芳龄, 周云, 孙艳, 孙嫣, 王晓. TPT1真核表达载体的构建及在肝癌细胞系SMC-7721中的表达. *中国卫生检验杂志* 2005; 15: 1070-1072
- 10 高天慧, 段芳龄, 周云, 尚佳, 孙嫣, 孙艳, 王晓. TPT1基因转染对肝癌细胞系SMC-7721生物学行为的影响. *中国误诊学杂志* 2005; 5: 3004-3007
- 11 Shupe T, Petersen BE. Evidence regarding a stem cell origin of hepatocellular carcinoma. *Stem Cell Rev* 2005; 1: 261-264
- 12 Alison MR. Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem Cell Rev* 2005; 1: 253-60
- 13 Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1093-1098
- 14 Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 2006; 12: 410-416
- 15 Yamamoto T, Uenishi T, Ogawa M, Ichikawa T, Hai S, Sakabe K, Tanaka S, Kato H, Mikami S, Ikebe T, Tanaka H, Ito S, Kaneda K, Hirohashi K, Kubo S. Immunohistologic attempt to find carcinogenesis from hepatic progenitor cell in hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 2005; 22: 364-370
- 16 Alison MR, Lovell MJ. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif* 2005; 38: 407-421
- 17 Matthews VB, Yeoh GC. Liver stem cells. *IUBMB Life* 2005; 57: 549-553
- 18 Fang CH, Zhang GQ, Zhu XY, Gong JQ. Distribution of oval cells and c-myc mRNA expression in mouse hepatocarcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 433-439
- 19 Fang CH, Gong JQ, Zhang W. Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2482-2487
- 20 Fang CH, Zhang W, Zhu XY, Gong JQ, Zhang GQ. The expression of c-kit and proliferating cell nuclear antigen in oval cells of rats with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 537-544
- 21 Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*

- 2002; 23: 435-445
- 22 龚加庆, 方驰华. 大鼠肝癌发生发展过程中肝组织增殖细胞核抗原动态演变规律. 中国普外基础与临床杂志 2007; 14: 11-14
- 23 朱言亮, 陈孝平, 张万广, 裘法祖. 大鼠实验性肝癌发生中卵圆细胞的变化. 世界华人消化杂志 2006; 29: 14-17
- 24 索金友, 顾红光, 王闯. 原发性肝癌中CK7的表达及其意义. 消化外科 2005; 4: 57-60
- 25 龚加庆, 方驰华, 李雅. 肝卵圆细胞在进行性肝损伤过程中分布及迁移的实验研究. 中国普外基础与临床杂志 2004; 11: 389-392
- 26 陈煜, 段钟平, 王宝恩, 贾继东, 陈光勇, 李忆梅. 过渡型CK19阳性表达细胞的研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 38-39
- 27 肖家诚, 金晓龙, 曾晓颖, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. 肝细胞肝癌和肝硬化组织中的卵圆细胞: 电镜与免疫电镜研究. 检验医学 2004; 9: 47-50
- 28 薛玲, 赵国强, 吴惠茜, 董郡. 卵圆细胞在实验性肝癌发生中的作用. 中山医科大学学报 1999; 20: 36-38
- 29 龚加庆, 方驰华. 大鼠卵圆细胞与原发肝癌发生的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 448-451
- 30 Sell S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 1998; 27: 317-331

■同行评价

本文论述了CK19参与了肝硬化到肝细胞癌的癌变过程, P02是一个肝细胞癌高表达的基因, 可能通过促进卵圆细胞的增殖介导肝癌细胞的发生, 文章有一定的深度, 论证可信, 层次清楚, 对肝癌的基础研究有重要参考意义.

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

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].

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

术前放疗与直肠癌术后局部复发的临床观察

郑权, 张刚庆, 王红兵, 高鹏, 卿三华

■背景资料

直肠癌在我国呈上升趋势。直肠癌的首选治疗方法为手术切除, 但局部复发和转移是影响直肠癌术后生存的主要因素。直肠癌术前放疗的效果仍存在争议, 一些研究者认为术前放疗没有必要, 只会增加并发症率和死亡率; 一些研究者认为, 术前放疗作为直肠癌综合治疗的一部分, 有助于降低术后局部复发和提高术后生存率, 能通过减少直肠癌局部复发而改善患者的生存质量。

■研究前沿

直肠癌术后局部复发除与肿瘤本身病理类型、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小、部位、淋巴结转移、分期及手术过程中的操作等主要因素有关外, 还与术前、术后的处理密切相关。针对不同情况下的直肠癌, 放射治疗的作用、是术前还是术后放疗, 以及如果术前放疗, 其放疗剂量和放疗结束后间隔多长时间进行手术等, 目前尚无定论, 是一个长期争论的问题。

郑权, 南方医科大学分校外科教研室 广东省广州市 510317
张刚庆, 王红兵, 高鹏, 广州中山大学 广东省第二人民医院
博士后科研基地普外科 广东省广州市 510317

卿三华, 广州南方医科大学南方医院普外科 广东省广州市 510317

郑权, 2002年中国人民解放军第一军医大学硕士研究生毕业, 广州南方医科大学分校外科教研室讲师, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤和乳腺肿瘤的诊治。

通讯作者: 张刚庆, 510317, 广东省广州市石榴岗路1号, 广东省第二人民医院普外科。zhanggg@hotmail.com

电话: 020-89168084 传真: 020-89168084

收稿日期: 2007-03-11 修回日期: 2007-04-21

Clinical observation of postoperative local recurrence in rectal carcinoma treated with preoperative radiotherapy

Quan Zheng, Gang-Qing Zhang, Hong-Bing Wang, Peng Gao, San-Hua Qing

Quan Zheng, Department of Surgery, Branch School of Southern Medical University, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Hong-Bing Wang, Gang-Qing Zhang, Peng Gao, Department of General Surgery, the Second people's Hospital of Guangdong Provincial Postdoctoral Workstation of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

San-Hua Qing, Department of General Surgery, Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Correspondence to: Gang-Qing Zhang, Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Guangdong Province Postdoctoral Workstation of Sun Yat-Sen University, 1 Shiliugang Road, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China. fch58520@sina.com

Received: 2007-03-11 Revised: 2007-04-21

Abstract

AIM: To explore the relationship between preoperative radiotherapy in rectal carcinoma and postoperative local recurrence.

METHODS: Patients with rectal carcinoma ($n = 762$) treated with surgery, with or without preoperative radiotherapy, were followed-up and analyzed retrospectively for postoperative local recurrence and survival rate.

RESULTS: There were 142 (18.6%) patients with postoperative local recurrence. Among these,

123 (20.9%) were not treated with preoperative radiotherapy and 19 (11.0%) were treated. There was a significantly larger difference between them ($P < 0.05$). The 5 years survival rate was 48.1% in patients not treated with preoperative radiotherapy and 58.4% in those who were treated. Further, there was a significantly larger difference between them ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Preoperative radiotherapy in rectal carcinoma can reduce local recurrence, and increase 5 year survival rate.

Key Words: Preoperative radiotherapy; Rectal carcinoma; Postoperative local recurrence

Zheng Q, Zhang GQ, Wang HB, Gao P, Qing SH. Clinical observation of postoperative local recurrence in rectal carcinoma treated with preoperative radiotherapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2322-2325

摘要

目的: 探讨直肠癌术前放疗与术后局部复发的关系。

方法: 直肠癌患者男536例, 女226例, 年龄21-73(平均48)岁; 病理分型: 高分化腺癌320例(42.0%), 中分化腺癌195例(25.6%), 黏液腺癌84例(11.0%), 乳头状腺癌40例(5.2%), 低分化腺癌50例(6.6%), 未分化癌34例(4.5%), 腺鳞癌18例(2.4%), 印戒细胞癌21例(2.7%)。分期: Duckes A期115例, B期399例, C期210例, D期38例。762例行手术($n = 589$)或手术加术前放疗($n = 173$)治疗。随访(58-143 mo), 了解术前放疗与预后的关系。

结果: 在762例中, 术后局部复发142例(18.6%)。其中术前放疗者173例中, 术后局部复发19例(11.0%), 术前未进行放疗的589例中, 局部复发123例(20.9%), 两者比较有统计学意义($P < 0.05$)。术前未进行放疗的5 a生存率48.1%, 手术前施行放疗的5 a生存率58.4%, 两者比较有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 直肠癌术前放疗可以降低术后局部复

发率, 提高5 a生存率.

关键词: 术前放疗; 直肠癌; 术后局部复发

郑权, 张刚庆, 王红兵, 高鹏, 卿三华. 术前放疗与直肠癌术后局部复发的临床观察. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2322-2325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2322.asp>

0 引言

直肠癌在我国呈上升趋势, 占结直肠癌总数的70%^[1]. 直肠癌的首选治疗方法为手术切除, 但局部复发和转移是影响直肠癌术后生存的主要因素. 术前放疗作为直肠癌综合治疗的一部分, 有助于降低术后局部复发和提高术后生存率^[2-3]. 我们1990-2002年进行的直肠癌手术762例, 作一回顾性分析以了解术前放疗对直肠癌术后局部复发和术后生存的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 我院于1990/2002年收治术后病理证实资料齐全的直肠癌患者762例, 男536例, 女226例, 年龄21-73(平均48)岁. Duckes A期115例, B期399例, C期210例, D期38例. 高分化腺癌320例(42.0%), 中分化腺癌195例(25.6%), 黏液腺癌84例(11.0%), 乳头状腺癌40例(5.2%), 低分化腺癌50例(6.6%), 未分化癌34例(4.5%), 腺鳞癌18例(2.4%), 印戒细胞癌21例(2.7%).

1.2 方法 所有患者均施行手术治疗. 其中单独施行Dixon手术者349例, Mailes手术者222例, 局部切除术者18例; 行手术加术前放疗治疗173例. 术前放疗采用CLINAC4/6X型直线加速器进行前后双野照射, 短程高剂量放疗(5 Gy×5次). 照射范围包括直肠原发病灶及盆腔内淋巴引流区, 不遗漏骶前区和会阴部, 照射野上界在第5腰椎下缘, 两侧超出真骨盆缘1.5 cm, 下界达肛缘. 放疗结束后5 d-7 d内行相应手术. 术后所有患者均常规应用5-FU静脉化疗, 1疗程6 g-8 g, 共用6-8个疗程.

统计学处理 采用Kaplan-Meier法计算生存率和局部复发率, 显著性差异差异Logrank检验和 χ^2 检验.

2 结果

随访期58-143, 中位(81) mo. 复发142例, 复发时间4 mo-41 mo, 其中1 a以内复发者45例. 单纯手术者与术前放疗1疗程后再手术者, 其术后局部

复发率和5 a生存率相比, $P<0.05$, 差异有显著性意义(表1). 肿瘤局部复发与肿瘤细胞学类型有关(表2). 与Dukes分期也有关(表3). 复发部位: 吻合口76例, 淋巴结24例, 会阴部30例, 吻合口周围16例, 切口8例.

3 讨论

直肠癌在我国呈上升趋势, 占结直肠癌总数的70%^[4-5]. 局部复发和转移是影响直肠癌术后生存的主要因素. 特别是局部复发, 约80%的患者死于局部复发而无远处转移. 有报道直肠癌术后局部复发率为15.7%, 其中腹会阴联合切除术(APR)复发率16.9%; 保留肛门低位前切除术(LAR)复发率14.3%^[6-10]. 尽管在采用直肠系膜全切除(TME)后, 局部复发率虽有下降, 但文献报道直肠癌TME后局部复发率仍在12.7%-31%^[5,8], 可见预防直肠癌根治手术的局部复发, 是临床一大难题, 对提高直肠癌的生存率有重要的临床意义.

直肠癌术后局部复发除与肿瘤本身病理类型、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小、部位、淋巴结转移、分期及手术过程中的操作等主要因素有关外, 还与术前、术后的处理密切相关^[9-15]. 荷兰大肠癌学组报道1861例直肠癌全系膜切除根治术的患者中924例加术前放疗, 937例不加放疗, 加放疗组局部复发率明显降低. Minsky *et al*^[3]报道30例低位直肠癌距肛缘1.5 cm-6.0 cm, 原均拟行Miles术, 后经术前放疗后83%完成了低位前切除结肠肛管吻合术. 可见, 直肠癌在术前或术后配合放射治疗能起到降低局部复发率的作用, 合理配合放射治疗是减少直肠癌术后复发的重要措施. 但究竟是术前还是术后放疗, 这是一个长期争论的问题^[16-18]. 有学者认为, 术前放疗优于术后放疗, 其原因是经过手术创伤后局部组织的血供受到了破坏, 在供血减少和血氧降低的条件下, 亚氮含量降低, 组织对射线的敏感性是降低的, 直接影响了放疗的疗效; 其次, 术前放射可使肿瘤缩小, 病变降期(down-staging), 从而提高肿瘤切除率和保肛成功率; 再次, 术前放疗可以避免术后直肠被切除, 有更多小肠和正常组织进入盆腔接受照射, 在肿瘤细胞尚未被杀死前, 大量血供良好的正常组织和小肠都受到了严重的伤害, 放射性直肠炎、吻合口狭窄、肠功能障碍等并发症的机率也大, 患者难以忍受, 无法完成或达到所需杀死全部残留肿瘤细胞的剂量^[19-20]. 术前放疗可使骶筋膜

■ 相关报道

Glimelius *et al*对直肠癌术前放疗+TME根治术25351例进行综合分析, 并与1996年的1504例进行比较, 结果局部复发率由28%降至10%-15%, 由此认为术前放疗能明显改善局控率, 可减少局部复发, 提高了手术切除率和保肛率, 改善了患者的生活质量, 还有望提高生存率.

■应用要点

术前放疗的剂量以及结束后间隔多长时间进行手术目前尚无定论。近年来国内国外多采用短时单次大剂量术前放疗(4-5 Gy × 5次), 放疗结束1 wk内手术。本研究中放疗组采用短时单次大剂量术前放疗(4-5 Gy × 5次), 放疗结束1 wk内手术, 效果明显, 提示术前放疗在低位直肠癌术后局部复发的预防和生存率的提高中有积极而重要的意义, 值得临床上进一步推广。

表 1 直肠癌患者手术方式及术前放疗结果 $n(\%)$

术式	术前未放疗			术前放疗		
	n	局部复发	5 a生存率	n	局部复发	5 a生存率
局部切除	18	3(16.7)	11(61.1)	5	1(20.0)	3(60.0)
Dixon术	349	57(16.3)	178(51.0)	103	7(6.8) ^a	62(60.2) ^a
Miles术	222	65(29.3)	94(42.3)	65	11(16.9) ^a	36(55.4) ^a
合计	589	123(20.9)	283(48.1)	173	19(11) ^a	101(58.4) ^a

^a $P < 0.05$ vs 术前未放疗。

表 2 直肠癌细胞学类型术前放疗与局部复发的关系 n/n

细胞学类型	n	术前未放疗	术前放疗	总(%)
高分化腺癌	296	3/296	0/296	3/296
中分化腺癌	194	13/194	0/194 ^a	13/194
低分化腺癌	55	20/55	4/55 ^a	24/55
未分化癌	37	22/37	4/37 ^a	26/37
乳头状腺癌	44	0/44	0/44	0/44
腺磷癌	19	0/19	0/19	0/19
印戒细胞癌	25	7/25	2/25 ^a	9/25
黏液腺癌	92	58/92	9/92 ^a	67/92
合计	762	123/762	19/762	142/762

^a $P < 0.05$ vs 术前未放疗。

表 3 直肠癌Dukes分期与肿瘤复发的关系 n

分期	n	术前未放疗		术前放疗	
A	115	89	1/89	26	0/26
B	399	308	51/308	91	4/91 ^a
C	210	163	61/163	47	10/47 ^a
D	38	29	10/29	9	5/9 ^a
合计	762	589	123/589	173	19/173 ^a

^a $P < 0.05$ vs 术前未放疗。

纤维化而增厚, 对骶前血管保护作用加强, 术中损伤骶前静脉机会减少, 提高手术安全性。本研究表明, 术前放疗, 在早期直肠癌(Dukes A期), 行局部切除的病例中, 其局部复发和5 a生存率上, 与同期术前不进行放疗和术后进行放疗相比, 两者无明显差异; 但在行Dixon术和Miles术的病例(Dukes B-D期)中, 术前放疗可以降低术后局部复发和提高5 a生存率, 与同期术前不进行放疗相比, 两者的差异具有统计学意义; 从直肠癌细胞学类型分析表明, 无论是高分化腺癌还是黏液腺癌, 术前放疗均可以降低术后局部复发和提高术后5 a生存率, 可见, 术前放疗可以明显降低直肠癌术后局部复发。

术前放疗的剂量以及结束后间隔多长时间进行手术目前尚无定论。有临床研究证实, 术前5次短疗程放疗对估计可以切除的直肠癌具有明显的辅助治疗效果^[21-24]。近年来国内国外多采用短时单次大剂量术前放疗(4-5 Gy × 5次), 放疗结束1 wk内手术。本研究中放疗组采用短时单次大剂量术前放疗(4-5 Gy × 5次), 放疗结束1 wk内手术, 术后5 a生存率达58.4%, 较术前未进行放疗的48.1%有明显提高, 其局部复发率由未进行放疗的20.9%下降到11%, 效果明显, 提示术前放疗在低位直肠癌术后局部复发的预防和生存率的提高中有积极而重要的意义, 值得临床上进一步推广。

4 参考文献

- Li M, Gu J. Changing patterns of colorectal cancer in China over a period of 20 years. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4685-4688
- 郁宝铭. 结直肠癌治疗的新概念——综合治疗的发展和展望. *外科理论与实践* 2003; 8: 261-264
- Minsky BD, Cohen AM, Enker WE, Paty P. Sphincter preservation with preoperative radiation therapy and coloanal anastomosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 553-559
- Minsky BD. Sphincter preservation in rectal cancer. Preoperative radiation therapy followed by low anterior resection with coloanal anastomosis. *Semin Radiat Oncol* 1998; 8: 30-35
- 郁宝铭, 吴唯勤. 新辅助化放疗与TME联合治疗局部进展期低位直肠癌. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 270-272
- Spiliotis J, Datsis A. The surgical approach to locally recurrent rectal cancer. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 1: s33-35
- Palmer G, Martling A, Cedermark B, Holm T. A population-based study on the management and outcome in patients with locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 447-454
- Wells BJ, Stotland P, Ko MA, Al-Sukhni W, Wunder J, Ferguson P, Lipa J, Last L, Smith AJ, Swallow CJ. Results of an aggressive approach to resection of locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 390-395
- 刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿. 直肠癌根治术联合放化疗的临床疗效比较. *世界华人消化杂志*

- 志 2004; 12: 1000-1002
- 10 罗琪, 张颂恩, 魏黎煜. 新辅助放疗在局部进展期低位直肠癌保留肛门括约肌的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2247-2250
 - 11 Peeters KC, van de Velde CJ, Leer JW, Martijn H, Junggeburst JM, Kranenbarg EK, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Marijnen CA. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients—a Dutch colorectal cancer group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6199-6206
 - 12 Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, Sauer R, Rodel C. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4881-4887
 - 13 Alves A, Panis Y, Mathieu P, Kwiatkowski F, Slim K, Mantion G. Mortality and morbidity after surgery of mid and low rectal cancer. Results of a French prospective multicentric study. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 509-514
 - 14 Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1114-1123
 - 15 Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 638-646
 - 16 Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. *N Engl J Med* 1997; 336: 980-987
 - 17 Ichikawa D, Yamaguchi T, Yoshioka Y, Sawai K, Takahashi T. Prognostic evaluation of preoperative combined treatment for advanced cancer in the lower rectum with radiation, intraluminal hyperthermia, and 5-fluorouracil suppository. *Am J Surg* 1996; 171: 346-350
 - 18 苏琪, 吴硕东, 袁正伟, 王伟, 殷红专, 韩霞, 刘恩卿. 直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的生物反馈治疗. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 419-423
 - 19 Hosseinalikhani M, Smedh K, Kraaz W. Is the circumferential resection margin a predictor of local recurrence after preoperative radiotherapy and optimal surgery for rectal carcinoma? *Colorectal Dis* 2007
 - 20 Lorchel F, Peignaux K, Crehange G, Bosset M, Puyraveau M, Mercier M, Bosset JF, Maingon P. Preoperative radiotherapy in elderly patients with rectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 436-441
 - 21 Cambray i Amenos M, Navarro Garcia M, Marti Rague J, Pareja Fernandez L, Pera Fabregas J. Preoperative radio-chemotherapy (RT-CT) in rectal cancer. Prospective study with postoperative RT-CT control group. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 183-191
 - 22 Lay GC, Caraul B, Dessi M, Orru S, Murtas R, Deidda MA, Farigu R, Farci D, Maxia L, Casula G, Amichetti M. Phase II study of preoperative irradiation and chemotherapy with capecitabine in patients with locally advanced rectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2007; 26: 61-70
 - 23 de Heer P, Gosens MJ, de Bruin EC, Dekker-Ensink NG, Putter H, Marijnen CA, van den Brule AJ, van Krieken JH, Rutten HJ, Kuppen PJ, van de Velde CJ. Cyclooxygenase 2 expression in rectal cancer is of prognostic significance in patients receiving preoperative radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2955-2960
 - 24 Klenova A, Georgiev R, Kurtev P, Kurteva G. Short versus conventional preoperative radiotherapy of rectal cancer: indications. *J BUON* 2007; 12: 227-232

■同行评价

本文论证了直肠癌术前放疗可以降低术后局部复发率, 提高5 a生存率, 研究手段先进, 目的明确, 数据可信, 对临床有很大的实用价值。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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.

砷对肝脏毒性及发生机制

吴君, 罗天永, 张韵, 蒋玲, 欧兵, 梁耀东, 陆爽

编者按 长期砷暴露与肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生有密切关系, 严重危害患者的健康。目前, 砷致肝病的研究越来越引起人们的重视, 但其发病机制尚未完全阐明, 这给临床防治带来较大的困难。对砷与肝损伤相关性及其发病机制的深入研究, 制定确实有效的防治措施是今后研究的方向。近年来, 随着人群流行病学的不断深入及一些基础研究认为, 砷对肝细胞的影响是多方面的, 可以通过甲基化过程、脂质过氧化、基因损伤、直接损伤肝细胞等多种途径引起肝脏损伤。该焦点论坛对以下几个方面进行了介绍: (1)砷与肝损伤及发生机制研究进展的综合评价; (2)砷致肝损伤的人群发病情况, 临床表现, 肝损伤病理改变及治疗; (3)长期砷暴露致肝纤维化的病理改变, 发生机制研究方向; (4)砷诱发产生的各种炎症反应因子与肝损伤、肝细胞凋亡; (5)砷在人体内代谢过程中产生的各种代谢产物及所诱发的脂质过氧化与肝损伤相关性。

1 砷与肝损伤及发生机制.....	2327
2 砷与肝损伤.....	2328
3 砷与肝纤维化.....	2330
4 砷致肝细胞的炎症反应及凋亡.....	2332
5 砷对肝脏的毒性及氧化损伤.....	2334

砷与肝损伤及发生机制

吴君

吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
吴君, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事各种肝病、肝纤维化和肝硬化的防治研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

通讯作者: 吴君, 550004, 贵阳医学院附属医院感染科。
wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6813394 传真: 0851-6813394

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-06-09

摘要

长期、过量摄入砷可导致暴露者出现不同程度的肝损害, 砷致肝病的研究越来越引起人们的重视。本文综述了砷对肝脏毒性的影响及有关机制的研究进展。

关键词: 砷; 肝损伤

吴君. 砷与肝损伤及发生机制. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2327

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2327.asp>

0 引言

长期砷暴露不仅可引起皮肤病变和某些周围神经系统症状, 还可累及机体诸多器官和组织引起病变, 与肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生有密切关系。目前砷与肝损伤及发生机制的研究备受关注, 涉及许多方面, 包括现场流行病学调查, 砷在肝脏的蓄积和代谢, 氧化损伤, 炎症反应及肝纤维化等, 均对砷暴露致肝损伤发生机制的研究有重要意义。

1 砷对肝脏的毒性

无机砷主要有砷酸盐(Ⅴ价砷, As^{5+})和亚砷酸盐(Ⅲ价砷, As^{3+})两种形式存在于自然界, 砷进入人体后主要在机体肝脏依靠甲基化进行代谢, 甲基化过程可产生多种中间产物, 其中一些对肝细胞具有很强的毒性, 加之砷本身为一种胞浆毒物, 可在肝细胞中蓄积, 与巯基结合, 形成稳定的络合物, 从而阻碍细胞呼吸、分裂和增殖使细胞代谢发生障碍, 是砷致肝损伤的基本过程和基本机制。其次砷在代谢过程中可产生各种自由基, 诱导脂质过氧化反应, 刺激释放各

种炎症因子, 造成氧化损伤、DNA损伤及炎症反应。第三, 长期砷暴露, 使肝损伤持续存在, 反复肝细胞炎症、坏死/凋亡, 使肝脏正常网状纤维结构破坏, 通过激活并启动肝星状细胞向肌成纤维细胞转化, 肌成纤维细胞分泌的胶原、非胶原等多种ECM会在肝内过量沉积, 导致大量纤维增生, 是砷致慢性肝炎、肝纤维化的基本机制。

2 发生机制

长期砷暴露可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌。砷对肝细胞的影响是多方面的, 可以通过甲基化过程、脂质过氧化、基因损伤、直接损伤肝细胞等多种途径引起肝脏损伤。目前砷致肝损伤发生机制的研究多局限于砷在肝脏的蓄积、代谢及氧化损伤方面, 且缺乏一个合适的砷致慢性肝损伤动物模型, 还有人群流行病学调查也仅局限一些小样本或回顾性调查, 因此, 需要建立合适的动物模型, 结合多中心前瞻性人群流行病学调查, 采用一些现代分析系统对砷与肝损伤的相关性及发生机制进行深入研究非常重要, 对砷暴露肝损伤的防治具有重要意义。

3 研究进展

贵阳医学院附属医院感染科“砷致肝纤维化发生机制的免疫及分子生物学研究”课题组, 在吴君主任医师的带领下, 经过近3 a的努力, 初步成功建立了长期自然饮用砷水小鼠慢性肝损伤模型, 并从组织水平、蛋白水平及分子生物学水平多层次对砷暴露所致肝损伤、肝纤维化的发生机制进行了系统研究, 获得了一系列的研究结果, 初步认识砷致肝损伤的发生机制, 对于该病的防治研究提供了一些理论依据, 但是, 该课题的任务还有许多工作要做, 需要进一步摸索优化动物模型, 建立砷致肝纤维化动物模型, 利用现代先进的免疫学、分子生物学分析方法从多层次、多角度揭示砷致肝损伤、肝纤维化的发生机制的研究, 具有十分重要的意义。

■背景资料

砷致肝病的研究越来越引起人们的重视, 但其发病机制尚未完全阐明, 这给临床防治带来较大的困难。重点关注长期砷暴露致人群肝损伤的临床意义、发生机制及防治的研究。相关文章对砷与肝损伤相关性的临床、发生机制及防治研究新进展进行综合、总结性的文章尚少见。

■同行评价

本文提纲挈领的概述了砷致肝损伤的关系及导致其损伤的发生机制。条理清楚, 方法先进, 文笔流畅, 水平较高, 有很重要的理论和实践意义, 对临床指导意义较大。

编辑 何燕 电编 郭海丽

砷与肝损伤

罗天永, 梁耀东, 吴君

■背景资料

长期砷暴露与肝脏损伤密切相关, 可导致暴露者出现不同程度的慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌, 严重威胁人类的健康。然而其发病机制尚未完全阐明, 这给临床防治带来较大的困难。

罗天永, 梁耀东, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科. wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6813394 传真: 0851-6813394

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-09

摘要

砷是一种环境有毒物质。近年来流行病学研究表明长期、过量摄入砷可导致暴露者出现不同程度的肝损伤, 严重危害人类健康。砷暴露致肝脏损伤的临床表现以乏力、纳差、恶心、腹痛、腹胀、肝肿大等为主, 并伴有门脉高压, 血清转氨酶升高或不升高, 肝脏活检组织病理可见广泛肝细胞及细胞器的肿胀、变性为主, 晚期则以存在不同程度肝细胞坏死及纤维增生为著。砷致肝病的研究越来越引起人们的重视。

关键词: 砷; 肝; 损伤

罗天永, 梁耀东, 吴君. 砷与肝损伤. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2328-2329

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2328.asp>

0 引言

砷为一种常见的环境毒物和已知的人类致癌物^[1], 在世界上分布广泛, 迄今我国已发现地方性砷中毒病区的省有贵州、新疆、陕西、青海、宁夏、内蒙、安徽、吉林、台湾等。人们对慢性砷中毒所构成的危害, 最初倾向于关注其引起的皮肤病变、皮肤癌, 近年来发现慢性砷中毒可导致机体诸多器官和组织发生病变, 与皮肤癌、膀胱癌、肺癌、肝癌、胃癌、前列腺癌及直肠癌等多种癌症的发生有密切关系^[2-3], 动物实验和人群流行病学调查均表明砷可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌^[3-5], 严重威胁人类健康。

1 人群流行病学调查

饮水型砷中毒和燃煤型砷中毒是环境砷中毒的两大主要类型, 近年来, 有报道肝脏损伤的病例在这两种类型砷中毒病区患者中普遍存在, 晚期

可发展为肝硬化腹水、肝癌。Santra *et al*^[6]对248例饮水型砷中毒患者调研发现190例有肝脏肿大(76.6%), 69例患者做了肝组织病理检查, 91.3%显示有非硬化性汇管区纤维化的改变。在煤含砷量高的地区, 1996年体检时发现的肝肿大发病率为33.3%, 1998-2000年的调查肝肿大发病率约50%, 肝脏B超检查异常率为46.19%^[5,7-8]。由砷引起的肝脏受损最严重的病变是肝硬化和腹水, 患者一般在腹水明显出现后大约6-12 mo后死亡。周运书 *et al*^[9]对140例燃煤型砷中毒死亡患者死因调查发现, 燃煤型砷中毒对人体各系统均有较明显的损害, 在由砷中毒所致的16种死因中, 肝硬化腹水患者死亡较为显著, 占整个死亡人数的28.57%。目前记载肝硬化腹水患者已死亡60多例, 占砷中毒死亡人数的80%以上^[8-13]。李达圣 *et al*^[14]对贵州燃煤型砷中毒病区患者恶性肿瘤死亡情况调查发现, 砷中毒患者癌症年死亡率显著高于非砷中毒组, 死亡率与总砷摄入量呈明显的剂量反应关系, 癌症构成中肝癌(30.89%)仅次于肺癌占第2位。

2 临床表现和肝组织病理学改变

砷中毒所致肝脏损伤的临床表现以乏力、纳差、恶心、腹痛、腹胀、肝肿大等为主, 并伴有门脉高压, 血清转氨酶升高或不升高, 肝脏活检组织病理研究发现, 早期表现以广泛肝细胞及细胞器的肿胀、变性为主, 中、晚期则以存在不同程度肝细胞坏死及纤维增生为著^[13,15]。对砷中毒病区190例亚急性砷中毒患者临床分析发现, 血清谷丙转氨酶(ALT)升高102例(52.85%), 血清谷草转氨酶(AST)升高60例(31.09%)^[16]。

近年来许多动物实验研究证实砷暴露可致不同程度的肝细胞损伤, 如肝细胞脂肪变性、坏死及汇管区炎性细胞浸润及纤维化。采用亚慢性毒性试验, 将大鼠灌胃染毒6 wk后光镜下观察肝组织, 染砷组肝汇管区内有炎性细胞浸润, 肝细胞脂肪变性、嗜酸性变性; 电镜观察发现, 染砷组肝细胞内有脂滴, 线粒体肿胀, 膜破坏, 粗面内质网肿胀, 脱颗粒^[17]。小鼠长期饮用含砷

■研究前沿

人群流行病学调查和动物实验均证实长期砷暴露可致肝细胞膜损伤、脂肪变性、坏死及纤维化, 对其发生机制及防治的研究已成为目前众多学者关心的热点。

的水, 4-6 mo可见肝细胞膜损伤、脂肪变性和点状坏死, 15 mo可见纤维化^[3,18]。

3 治疗进展

目前针对砷中毒致肝损伤的治疗报道较多的有拮抗剂和抗氧化物如超氧化物歧化酶(SOD)、竹荪物等对砷中毒患者的抗氧化作用及对肝、肺、肾、心等脏器的保护作用。砷对生物膜上的巯基又有较强的亲和力, 在体内As³⁺与细胞中许多巯基酶的巯基(-SH)相结合, 而锌制剂和硒制剂可与As³⁺竞争巯基来减轻对机体的毒作用, 对砷中毒肝损伤患者有较好的治疗作用^[19-20]。抗氧化剂如含SOD、竹荪、维生素C、E等可通过提高肝SOD活性及降低脂质过氧化物水平, 纠正砷所致的脂质过氧化损伤, 恢复或改善受损的肝功能^[20-21]。

国内有报道中草药制剂治疗慢性砷中毒引发肝损伤, 吴君 *et al*^[22]研究显示, 无论是通过临床表现, 还是通过用药前和用药后的肝脏活体解剖样本的组织结构来看, 复方中草药制剂汉丹肝乐对砷中毒引起的肝损伤都有明显疗效。何云 *et al*^[23]用银杏叶片治疗84例燃煤型慢性砷中毒肝损伤患者, 治疗前后血清学及病理组织学观察显示肝纤维化明显改善, 其机制可能通过拮抗血小板活化因子(PAF)诱发的系列脂质过氧化反应。

尽管目前砷与肝损伤及发病机制的研究备受关注, 但缺乏大样本多中心前瞻性流行病学调查, 且迄今尚未合适的动物模型, 因此, 需要建立合适的动物模型, 结合针对性多中心人群流行病学调查, 采用一些现代分析系统对砷与肝损伤的相关性及发生机制进行深入研究。

4 参考文献

- Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected

- inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- 黎平, 刘铭, 李达圣, 王述全. 燃煤污染型砷中毒临床症状体征分析. *中国地方病学杂志* 2000; 19: 139-141
- Santra A, Das Gupta J, De BK, Roy B, Guha Mazumder DN. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian J Gastroenterol* 1999; 18: 152-155
- 王连方, 王生玲, 朱绍濂, 周代兴, 周运书. 两型地方性砷中毒某些临床表现比较. *地方病通报* 1996; 11: 91-95
- 黄晓欣, 张爱华, 杨大平, 洪峰, 张碧霞, 罗鹏, 董学新, 郭渝成. 燃煤型砷中毒病人临床特征、多系统损害及其意义. *中国地方病学杂志* 2002; 21: 490-493
- 周运书, 杜辉, 程明亮, 刘杰, 张信江, 许玲. 燃煤型砷中毒患者死因的调查. *中国地方病学杂志* 2002; 21: 484-486
- 周代兴, 周运书, 周陈, 金冬秀, 彭建华, 罗曼玲, 朱绍康, 刘定南, 陆兴忠, 郑宝山, 龙江平. 燃煤型砷中毒病区总摄入量与病情的相关研究. *中国地方病学杂志* 1994; 13: 215-218
- 张爱华, 黄晓欣, 蒋宪瑶, 郭渝成, 罗鹏, 薛寿征. 贵州省燃煤型砷中毒研究进展. *中国公共卫生* 2000; 16: 735-736
- 周运书, 周代兴, 郑宝山, 杨大全, 罗曼林, 张洪涛, 金冬秀, 彭建华, 范健, 陈冶, 洪流, 周莹. 燃煤型砷中毒20年不同环境下的流行病学调查. *中国地方病学杂志* 1998; 17: 1-4
- 杨大平, 张爱华, 黄晓欣, 郭渝成, 王松, 郭乔楠. 燃煤型砷中毒人体肝损伤临床研究. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 89
- 李达圣, 安冬, 曾正, 朱爱华, 张锐智. 贵州燃煤型砷中毒患者患恶性肿瘤死亡观察. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 42-45
- Liu J, Zheng B, Aposhian HV, Zhou Y, Chen ML, Zhang A, Waalkes MP. Chronic arsenic poisoning from burning high-arsenic-containing coal in Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 119-122
- 赖初波, 韦应社. 亚急性砷中毒193例临床分析. *广州医科大学学报* 2003; 20: 789
- 杨瑾, 李金有, 孙天佑, 刘志艳. 亚慢性砷中毒大鼠血脂谱变化特征及机理研究. *中国地方病学杂志* 2003; 22: 107-110
- Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263
- 侯少范, 杨林生, 王五一, 李德珠, 王丽珍, 田素梅, 秦月鲜, 夏雅娟, 武克恭. 有机硒对地方性砷中毒肝脏损伤的治疗作用. *中国地方病学杂志* 2000; 19: 385-386
- 林勤, 刘继文, 张玲, 朱殿志, 徐杰新. 几种抗氧化剂拮抗染砷小鼠毒作用的实验研究. *现代预防医学* 2004; 31: 667
- 罗鹏, 吴应宽, 蒋宪瑶, 李军, 杨光红. 竹荪提取液对砷中毒小鼠肝脏的保护作用. *贵阳医学院学报* 2003; 28: 402-404
- 吴君, 陆彤, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对贵州地区20例砷暴露肝损伤患者的治疗作用. *中国地方病学杂志* 2006; 25: 86-89
- 何云, 张爱华, 杨大平, 王建宾, 韦小瑜, 黄晓欣. 银杏叶片治疗燃煤型砷中毒肝纤维化的临床研究. *西南军医* 2005; 7: 1-3

■创新盘点

本文与其他相关文章不同点在于对砷致肝损伤的人群发病情况、动物实验研究及治疗进展进行了全面综述。对近年来砷与肝脏损伤相关性方面的新认识、新进展进行了总结, 提出深入研究发生机制对防治工作的重要性。

■同行评价

本文详细综述了砷导致肝损伤的作用机制, 立题新颖, 行文流畅; 提醒了更多的医务工作者及研究者充分的重视砷中毒的严重性和研究性, 有很好的临床意义。

编辑 何燕 电编 何基才

砷与肝纤维化

欧兵, 张韵, 吴君

■背景资料

长期砷暴露可导致暴露者出现肝脏损伤、肝纤维化及肝硬化,但其发病机制尚未完全阐明,且缺乏一个适用于研究长期砷暴露致肝纤维化的动物模型。本文对砷与肝纤维化相关性及其发生机制的研究进展进行综述。

欧兵, 张韵, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科. wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6813394 传真: 0851-6813394

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-09

摘要

长期砷暴露引起的肝损伤,可进展为肝纤维化、肝硬化。对砷暴露人体和动物的肝组织病理研究发现,肝细胞呈广泛脂肪变性、坏死及汇管区炎性细胞浸润及纤维化。目前,砷致肝纤维化发生机制的研究尚少有报道,且迄今没有合适的动物模型。本文综述了砷与肝纤维化相关性及其有关机制的研究进展。

关键词: 砷; 肝脏; 纤维化

欧兵, 张韵, 吴君. 砷与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2330-2331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2330.asp>

0 引言

各种病因所致反复或持续的慢性肝实质炎症、坏死可导致肝脏持续不断的纤维增生,使以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和降解不平衡,致使过多ECM沉积于肝内引起肝纤维化^[1]。近年来,人群流行病学调查及动物实验均显示砷与肝纤维化、肝硬化的发生发展密切相关,砷暴露所致肝纤维化、肝硬化发生机制的研究逐渐成为热点。

■创新盘点

本文与其他相关文章不同点在于对砷致肝纤维化的人群发病情况、动物实验研究及发生机制研究进展进行了全面综述,且提示肝纤维化形成相关因子如TGFβ1、PDGF、TIMP-1、TIMP-2、Col-1、Col-3 mRNA、MMP-1及MMP-2参与了砷致肝纤维化的发生。

1 砷与肝纤维化

近年来,随着砷暴露引起肝纤维化、肝硬化报道的不断增多,砷致肝病的研究越来越引起人们的重视。目前,砷与肝纤维化的关系尚缺乏系统研究,多为人群流行病学和肝组织病理学研究,尚缺乏一个适用于研究长期砷暴露致肝纤维化的动物模型^[2]。

动物实验研究砷暴露鼠所导致的肝脏病理学改变发现砷可致不同程度的肝细胞损伤,如肝细胞脂肪变性、坏死及汇管区炎性细胞浸润及纤维化。杨瑾 *et al*^[3]采用亚慢性毒性试验,将

大鼠经口染毒,6 wk后光镜下观察肝组织,染砷组肝汇管区内有炎性细胞浸润,肝细胞脂肪变性、嗜酸性变性;电镜观察发现,染砷组肝细胞内有脂滴,线粒体肿胀,膜破坏,粗面内质网肿胀、脱颗粒。Santra *et al*^[4]用含砷浓度3.2 mg/L的水给鼠饮用,6 mo后发现肝细胞膜的损伤,15 mo可见少许纤维化。朱建华 *et al*^[5]用20 mg/kg体重,0.2 mL/100 g亚砷酸钠(溶于水)ig染毒大鼠,3次/wk,连续12 wk,第2,4周见中央静脉周围肝窦扩张,肝细胞浊肿,胞质疏松、点状坏死,病变以中央带明显,汇管区炎性细胞浸润、胆小管增生;第6,8周见中央和周围带出现灶状坏死,炎性细胞浸润,胆小管增生更明显,肝细胞中出现较多微小脂滴;第10,12周除上述病变外,见纤维化组织明显增生。

人群研究表明,长期摄入高砷水可导致肝脏纤维化,何云 *et al*^[6]对贵州省兴仁县交乐村65例慢性燃煤型砷中毒患者做肝穿活检,见肝汇管区内有炎性细胞浸润,肝细胞脂肪变性、嗜酸性变性,有一定坏死及再生和纤维组织增生、纤维隔形成。电镜观察发现:肝细胞内有脂滴,线粒体肿胀,膜破坏,粗面内质网肿胀,脱颗粒及胶原纤维增生明显。杨大平 *et al*^[7]对确诊为燃煤型慢性砷中毒184例患者进行了临床调研发现,燃煤型砷中毒所致肝脏损害的临床表现以乏力、纳差、恶心、腹痛、腹胀、肝肿大等为主,病理早期表现以肝细胞及细胞器的肿胀、变性为主,中、晚期则以坏死及纤维增生为主。

2 肝纤维化的发生机制

各种病因如病毒性肝炎、血吸虫病、酒精性肝损伤、代谢性肝病、化学毒性肝病、及免疫性肝病等所致肝纤维化(liver fibrosis, LF)的发生、发展和结局均类似,肝纤维化是涉及复杂的细胞因子及分子机制的动态过程,需要多种细胞的密切协作,并由多种细胞因子相互作用、相互影响组成的网络来调控。肝星状细胞^[8-10](hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化形成中起关键作用的细胞,他的激活是整个肝纤维化发生的开端。各种损肝因子引起肝细胞损

伤、坏死、凋亡及肝组织炎症反应, 激活枯否细胞分泌多种细胞因子, 随同肝细胞、血小板和窦内皮细胞等分泌的细胞因子、脂质过氧化物等化学递质共同作用于肝星状细胞, 激活一系列细胞内信号传递结构和分子, 如促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Smad家族, 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3-K)等, 最终导致基因表达的变化^[11-12]。

目前, 砷致肝纤维化发生机制的研究尚少有报道。无机砷及代谢产物对肝细胞的毒性、DNA损伤及砷诱导的脂质过氧化过程中产生多种自由基和非自由基产物, 可引起细胞功能紊乱或直接攻击细胞造成损伤^[13-14], 反复肝细胞损伤、修复, 最终向肝纤维发展。国内有对砷中毒肝损伤患者的研究发现, 肝细胞在砷的作用下大量死亡(坏死或凋亡)将破坏肝脏的正常网状纤维结构, 并启动肝星状细胞向肌成纤维细胞转化, 肌成纤维细胞分泌的胶原、非胶原等多种ECM会在肝内过量沉积, 导致大量纤维增生^[15]。

作者所在课题组, 目前正从事砷致肝纤维化发生机制的研究, 用高砷水自由饮用的方式, 小鼠10 mo小鼠肝组织病理学可见肝细胞有明显炎症细胞浸润, 肝细胞坏死、再生, 汇管区少许纤维增生, 纤维条索形成; 肝纤维化形成相关因子如TGFβ1、PDGF、TIMP-1、TIMP-2、Col-1、Col-3 mRNA在肝组织中高表达, MMP-1、MMP-2表达降低, 进一步的研究在进行中。

3 参考文献

- 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 20-85
- 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. 中国药物与临床 2005; 5: 645-647
- 杨瑾, 李金有, 孙天佑, 刘志艳. 亚慢性砷中毒大鼠血脂谱变化特征及机理研究. 中国地方病学杂志 2003; 22: 107-110
- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 朱建华, 王翔扑. 砷中毒性肝脏内砷结合物的实验研究. 湖南医学 1997; 14: 90-91
- 何云, 张爱华, 杨大平, 王建宾, 任渝江, 黄晓欣. 银杏叶片治疗燃煤型砷中毒慢性肝损害的作用及其机制研究. 中国地方病学杂志 2005; 24: 210-213
- 杨大平, 张爱华, 黄晓欣, 郭渝成, 王松, 郭乔楠. 燃煤型砷中毒人体肝损伤临床研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 89
- 高润平, 齐晓艳. 肝纤维化的发生机制与治疗进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2263-2269
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-826
- Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-77
- 黄光存, 张锦生. 肝星状细胞激活的细胞内信号转导. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1056-1060
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. 世界华人消化杂志 2000; 8: 687-689
- 安艳, 高增林. 砷甲基化代谢产物的作用机制. 职业卫生与伤病 2000; 15: 176-177
- 李富君, 孙贵范, 陆春伟, 刘淑兰, 吕秀强. 砷对小鼠肝脏氧化损伤的实验研究. 工业卫生与职业病 1999; 25: 145-148
- 杨大平, 李军, 黄晓欣, 张爱华, 何云, 谢政军. 细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1937-1939

■应用要点

长期砷暴露引起的不同程度肝脏损伤、肝纤维化及肝硬化, 对人类身体健康威胁极大, 应该重视对砷致肝纤维化发生机制及防治的研究。

■同行评价

本文就肝纤维化与砷的关系进行了阐述, 立体有一定的新颖性, 为临床上明确砷与肝纤维化的关系提供了一些前沿信息, 有一定的临床意义。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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。

砷致肝细胞的炎症反应及凋亡

张韵, 欧兵, 吴君

■背景资料

砷暴露所致肝脏损伤的发病机制尚未完全阐明, 可能与砷诱发活性氧自由基, 刺激释放与肝损伤有关的各种促炎症因子及细胞凋亡有关。本文重点对毒性砷介导的炎症反应因子及细胞凋亡与肝损伤相关性的研究进展进行综述。

张韵, 欧兵, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

通讯作者: 吴君, 550004, 贵阳医学院附属医院感染科。wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6813394 传真: 0851-6813394

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-06-30

摘要

砷致肝脏损伤的机制尚未完全清楚。研究发现, 砷可通过诱发活性氧自由基, 促发脂质过氧化, 刺激释放与肝损伤有关的各种促炎症因子在肝组织表达, 并可通过激发caspase途径引起细胞凋亡, 导致肝脏损伤。

关键词: 砷; 炎症反应; 凋亡

张韵, 欧兵, 吴君. 砷致肝细胞的炎症反应及凋亡. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2332-2333

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2332.asp>

0 引言

砷引起的慢性肝损伤过程中, 肝脏会出现脂肪变性、炎症、坏死和纤维化等病理变化^[1-4]。不同病因(如病毒、酒精、胆汁、化学物质等)所致肝细胞炎症反应、坏死及纤维化过程的发生与细胞因子网络的平衡及细胞凋亡有密切关系^[5], 这也可能是砷致慢性肝损伤的机制之一。

1 细胞因子介导的炎症损伤

细胞调节因子是一组小分子或中等分子量的可溶性蛋白质(多肽)与糖蛋白, 具有强大而多方面的生物效应。正常情况下, 细胞因子表达和分泌受机体严格的调控, 病理状态下会出现异常性表达, 表现为细胞因子及其受体的缺陷、细胞因子表达过高以及可溶性细胞因子受体的水平增加等^[6]。慢性肝病的肝组织中出现大量细胞因子, 这些细胞因子可能促进炎症反应, 介导肝细胞损伤, 使肝脏炎症持续存在。

枯否细胞(Kupffer cell)是肝内的巨噬细胞, 肝细胞损伤后, 各种刺激物, 包括脂质过氧化物、自由基、炎症因子、内毒素和病毒等都可以通过激活Kupffer细胞和淋巴细胞等, 释放多

种细胞因子, 参与炎症损伤过程^[7-8]。Kupffer细胞目前被认为是炎症反应的效应细胞, 各种损伤因素作用于肝脏, 使肝实质细胞受损, 产生脂质过氧化物^[9-10]、变性蛋白及透明质酸等, 促进Kupffer细胞表达细胞因子和化学因子, 而这些因子又可促进肝细胞和肝星状细胞(HSC)化学因子表达上调, 窦内皮细胞(SEC)、HSC的分泌增加, 导致炎症反应的发生以及过氧化物、一氧化氮的产量增加, 从而进一步释放炎症趋化因子促进Kupffer细胞的激活^[11]。

砷的毒性作用机制与其诱发活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的产生以及抑制抗氧化物的活力从而导致氧化损伤关系密切^[12-13], 活性氧等可刺激与肝损伤有关的基因表达, 释放促炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-1 α 、 β (IL-1 α 、 β)、环氧酶-2(COX-2)、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP2)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)等导致肝损伤^[14]。Liu *et al*^[15]对体内注射无机砷的大鼠肝脏进行研究, 发现砷可以明显改变与应激、DNA损伤、转录因子激活和细胞因子产生相关基因的表达。Latha *et al*^[16]研究结果显示超氧化物自由基是启动炎症反应的继发损伤因子, 即促炎症因子通过自由基来损伤细胞和组织, 进而影响器官功能, 同样氧自由基也可反向通过促进促炎症因子的释放损害机体。杨瑞瑛 *et al*^[17]在研究亚急性砷中毒的大鼠体内各脏器组织中砷的分布时发现砷在肝、脾等脏器的蓄积可诱导产生大量的炎症细胞因子, 造成明显的炎症反应, 这与在病区患者中观察到的肝脾肿大等症一致。

2 细胞凋亡

细胞凋亡(apoptosis, APO)是指在一定的生理和病理情况下, 机体为维护内环境的稳定, 通过基因调控而使细胞自动消亡的过程。凋亡存在两种主要的调控机制, 一种机制是受严格的基因调控, 如P53, ICE家族、Bcl-2家族、c-myc等^[18], 另一种机制不受基因调控, 有多种因素可以直接或间接地损伤DNA, 通过其他途径调控

■研发前沿

砷诱发产生的各种炎症反应因子与肝损伤、肝细胞凋亡的相关性为今后的研究重点。

凋亡, 如某些药物及细胞因子。

大量的研究显示自由基、细胞因子(如 TNF- α , IL-1)等是促进细胞凋亡的诱导因素, 但这些因素并不直接引起细胞凋亡, 而是通过一定的信号传递方式激活生存与死亡的相关基因如 Bcl、Bax, P53、Fas, c-fos 等, 后将信号传递到核内切酶, 执行死亡功能^[19-20]。研究发现, 砷可通过促发脂质过氧化(LPO)、TNF介导及激发 caspase 途径引起细胞凋亡^[21-22]。采用免疫组化法对燃煤型砷中毒病区 25 例砷中毒肝损伤患者肝组织凋亡相关基因的研究发现, 砷可能通过上调凋亡基因蛋白 Fas/FasL 和 Bcl-2 家族中促凋亡蛋白 Bax 的表达而启动肝细胞的胞内凋亡信号传导途径, 导致肝细胞凋亡增加^[23]。

砷致肝脏损伤的机制目前尚未完全清楚, 目前就促炎症因子在砷暴露肝损伤的作用机制报道尚少见, 其是否通过直接或氧化损伤肝细胞激活 Kupffer 细胞释放细胞因子参与肝脏炎症反应的发生, 以及细胞凋亡在砷暴露肝损伤的作用及发生机制的研究是下一步的重要课题。

3 参考文献

- Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263
- 高润平, 齐晓艳. 肝纤维化的发生机制与治疗进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2263-2269
- 吴顺华, 张跃新, 朱明, 王晓岚, 郑玉建, 王国荃. 改水 15 年后地方性砷中毒患者细胞因子水平检测分析. *新疆医科大学学报* 2004; 27: 9-11
- Berson A, Renault S, Letteron P, Robin MA, Fromenty B, Fau D, Le Bot MA, Riche C, Durand Schneider AM, Feldmann G, Pessayre D. Uncoupling of rat and human mitochondria: a possible explanation for tacrine-induced liver dysfunction. *Gastroenterology* 1996; 110: 1878-1890
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 687-689
- 刘文慧, 刘平, 徐光福, 陆雄, 熊卫国, 李风华, 刘成海. 脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 645-648
- 周馨, 李宣海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 65-68
- Enomoto N, Yamashina S, Schemmer P, Rivera CA, Bradford BU, Enomoto A, Brenner DA, Thurman RG. Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin. *Am J Physiol* 1999; 277: G671-677
- 周晓倩, 何云, 吴君. 砷中毒所致氧化应激与肝脏损伤. *中国地方病学杂志* 2007; 26: 114-116
- 熊传龙, 张秀丽, 蔡生花, 王菊, 党洪祥, 潘爱玉, 王虎. 高砷水对机体氧化与抗氧化能力的影响. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 365-366
- Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 1997; 25: 335-342
- Liu J, Xie Y, Ward JM, Diwan BA, Waalkes MP. Toxicogenomic analysis of aberrant gene expression in liver tumors and nontumorous livers of adult mice exposed in utero to inorganic arsenic. *Toxicol Sci* 2004; 77: 249-257
- Latha B, Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns* 2001; 27: 309-317
- 杨瑞瑛, 李子浩, 林勤, 王生玲, 张玲, 马品江, 朱殿志, 王连方. 砷中毒大鼠体内各脏器、组织中砷的分布. *中国地方病防治杂志* 2003; 20: 260-261
- 吕鹏, 罗和生, 余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1157-1159
- 魏红山, 李定国, 陆汉明. 细胞凋亡的信息转导机制与调节. *国外医学分子生物学分册* 2000; 22: 27
- Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology* 1998; 28: 761-767
- Ramanathan K, Anusuyadevi M, Shila S, Panneerselvam C. Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators of apoptosis on arsenic induced toxicity in rats. *Toxicol Lett* 2005; 156: 297-306
- Shi H, Hudson LG, Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 582-593
- 杨大平, 李军, 黄晓欣, 张爱华, 何云, 谢政军. 细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1937-1939

同行评价

本文初步论述了“砷致肝细胞的炎症反应及凋亡”的一些机制, 提出的问题明确, 内容具有一定的新意, 在一定程度上反映了我国或国际胃肠病学在砷致肝脏损伤方面的临床和基础研究的先进水平。

编辑 何燕 电编 郭海丽

砷对肝脏的毒性及氧化损伤

蒋玲, 陆爽, 吴君

■背景资料

目前认为氧化应激损伤为砷对肝脏毒性作用一个重要机制. 本文重点对砷在人体内代谢过程中产生的各种代谢产物及所诱发的脂质过氧化与肝损伤相关性的研究进展进行综述.

蒋玲, 贵阳医学院药理教研室 贵州省贵阳市 550004
陆爽, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
国家自然科学基金资助项目, No. 30271667
通讯作者: 吴君, 550004, 贵阳医学院附属医院感染科.
wuwuj@21cn.com
电话: 0851-6813394 传真: 0851-6813394
收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-09

摘要

砷对肝脏的毒性作用是多方面的, 目前认为氧化损伤为一重要机制. 环境砷在人体内代谢过程中可产生多种自由基和非自由基产物, 引起细胞功能紊乱, 直接攻击细胞或诱发脂质过氧化引起机体氧化与抗氧化代谢失衡, 造成氧化应激损伤.

关键词: 砷; 氧化损伤

蒋玲, 陆爽, 吴君. 砷对肝脏的毒性及氧化损伤. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2334-2336
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2334.asp>

0 引言

砷是一种环境有毒物质, 砷暴露对人类健康的危害已成为世界严重的公共卫生问题. 砷暴露的途径并不仅限于通过饮用水侵入人体, 含砷空气及含砷食物也是造成砷暴露的途径. 砷暴露致肝脏损失的发生机制尚未有一个被广泛认同的理论解释. 目前对砷毒作用机制的研究主要集中在甲基化代谢, 氧化应激、细胞毒性及细胞凋亡等方面. 然而这几个机制之间都有一条共同的线索贯穿始终, 即机体的氧化与抗氧化平衡.

1 砷在肝脏中的代谢

无机砷(iAs)主要有砷酸盐As(V价砷, As^{5+})和亚砷酸盐As(III价砷, As^{3+})两种形式存在于自然界, 研究表明, iAs进入人体后主要在肝脏进行甲基化代谢, 其生物转化过程已基本清楚^[1-2]. iAs进入机体后, 首先在红细胞内被砷酸盐还原酶

从 As^{5+} 还原成 As^{3+} ; 然后被肝细胞摄取, 在甲基转移酶的催化下利用S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体进行甲基化, 首先生成单甲基砷酸(MMA^{5+}), 生成的 MMA^{5+} 又能被 MMA^{5+} 还原酶还原成单甲基亚砷酸(MMA^{3+}); MMA^{3+} 再次在甲基转移酶的作用下甲基化生成双甲基砷酸(DMA^{5+}). 由此可见, 机体细胞至少暴露于无机砷(三价, 五价)和4种有机亚砷酸盐等形态砷. 因此, 形态砷的作用及其与靶分子的相互作用关系为研究者高度关注.

2 形态砷对肝细胞的毒性作用

环境中iAs进入人体后大部分在被甲基化代谢, 其中80%由肾脏随尿液排出, 未被转化的iAs主要蓄积在肝脏、肾脏、皮肤、毛发等组织中. 砷是一种胞质毒物, 在体内脏器组织中蓄积, 易与巯基结合, 形成稳定的络合物, 从而阻碍细胞呼吸、分裂和增殖使细胞代谢发生障碍, 并对多种酶有抑制作用, 而引起神经系统、肝脏、肾脏等多个重要器官发生病变^[3]. 动物实验表明, 砷可在大鼠肝组织中蓄积, 砷含量与暴露浓度呈正相关, 且高浓度砷组肝组织显微镜下观察显示有肝细胞变性、炎症及点状坏死, 呈量效关系^[4].

iAs(iAs^{3+} 和 iAs^{5+})及代谢产物(MMA和DMA)均对肝细胞有毒性作用, 可致染色体改变, 引起DNA损伤以及基因改变, 导致相关蛋白信号传递、修复异常, 具有细胞毒性和致癌性^[5-6]. Lu *et al*^[7]对贵州燃煤型砷中毒病人的肝组织约600个基因的表达研究, 发现其中约60个与细胞繁殖调节、细胞凋亡、DNA损坏等相关的基因表达明显改变.

3 砷与氧化损伤

氧自由基是人体正常氧化代谢的产物, 机体产生的自由基包括有氮氧化物自由基(NO 、 NO_2), 活性氧(O_2 、 HO_2 、 H_2O_2 、 HO 、 RO 、 ROO 、 $ROOH$ 、 $HOCl$)等. 由于生物体内同时

■研发前沿

深入研究氧化应激损伤在砷中毒肝损伤发生过程中作用靶点为今后的研究重点.

存在着抗氧化防御体系, 在生理状态下二者维持动态平衡, 从而保护细胞不被损伤, 病理情况下这种氧化和抗氧化平衡被破坏, 活性氧透过细胞膜上的磷脂分子所富含的多不饱和脂肪酸生成脂质过氧化物, 诱发脂质过氧化反应, 损伤细胞的DNA和酶蛋白分子结构, 导致疾病的发生^[8]. 氧自由基即可通过诱导过氧化引起细胞损伤, 还可通过脂氢过氧化物的分解引起细胞损伤, 脂质过氧化作用是一种连锁反应, 他连续产生自由基, 自由基又可进一步推动过氧化反应, 这种链式反应放大了活性氧的作用.

研究表明^[9-10]砷在代谢过程中可产生不同类型的自由基, 此外, 过量的砷离子还可以直接攻击氧, 干扰氧代谢, 破坏自由基反应链的平衡, 使组织细胞膜发生脂质过氧化, 造成膜结构破坏, 细胞坏死, 组织损伤, 与此同时, 机体会动员体内的抗氧化物质来清除自由基, 使得体内的抗氧化物减少, 抗氧化酶的活性降低, 从而打破机体氧化与抗氧化系统的平衡. 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是一种含巯基的抗氧化酶, 主要以还原型谷胱甘肽(GSH)为底物催化过氧化物的分解, 从而起到抗氧化作用. 砷对生物膜上的巯基又有很强的亲和力^[11], 他在体内可代谢为有机砷自由基, 从而直接与含巯基的GSH-Px结合, 使后者的活性降低. 大量研究发现, 砷暴露鼠肝组织中GSH、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、GSH-Px水平和超氧化物歧化酶(SOD)活力水平明显降低, 肝组织中脂质过氧化物(LPO)及代谢产物丙二醛(MDA)水平增加^[12-13], 同时伴随不同程度的肝细胞损伤, 甚至肝纤维化, 提示脂质过氧化可能参与了肝脏损伤、肝纤维化的过程.

另外, 体外研究证实在砷及其代谢产物的外排机制中, 砷及其甲基化代谢产物的转运排泄有赖于砷-谷胱甘肽复合物的形成和MMA还原酶的参与. 进入体内的砷及其代谢产物主要通过与体内重要的解毒物质-GSH结合再由胆汁和尿液排出体外. 而慢性砷暴露致体内GSH减少已在人群调查和动物实验中得到证实^[14-16]. 如前所述, GSH参与As⁵⁺、MMA⁵⁺等还原为As³⁺和MMA³⁺; 能与无机砷及其中间代谢产物形成各种砷-GSH复合物, 并可加速砷的甲基化反应, 因而GSH对于无机砷及其中间代谢产物的氧化还原和甲基化过程具有十分重要的作用^[17]. 而砷的代谢产物MMA³⁺可能会通过影响GSH的正常代谢而改变整个砷的代谢过程. 许多资料表明, 细

胞内GSH含量的降低会进一步加重体内、外实验中砷的细胞毒性^[18], 从而造成一种因果恶性循环.

总之, 氧化应激是砷中毒致小鼠肝损伤的重要机制, 但是近年的新研究提出, 氧化损伤只是一中间环节, 他带来的活性氧堆积-致使DNA损伤或是作为信号转导通路上的重要物质诱导细胞凋亡, 才是砷中毒的最终机制, 总之, 无论氧化损伤是贯穿始终还是某一阶段的主要机制, 对其进行深入的研究将对防治因砷中毒引起的病变机制有重要意义.

4 参考文献

- 1 孙贵范. 深入研究慢性砷中毒的分子作用机制. 中国地方病学杂志 2004; 23: 1-2
- 2 黄厚今, 洪峰. 砷代谢研究进展. 贵州医药 2002; 26: 1044-1046
- 3 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. 中国药物与临床 2005; 5: 645-647
- 4 Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263
- 5 张爱华, 洪峰, 黄晓欣, 罗鹏, 胡昌军, 刘忠义, 杨光红. 燃煤型砷中毒患者遗传损伤及癌变机理. 中国地方病学杂志 2003; 22: 12-15
- 6 安艳, 高增林. 砷甲基化代谢产物的作用机制. 职业卫生与病伤 2000; 15: 176-177
- 7 Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001; 59: 185-192
- 8 刘井波, 彭双清. 脂质过氧化作用与线粒体损伤. 中国预防医学杂志 2005; 6: 167-116
- 9 Wang TS, Huang H. Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis* 1994; 9: 253-257
- 10 周晓倩, 何云, 吴君. 砷中毒所致氧化应激与肝损伤. 中国地方病学杂志 2007; 26: 114-116
- 11 李富军, 皮静波, 孙贵范, 郑全美, 刘淑兰, 陆春伟. 砷对作业工人脂质过氧化水平的影响. 中国公共卫生学报 1997; 16: 58
- 12 Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 13 Xie Y, Liu J, Liu Y, Klaassen CD, Waalkes MP. Toxicokinetic and genomic analysis of chronic arsenic exposure in multidrug-resistance mdr1a/1b(-/-) double knockout mice. *Mol Cell Biochem* 2004; 255: 11-18
- 14 Winski SL, Carter DE. Interactions of rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite. *J Toxicol Environ Health* 1995; 46: 379-397
- 15 Pi J, Yamauchi H, Kumagai Y, Sun G, Yoshida T, Aikawa H, Hopenhayn-Rich C, Shimojo N.

■创新盘点

本文与其他相关文章不同点在于对氧化损伤与砷中毒肝损伤的研究进展进行了全面综述.

■名词解释

自由基: 是指在细胞代谢过程中不断产生的失去电子而带正电的氧原子或氧原子团. 组织细胞在氧化应激(损伤, 炎症等)的刺激下, 产生活性氧介质, 主要包括NO、O₂、H₂O₂、HO和脂质过氧化物等(前4种称为氧自由基), 可通过细胞膜的多不饱和脂肪酸、DNA的核苷酸和蛋白质的巯键反应引起组织受损.

■同行评价

本文针对砷对肝脏损伤的机制进行综述,行文流畅,文献较新,对于指导临床更好的防治砷中毒有很好的参考价值。

- Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 331-336
- 16 Ramos O, Carrizales L, Yanez L, Mejia J, Batres L, Ortiz D, Diaz-Barriga F. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 1: 85-88
- 17 Styblo M, Serves SV, Cullen WR, Thomas DJ. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 27-33
- 18 Chang WC, Chen SH, Wu HL, Shi GY, Murota S, Morita I. Cytoprotective effect of reduced glutathione in arsenical-induced endothelial cell injury. *Toxicology* 1991; 69: 101-110

编辑 何燕 电编 郭海丽

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

汉防己甲素对肝硬化大鼠胃黏膜微循环及超微结构的影响

黄会芳, 霍丽娟, 吴晓宁

黄会芳, 霍丽娟, 山西医科大学第一医院消化科 山西省太原市 030001
吴晓宁, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心 北京市 100050
通讯作者: 黄会芳, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一医院消化科. shxhfhf@126.com
电话: 0351-4639511
收稿日期: 2007-03-07 修回日期: 2007-04-13

Effect of tetrandrine on microcirculation and ultramicrostructure of gastric mucosa in rats with portal hypertension

Hui-Fang Huang, Li-Juan Huo, Xiao-Ning Wu

Hui-Fang Huang, Li-Juan Huo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Xiao-Ning Wu, Hepatology Center, Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Correspondence to: Hui-Fang Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. shxhfhf@126.com

Received: 2007-03-07 Revised: 2007-04-13

Abstract

AIM: To evaluate the effects of tetrandrine on lowering portal vein pressure (PVP) and improving the microcirculation and ultramicrostructure of gastric mucosa in rats with portal hypertension.

METHODS: Except for normal rats in the control group, all rats were established as portal hypertension (PHT) models, and then randomly divided into model (M), tetrandrine (T) and propranolol (P) groups. All rats were sacrificed after 15 d therapy.

RESULTS: Levels of PVP, alanine aminotransferase (ALT), hyaluronic acid (HA), and procollagen type III (PCIII) were significantly decreased in the T group compared with those in the M group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), whereas heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP) were not. In the P group the levels of PVP and

HR were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Levels of MAP, ALT, HA and PCIII were not decreased. The area and diameter of gastric mucosal capillaries were significantly decreased ($P < 0.01$), and the ultramicrostructure of gastric mucosa was significantly improved in the T and P groups.

CONCLUSION: Tetrandrine is safe and highly effective for the treatment of portal hypertension, and improves the microcirculation and ultramicrostructure of gastric mucosa in rats with portal hypertension.

Key Words: Portal hypertension; Portal hypertension gastropathy; Tetrandrine; Ultramicrostructure; Gastric mucosa

Huang HF, Huo LJ, Wu XN. Effect of tetrandrine on microcirculation and ultramicrostructure of gastric mucosa in rats with portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2337-2340

摘要

目的: 观察汉防己甲素降低大鼠肝硬化门脉高压(PHT)的疗效和对胃黏膜微循环及其超微结构的影响。

方法: 制作肝硬化PHT模型, 成模后分为模型(M)组、汉防己甲素(T)组、普萘洛尔组(P)及正常对照(N)组, 治疗15 d后进行各指标的测定。

结果: 与M组比较, T组门静脉压力(PVP)明显降低($P < 0.01$), ALT, HA及PC III指标下降($P < 0.05$), 平均动脉压(MAP)和心率(HR)无明显变化; P组引起了PVP明显降低($P < 0.01$)和HR的减慢($P < 0.05$), MAP, ALT, HA及PC III无明显变化; T组、P组光镜下胃黏膜毛细血管最大直径及面积明显减小($P < 0.01$), 透射电镜下胃黏膜超微结构的损伤明显减轻。

结论: 汉防己甲素能有效、安全地降低大鼠肝硬化门脉压力, 可有效改善其胃黏膜微循环及超微的变化, 为临床治疗门脉高压性胃病提供实验依据。

■背景资料

门脉高压性胃病是门脉高压的并发症, 其发病率较高, 是上消化道出血的常见原因。门脉高压症时内脏血流呈高动力循环状态, 但胃壁动静脉短路大量开放, 导致胃黏膜有效血流量减少, 胃黏膜缺血缺氧, 并引起其超微结构的损伤, 治疗的关键在于降低门脉压力。选择合适的药物降低门脉压力是目前研究的热点。观察降低门脉压力后胃黏膜微循环及超微结构的变化, 为进一步为临床用药提供实验基础。

■研发前沿

选择合适的药物,既能有效降低肝硬化门脉高压,又有抗肝纤维化作用,副作用少,且不引起全身血流动力学的明显变化,是目前研究的热点。

关键词: 门脉高压; 门脉高压性胃病; 汉防己甲素; 超微结构; 胃黏膜

黄会芳, 霍丽娟, 吴晓宁. 汉防己甲素对肝硬化大鼠胃黏膜微循环及超微结构的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2337-2340

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2337.asp>

0 引言

门脉高压性胃病(portal hypertension gastropathy, PHG)是指门脉高压患者伴发的胃黏膜病变, 诊断依据内镜下所见. 内镜下表现为各种形态的充血性红斑如蛇皮样、马赛克征和樱桃红样斑点; 组织学上表现为黏膜和黏膜下水肿, 小血管扩张, 而炎症细胞浸润不明显, 无糜烂和纤维血栓. 其中马赛克征诊断该病的敏感性和特异性较高. 其发病率较高, 是上消化道出血的常见原因, PHG治疗的关键在于降低门脉压力^[1]. 用药物降低肝硬化门脉高压(portal hypertension, PHT)并治疗PHG是目前研究的热点. 普萘洛尔是目前研究最深入、临床应用最广泛的降低肝硬化门脉高压的药物, 但事实证明只有1/3PHT患者能获得满意的疗效^[2], 而且其副作用也引起了注意. 汉防己甲素(Tet)是从防己科植物的干燥块根中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 有胞膜钙通道阻滞作用. 近年研究发现其有降低门脉压力及保护胃黏膜的作用^[3], 本实验旨在与普萘洛尔作对比, 观察其降低降低门脉压力的作用和对胃黏膜微循环及其超微结构的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 成年♂ Wistar大鼠70只, 体质量200 g-250 g, 由山西医科大学实验动物中心提供. 四氯化碳(CCl₄)由天津化学试剂厂生产, 普萘洛尔为山东泗水制药厂生产, 汉防己甲素为陕西慧科植物开发有限公司产品. 血清透明质酸(HA)、III型前胶原(PCIII)试剂盒为上海海军医学研究所产品. MS-2000型二道生理记录仪、Mias-2000型图像分析系统、JEOL JEM-100CX透射电镜均由山西医科大学医学实验中心提供.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 取正常对照(N)组大鼠18只, 普通饮食, 余52只采用四氯化碳(CCl₄)、高脂饮食等复合因素法^[4]制肝硬化PHT模型, 以单纯玉米面作为饲料(前2 wk为0.8 g/g玉米面, 0.2 g/g猪油), 并混入5 mg/g胆固醇, 100 mL/L酒精为唯一饮料, 首次按

5 mL/kg体重sc CCl₄, 后每隔3 d按3 mL/kg体重sc注射40% CCl₄(中性植物油配制), 共42 d.

1.2.2 实验分组 制模期间死亡6只, 余46只按随机分配的原则分为3组: 模型(M)组18只, 汉防己甲素(T)组14只, 普萘洛尔(P)组14只. 实验第42天从M组和N组各随机取8只测PVP、MAP及HR, 并取肝右叶组织行HE染色光镜下观察, 证实肝硬化PHT模型形成. 成模后停用制模药物予以药物治疗: 汉防己甲素: 30 mg/kg, 1次/d, 普萘洛尔: 22.5 mg/kg, 2次/日, 药物溶于蒸馏水, 按10 mL/kg体重灌胃. 模型组及正常对照组予以等量的蒸馏水灌胃; 灌胃期间, 汉防己甲素组死亡1只, 普萘洛尔组死亡1只, 均为灌药后数分钟死亡, 考虑为药物误入气管致窒息死亡, 治疗15 d后进行各指标的测定.

1.2.3 测压及标本采集 大鼠禁食12 h, 不禁饮水, 以乌拉坦ip麻醉, 右颈动脉插管用于测平均动脉压(MAP)和心率(HR), 剖腹, 门静脉插管, 测门静脉压力(PVP), 连接MS-2000型二道生理记录仪测量并记录. 测压完毕立即取肝右叶组织10 g, 经40 g/L甲醛固定, 取两块胃窦组织, 1块经40 g/L的甲醛固定, 另一块经20 g/L戊二醛固定, 送电镜室常规处理.

1.2.4 肝功能指标的测定 由实验室专人测定血清谷丙转氨酶(ALT).

1.2.5 血清HA、PC-III测定 采用放射免疫法, 由SN-697全自动放射免疫γ计数器测定.

1.2.6 组织病理学观察 采肝脏组织及部分胃窦组织HE染色, 光镜下观察, 并用Mias-2000型图像分析软件统计胃窦黏膜下毛细血管面积和最大直径, 每张切片选5个视野(×100)测定胃窦黏膜下毛细血管面积和最大直径, 取其平均值.

1.2.7 胃黏膜超微结构观察 胃黏膜送电镜室常规处理, JEOL JEM-100CX透射电镜下观察.

统计学处理 计量资料用均数±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS11.0统计分析软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 实验第42天模型形成情况

2.1.1 肝组织病理变化 正常对照组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序, 肝窦与汇管区成纤维细胞少; 模型组8只大鼠肝脏假小叶形成, 肝细胞排列紊乱, 有的细胞胞浆极度疏松, 有的脂变严重, 呈大空泡状.

■创新盘点

汉防己甲素降低门脉压力的疗效及降低门脉压力后胃黏膜微循环和电镜下超微结构的变化.

2.1.2 压力测定结果 模型组8只大鼠PVP明显高于正常组($P<0.01$), 均在11.0 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)以上, MAP、HR无明显变化(表1).

2.2 治疗结束各组PVP、MAP、HR测定结果 M组PVP显著高于N组($P<0.01$), MAP、HR无明显变化, P组、T组PVP比模型组明显降低($P<0.01$), 两组之间比较无显著性差异, P组引起了引起了HR的减慢($P<0.05$), MAP无明显变化, T组MAP和HR均无明显变化(表1).

2.3 血清ALT、HA、PCⅢ测定结果 M组ALT、HA、PCⅢ明显升高, 与N组比较有显著性差异($P<0.01$), P组各指标与M组比较无明显变化, T组各指标与M组、P组比较下降, 有显著性差异($P<0.05$)(表2).

2.4 治疗结束大鼠肝组织病理变化 N组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序, 肝窦与汇管区成纤维细胞少; M组多数假小叶仍存在, 但肝细胞脂变、坏死较治疗前减轻; P组与治疗结束M组比较无明显变化; T组部分假小叶消失, 肝细胞脂变、坏死及纤维化程度较M组减轻, 肝细胞排列紊乱.

2.5 胃窦黏膜组织病理学变化 N组胃黏膜腺体排列整齐, 结构完整, 无炎性细胞浸润, 黏膜及黏膜下血管无扩张, 也无黏膜下血管扭曲; M组胃黏膜毛细血管扩张、淤血、透明血栓形成, 黏膜下微静脉扩张、迂曲、管壁变薄, 可见大量淋巴细胞浸润, 腺体排列不整齐, 黏膜下毛细血管最大直径及面积与N组比较明显增大($P<0.01$); T组、P组大鼠胃黏膜见淋巴细胞浸润, 腺体排列较整齐, 黏膜下毛细血管及血窦扩张、淤血减轻, 毛细血管最大直径及面积与M组比较明显减小($P<0.01$), 两组之间比较无显著性差异(表2).

2.6 胃黏膜透射电镜观察 模型组腺细胞数目减少, 细胞之间的间隙增宽. 部分壁细胞分泌小管塌陷, 微绒毛少而断裂, 小管泡状结构增多. 壁细胞内线粒体肿胀, 嵴断裂、减少甚至消失, 部分细胞基质空泡化及细胞核固缩. 主细胞胞质减少, 胞核相对较大, 酶原颗粒减少, 电子密度降低. 颈黏液细胞内黏原颗粒亦减少, 电子密度亦低. 胃黏膜上皮细胞可见有单个细胞坏死、脱落, 部分变成“空网架”. 胃黏膜上皮细胞胞质内线粒体肿胀, 粗面内质网核蛋白脱落, 染色质变淡、浓缩边集. 上皮细胞间隙以及细胞与毛细血管之间间隙水肿、增宽, 毛细血管呈畸形改变, 基底膜厚薄不均, 横断面积显著扩大且形状不规则, 呈线形、马蹄形、矩形等改变, 部分区域阶段性变薄, 许多部位不连续, 窗孔明显

表 1 各组门静脉压力、平均动脉压和心率测定结果 (mean ± SD)

分组	n	PVP (mmHg)	MAP (mmHg)	HR (次/min)
实验第42天	N组	8 4.1 ± 1.0	83.3 ± 10.4	367 ± 53
	M组	8 13.6 ± 2.4 ^b	85.1 ± 15.1	372 ± 49
治疗结束组	N组	10 4.4 ± 1.1	84.7 ± 23.2	363 ± 56
	M组	10 13.3 ± 2.3 ^b	88.5 ± 11.8	381 ± 51
	P组	13 10.1 ± 2.6 ^{bd}	81.5 ± 10.7	295 ± 65 ^{ac}
	T组	13 9.1 ± 1.6 ^{bd}	82.1 ± 18.9	378 ± 56

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 各组N组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 各组M组.

增多, 血管内皮细胞与基底膜连接不紧密, 出现间隔, 有时可见毛细血管破裂, 红细胞溢出, 并可见周细胞平滑肌化. P组、T组仅见胃黏膜表层上皮细胞之间的细胞间隙增宽, 黏膜及黏膜下毛细血管虽然仍扩张, 但较M组减轻. 壁细胞、主细胞和颈黏液细胞线粒体较完整, 仅有少数嵴断裂, 分泌颗粒增多, 微绒毛排列较整齐, 断裂少见, 未见其他模型组表现.

3 讨论

门脉高压性胃病(PHG)是门脉高压的并发症, 生理状态下丰富的血流是胃黏膜维持“解剖屏障”和“功能屏障”的基础. 研究表明, 门脉高压症时内脏血流呈高动力循环状态, 其中胃部血流增加60%-80%^[5], 但胃黏膜血流的直接测定结果则显示胃黏膜毛细血管网实际处于缺血状态. 可能为门脉高压时胃壁动静脉短路大量开放, 毛细血管内红细胞堆积、变形、透明血栓形成, 导致胃黏膜有效血流量减少, 导致胃黏膜缺血缺氧, 所以要治疗PHG首先要降低门脉压力. 目前已有多种药物通过减少门静脉血流量或降低肝内血管阻力来降低门脉压力, 但尚无一种药物既能有效地降低门脉压力, 又有抗肝纤维化, 而且无明显的副作用. 自Lebrec用普萘洛尔治疗PHT食管曲张静脉破裂出血获得成功以来, 普萘洛尔在PHT患者中的应用报道很多, 但其副作用也引起了注意. 本研究结果表明, 普萘洛尔有降低门脉压力的作用, 但可减慢心率, 无保肝及抗肝纤维化作用. 由于普萘洛尔可使心率减慢, 反射性引起内脏血管收缩, 长期应用使肝脏功能损害加重, 临床仅有1/3的患者能获得满意的疗效. 因此, 需寻找新的药物代替普萘洛尔, 弥补普萘洛尔之不足.

汉防己甲素降低门脉压力的机制与普萘洛

■应用要点

本研究为今后寻找合适的药物降低门脉压力提供新思路, 为更好地指导临床治疗门脉高压性胃病提供实验依据.

■名词解释

门脉高压性胃病: 是指门脉高压患者伴发的胃黏膜病变, 诊断依据内镜下所见. 内镜下表现为各种形态的充血性红斑如蛇皮样、马赛克征和樱桃红样斑点; 组织学上表现为黏膜和黏膜下水肿, 小血管扩张, 而炎症细胞浸润不明显, 无糜烂和纤维血栓. 其中马赛克征诊断该病的敏感性和特异性较高.

■同行评价

本文应用肝硬化门脉高压动物模型,探讨汉防己甲素降低大鼠肝硬化门脉高压的疗效及其对胃黏膜微循环及其超微结构的影响。立题新颖,行文流畅,结果客观,该研究对临床具有指导意义,学术价值高。

表 2 各组血清学指标ALT、HA、PCⅢ和胃黏膜下层血管面积、直径测定结果(mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	HA(μg/L)	PCⅢ(μg/L)	血管面积(μm ²)	血管直径(μm)
N组	10	20.8 ± 8.47	192 ± 42	48 ± 9	160.93 ± 41.27	17.29 ± 4.36
M组	10	98.45 ± 26.4 ^{bc}	724 ± 121 ^{bc}	119 ± 32 ^{bc}	2800.92 ± 1289.41 ^b	76.53 ± 16.32 ^b
P组	13	103.23 ± 53.3 ^{bc}	674 ± 182 ^{bc}	123 ± 32 ^{bc}	900.11 ± 148.51 ^{bd}	40.23 ± 8.56 ^{bd}
T组	13	70.54 ± 21.5 ^b	472.45 ± 160 ^b	85 ± 19 ^b	957.20 ± 70.42 ^{bd}	42.19 ± 11.22 ^{bd}

^bP<0.01 vs N组; ^cP<0.05 vs T组; ^dP<0.01 vs M组。

尔不同。活化的肝星状细胞(HSC)在肝硬化、门静脉高压发生发展过程中起核心作用^[6],活化的HSC胞膜新生成的有活性的电压依赖性钙通道表达增多^[7],汉防己甲素为一种钙通道阻滞剂,可阻断活化的HSC胞膜电压依赖性钙通道,抑制HSC收缩,从而降低肝内血管阻力使门脉压力下降。另外,转化生长因子-β(TGF-β)可在转录和翻译水平上促进胶原等的合成,抑制细胞外基质降解,使肝内结缔组织生成增多,汉防己甲素能影响TGF-β及其信号通路^[8],减少细胞外基质的合成,间接使门脉压力下降。本实验中观察到汉防己甲素能使门脉压力显著下降,而且没有引起平均动脉压和心率的变化,并且有保护肝功能及抗肝纤维化作用,说明该药有良好的应用前景。

光镜下观察到模型组黏膜腺体排列不整齐,大量炎性细胞浸润,黏膜及黏膜下血管重度扩张、扭曲,微血管及血窦扩张,黏膜下层血管腔大壁薄。超微结构观察到PHG上皮细胞与毛细血管间隙水肿、增宽,毛细血管内皮细胞肿胀、肥大,基底膜厚薄不均,窗孔增多,有时可见毛细血管破裂,红细胞溢出,并可见周细胞平滑肌化。以上变化与文献报道一致^[9-10],表明胃黏膜毛细血管血流受阻,流量减少,流速减慢,通透性增强,造成胃黏膜细胞缺氧和营养不足,出现上皮细胞坏死、脱落,细胞线粒体肿胀,嵴断裂、减少甚至消失,分泌颗粒减少,粗面内质网核蛋白体脱落,染色质变淡、浓缩边集,微绒毛减少。说明胃黏膜破坏较重,能量合成减少。经汉防己甲素、普萘洛尔降低门脉压力治疗后,胃黏膜及黏膜下毛细血管扩张减轻,细胞线粒体较完整,仅有少数嵴断裂,分泌颗粒增多,微

绒毛较整齐,断裂少见。充分表明,降低门脉压力后,胃黏膜微循环及超微结构得到明显改善。

总之,汉防己甲素能有效、安全地降低肝硬化大鼠门静脉压力,可有效改善肝硬化大鼠胃黏膜微循环及超微结构的变化,为临床治疗门脉高压性胃病提供实验依据,有良好的临床应用前景。

4 参考文献

- 1 温冰. 门脉高压性胃病的研究进展. 临床消化病杂志 2002; 14: 91-93
- 2 Merkel C, Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Bellini B, Bighin R, Gatta A. The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 32: 930-934
- 3 穆毅, 申耀宗, 储一芳. 汉防己甲素对肝硬化门脉高压大鼠胃粘膜及肝脏的影响. 中华消化杂志 1996; 16: 213-216
- 4 韩德五, 马学慧, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究. 山西医药杂志 1979; 1-5
- 5 霍丽娟, 徐大毅. 肝硬化门脉高压病人及大鼠结肠粘膜光电镜观察. 中华消化杂志 1996; 16: 336-338
- 6 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 7 Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemsans K, Gorbic MN, Nicolas JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodes J. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001; 33: 956-962
- 8 陈源文, 李定国, 吴建新, 陈颖伟, 陆汉明. 粉防己碱对大鼠肝星状细胞跨膜信号转导的影响. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 609-610
- 9 霍丽娟, 黄会芳, 杨保元. 缬沙坦和普萘洛尔降低门脉压力疗效的实验研究. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 611-613
- 10 白玲, 陈昊, 张昶, 王燕青. 门脉高压性胃粘膜病变的病理特征. 齐齐哈尔医学院学报 2002; 23: 125-127

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

高脂血症和高脂血症性脂肪肝大鼠肾上腺髓质素2的变化

张玉青, 黄卡特, 毛孙忠, 吴小脉, 黄萍, 范小芳, 龚永生

张玉青, 毛孙忠, 吴小脉, 黄萍, 范小芳, 龚永生, 温州医学院机能实验教学中心 浙江省温州市 325035
黄卡特, 温州医学院附属第一医院病理室 浙江省温州市 325000
温州医学院科技发展基金资助项目, No. XNK04046
通讯作者: 龚永生, 325035, 温州市高教园区温州医学院机能实验教学中心, 肺心病研究室. fxbwzmc@126.com
电话: 0577-86699521 传真: 0577-86699521
收稿日期: 2007-06-18 修回日期: 2007-06-30

Changes in adrenomedullin 2 in rats with hyperlipidemia and hyperlipidemic fatty liver

Yu-Qing Zhang, Ka-Te Huang, Sun-Zhong Mao, Xiao-Mai Wu, Ping Huang, Xiao-Fang Fan, Yong-Sheng Gong

Yu-Qing Zhang, Sun-Zhong Mao, Xiao-Mai Wu, Ping Huang, Xiao-Fang Fan, Yong-Sheng Gong, Teaching Center of Functional Experiment, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China
Ka-Te Huang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China
Supported by: the Scientific Development Foundation of Wenzhou Medical College, No. XNK04046
Correspondence to: Yong-Sheng Gong, Teaching Center of Functional Experiment, Institute of Cor Pulmonale, Wenzhou Medical College, University Town, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China. fxbwzmc@126.com
Received: 2007-06-18 Revised: 2007-06-30

Abstract

AIM: To investigate changes in adrenomedullin 2/intermedin (ADM2/IMD) in plasma and hepatic tissues of rats with hyperlipidemia and its possible role in the development of hyperlipidemic fatty liver.

METHODS: Sixteen male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control and hyperlipidemia model groups ($n = 8$ each). The model was established by feeding a high-fat diet for 4 wk. Liver histology, liver index (liver weight/body weight), liver function alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AKP) and blood lipids were assayed. The levels of ADM2/IMD in plasma and liver were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: Body and liver weights and liver index increased in the hyperlipidemia model group compared with controls ($P < 0.01$). Liver

histology showed mild to moderate fatty denaturation in the hyperlipidemia model group. Triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, ALT and AKP in the hyperlipidemia model group were higher than in the controls (0.29 ± 0.05 mmol/L vs 0.18 ± 0.09 mmol/L, 2.49 ± 0.35 mmol/L vs 1.25 ± 0.16 mmol/L, 1.69 ± 0.18 mmol/L vs 0.49 ± 0.06 mmol/L, 25.46 ± 5.14 kU/L vs 13.15 ± 2.83 kU/L, and 416.1 ± 42.7 U/L vs 281.2 ± 47.3 U/L, respectively; $P < 0.01$), and high-density lipoprotein cholesterol was lower than in the control group (0.65 ± 0.11 mmol/L vs 0.75 ± 0.10 mmol/L, $P < 0.01$). The ADM2/IMD level in hepatic tissues increased 115% in the hyperlipidemia model group compared with the controls (26.21 ± 11.2 pg/mg · pro vs 12.18 ± 2.9 pg/mg · pro, $P < 0.01$), while the plasma concentration of ADM2/IMD was no different between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: ADM2/IMD appears to be correlated with the development of hyperlipidemia and hyperlipidemic fatty liver in rats.

Key Words: Adrenomedullin 2/Intermedin; Hyperlipidemia; Hyperlipidemic fatty liver; Rat; Radioimmunoassay

Zhang YQ, Huang KT, Mao SZ, Wu XM, Huang P, Fan XF, Gong YS. Changes in adrenomedullin 2 in rats with hyperlipidemia and hyperlipidemic fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2341-2344

摘要

目的: 研究高脂血症、高脂血症性脂肪肝大鼠血浆及肝组织ADM2/IMD的变化, 探讨ADM2/IMD在高脂血症、高脂血症性脂肪肝病理过程中的意义。

方法: 雄性SD大鼠16只, 随机均分为对照组与高脂组。大鼠被高脂喂食造模4 wk后, 观察大鼠肝脏病理学变化, 测定血脂(TG, TC, HDL-C, LDL-C)及肝功能(ALT, AKP); 放免法测定血浆及肝组织匀浆ADM2/IMD含量。

结果: 高脂组体质量、肝质量及肝指数(肝

背景资料

研究表明肾上腺髓质素(ADM)与脂质代谢有着密切的关系。ADM2/IMD是ADM的横向同源物, 有关其在代谢综合征如高脂血症、脂肪肝等发病过程中的作用尚知之甚少。

研发前沿

高脂血症可诱发高脂血症性脂肪肝、动脉粥样硬化、冠心病等临床常见疾病。高脂血症和高脂血症性脂肪肝的病因学、预防和治疗已经成为目前的研究热点, 但其确切发病机制目前尚不清楚。

■创新盘点

理论上的横向推测并经实验证实:与其横向同源物ADM一样,ADM2/IMD可能与大鼠饮食性高脂血症和高脂血症性脂肪肝病理进程有关。

质量/体质量)均显著高于对照组($P<0.01$)。肝组织呈轻中度脂肪变。高脂组TG、TC、LDL-C、ALT及AKP均显著高于对照组(0.29 ± 0.05 mmol/L vs 0.18 ± 0.09 mmol/L, 2.49 ± 0.35 mmol/L vs 1.25 ± 0.16 mmol/L, 1.69 ± 0.18 mmol/L vs 0.49 ± 0.06 mmol/L, 25.46 ± 5.14 kU/L vs 13.15 ± 2.83 kU/L, 416.1 ± 42.7 U/L vs 281.2 ± 47.3 U/L; $P<0.01$)。HDL-C则低于对照(0.65 ± 0.11 mmol/L vs 0.75 ± 0.10 mmol/L, $P<0.01$)。血浆ADM2/IMD水平两组间差异无统计学意义($P>0.05$);但高脂组肝组织匀浆ADM2/IMD水平较对照组高115%(26.21 ± 11.2 pg/mg · pro vs 12.18 ± 2.9 pg/mg · pro, $P<0.01$)。

结论: ADM2/IMD可能与大鼠饮食性高脂血症和高脂血症性脂肪肝病理进程有关。

关键词: 肾上腺髓质素2; 高脂血症; 高脂血症性脂肪肝; 大鼠; 放射免疫法

张玉青, 黄卡特, 毛孙忠, 吴小脉, 黄萍, 范小芳, 龚永生. 高脂血症和高脂血症性脂肪肝大鼠肾上腺髓质素2的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2341-2344
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2341.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是遗传-环境-代谢应激相关因素所致的、以肝细胞内脂肪堆积为主的临床病理综合征,高脂血症性脂肪肝是NAFLD的一种。NAFLD的发病机制至今尚未完全明确,目前认为脂质在肝细胞中的沉积是NAFLD的发病前提,脂质过氧化和炎症反应在NAFLD发生发展中起重要的作用^[1-2]。研究已表明肾上腺髓质素(ADM)与脂质代谢有着密切的关系^[3],肾上腺髓质素2(adrenomedullin2, ADM2)或中介素(intermedin, IMD)是ADM的横向同源物,为新近分别由日本和美国学者发现的降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)家族的新成员,经比较认为ADM2与IMD实为同一多肽^[4-5]。研究发现,ADM2/IMD具有抗氧化损伤、抗炎、调节免疫等广泛的生物学效应,是新的内源性心血管、肾脏保护因子^[6-8]。而有关ADM2/IMD在代谢综合征如高脂血症、脂肪肝、糖尿病等发病过程中的作用尚知之甚少。本工作拟在饮食性高脂血症大鼠模型上,观察血浆和肝组织ADM2/IMD水平的变化,旨在初步探讨IMD/ADM2这一新的活性多肽与高脂血症和高脂血症性脂肪肝病理过程的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级标准健康♂SD大鼠,由温州医学院实验动物中心提供(温医动字220030002号)。血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒购自北京中生生物工程高技术公司。谷丙转氨酶(ALT)及碱性磷酸酶(AKP)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。ADM2/IMD放免试剂盒由美国Phoenix Pharmaceuticals, Inc.公司提供。日立7600全自动生化分析仪, WALLAC r计数仪。

1.2 方法

1.2.1 高脂血症动物模型的建立 16只清洁级SD大鼠正常喂养1 wk后,随机均分为2组:对照组和高脂组。对照组给予基础饲料饲养;高脂组给予高脂饲料(胆固醇2%,猪油10%,基础饲料88%),按每100 g体质量20 g,分早、中、晚三餐,定时定量分别给予。大鼠单笼饲养,均自由饮水及摄食。4 wk后,取血及肝组织,检测各项指标。

1.2.2 观察指标及测定方法 (1)观察大鼠的食欲、体质量、行为、状态、毛发等情况,实验结束处死动物时,称体质量、肝质量及计算肝指数(肝质量mg/体质量g)。(2)生物化学指标:用酶法测定TC、TG、LDL-C、HDL-C及AKP的含量,用赖氏法测定ALT的含量。(3)血浆及肝组织IMD/ADM2测定:采用放免法,按放免药盒说明书操作。ADM2/IMD(人)试剂盒与大鼠、小鼠的ADM2/IMD及IMD-53(大鼠)、ADM2/IMD(8-47)的交叉反应100%;与人及大鼠的肾上腺髓质素(ADM),人的Prepro-IMD(25-56)、Prepro-IMD(57-92)及人、大鼠的CGRP无交叉反应。其IC₅₀为55.45 pg/管, Binding为26%。

1.2.3 组织病理学检查 取右叶部分肝组织用40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,HE染色,光镜下观察肝组织学的改变。

统计学处理 实验数据均以均数±标准差(mean±SD)表示。组间比较采用SPSS11.0统计软件进行非配对t检验。

2 结果

2.1 一般情况 高脂组大鼠体质量、肝重及肝指数均显著高于对照组(P 均 <0.01 ,表1)。肝脏组织学改变:高脂组大鼠肝脏肉眼观体积增大、颜色呈浅黄、切面油腻感。光镜下对照组大鼠肝小叶清晰,肝细胞索排列整齐,偶见小泡性脂肪滴(图1A);高脂组可见中度脂肪变,肝细胞变大,胞浆内可见大小不一小泡性脂肪滴,细胞核居中,肝窦略狭窄,小叶内和汇管区可见炎细胞浸

表 1 大鼠体质量及肝指数的变化(mean ± SD, n = 8)

分组	体质量(g)	肝重(g)	肝脏指数(mg/g)
对照组	294.38 ± 6.91	8.46 ± 0.36	28.84 ± 1.41
	25.23 ^b	1.16 ^b	3.19 ^b
高脂组	343.57 ± 25.23 ^b	11.23 ± 1.16 ^b	32.77 ± 3.19 ^b

^bP<0.01 vs 对照组.

表 2 高脂膳食对大鼠血脂的影响(mean ± SD, n = 8, mmol/L)

分组	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照组	0.18 ± 0.09	1.25 ± 0.16	0.75 ± 0.10	0.49 ± 0.06
	0.29 ± 0.05 ^b	2.49 ± 0.35 ^b	0.65 ± 0.11 ^b	1.69 ± 0.18 ^b
高脂组	0.18 ± 0.09	1.25 ± 0.16	0.75 ± 0.10	0.49 ± 0.06

^bP<0.01 vs 对照组.

表 3 大鼠肝功能及IMD/ADM2的变化(mean ± SD, n = 8)

分组	ALT(kU/L)	AKP (U/L)	IMD/ADM2	
			血浆(ng/L)	肝脏(pg/mg · pro)
对照组	13.15 ± 2.83	281.2 ± 47.3	67.60 ± 20.36	12.18 ± 2.9
高脂组	25.46 ± 5.14 ^b	416.1 ± 42.7 ^b	71.80 ± 13.37	26.21 ± 11.2 ^b

^bP<0.01 vs 对照组.

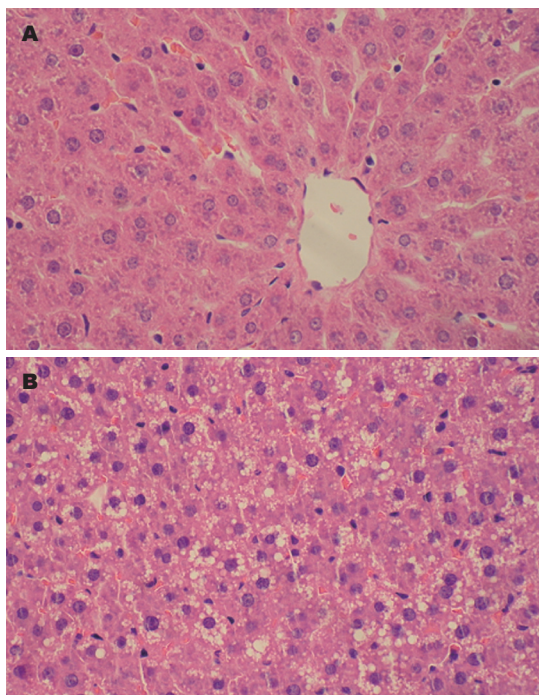


图 2 高脂组大鼠肝脏HE染色(×400). A: 对照组; B: 高脂组.

■应用要点

本文首次发现ADM2/IMD可能与大鼠饮食性高脂血症和高脂血症性脂肪肝病理进程有关,在脂质代谢紊乱对靶器官的损害中可能扮演重要角色,为以后高脂血症性脂肪肝的发病机制及防治的研究提供一个新的靶点.

润并伴有肝细胞坏死(图1B).

2.2 血脂和肝功能的改变 高脂组血浆TG、TC、LDL-C明显高于对照组,同时HDL-C水平显著降低(P均<0.01),见表2. 高脂组大鼠肝功能异常,血浆ALT和AKP显著高于对照组(P均<0.01)(表3).

2.3 血浆和肝组织匀浆IMD/ADM2含量的变化 血浆IMD/ADM2水平两组间差异无统计学意义(P>0.05); 而肝组织匀浆中IMD/ADM2含量高脂组较对照组高115%(P<0.01)(表3).

3 讨论

随着人们生活条件的提高,饮食结构的改变,高脂血症和脂肪肝已成为当今社会的常见病和多发病. 高脂血症可诱发高脂血症性脂肪肝、动脉粥样硬化(As)、冠心病等临床常见疾病. 高脂血症和高脂血症性脂肪肝的病因学、预防和治疗已经成为目前的研究热点. 高脂血症性脂肪肝是NAFLD的一种, NAFLD的发病机制复杂,确切发病机制目前尚不清楚,现在比较接受的

发病机制学说是“二次打击学说”,该学说认为:一次打击主要是胰岛素抵抗(IR)引起肝脏脂肪沉积,使肝细胞对损伤因子的敏感性增高;二次打击是肝内脂质沉积可加强氧化应激和脂质过氧化反应,导致线粒体解偶联蛋白、细胞因子及Fas配体被诱导活化,从而引起炎症和纤维化的发生^[9-10].

ADM2/IMD是近期发现的CGRP多肽家族新成员,系ADM的横向同源物(paralog,即指起源于同一祖先,在同一生物体中由同一基因复制而产生的多个蛋白质的基因). 在不同哺乳动物间,ADM2/IMD序列高度保守,其mRNA的组织分布十分广泛,在胰腺、胸腺、卵巢等组织中均存在ADM2/IMD mRNA的表达. 研究发现,ADM2/IMD与高血压、心肌缺血、低氧性肺动脉高压和肾功能衰竭等疾病的发生发展密切相关. 已知ADM在能量代谢、水盐平衡、内分泌激素释放调控中发挥十分重要的作用^[11],与脂质代谢也有着密切的关系-ADM可抑制胰岛素的

■名词解释

横向同源物(paralog),即指起源于同一祖先,在同一生物体中由同一基因复制而产生的多个蛋白质的基因.

■同行评价

本文探讨了ADM2/IMD可能与大鼠饮食性高脂血症和高脂血症性脂肪病理进程有关, 结构清楚, 立意新颖, 对进一步的基础和临床研究有参考价值。

分泌^[3], 而后者可诱导胆固醇生物合成限速酶羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的合成。近来发现ADM2/IMD能抑制动物水和食物摄取的行为^[12]; 此外, ADM2在中枢系统主要表达于垂体中叶, 与一些应激激素如促黑色素细胞激素(α -MSH)、催乳素(PRL)、促肾上腺皮质激素(ACTH)的表达部位相似, 提示ADM2/IMD可作为旁分泌因子调节垂体前叶激素的分泌^[13]。据此推测, 和其横向同源物ADM一样, ADM2/IMD可能在维持机体自稳态如内分泌、代谢应激等的调控中发挥重要的生物学效应。

我们采用了高脂膳食建立的高脂血症大鼠模型, 观察了血浆及肝脏组织ADM2/IMD水平的变化。结果提示, 高脂组大鼠在血脂明显异常、肝脏脂肪浸润及肝功能受损的同时, 肝组织匀浆ADM2/IMD浓度显著高于对照组。已知脂质自稳态受多种因子调控, 如胰岛素可诱导羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的合成, 氧化应激、炎性细胞因子如IL-1 β 、TNF- α 等在脂质代谢紊乱对靶器官的损害中也起重要作用^[14-15]。有研究表明, ADM可抑制胰岛素分泌^[10], 而氧化应激、TNF- α 、IL-1等刺激ADM表达上调^[16-18]。据此推测, 大鼠高脂血症、脂肪肝病理过程中, ADM2/IMD在肝脏组织浓度的增加可能与上述因素有关, 可能在肝组织病理损害中发挥保护性调控作用。但高脂组大鼠循环血液中ADM2/IMD浓度较对照组并无显著变化。这是否提示在大鼠高脂血症发生发展中, ADM2/IMD仅以旁分泌/自分泌形式在局部发挥作用? 这尚待进一步的研究。

总之, 我们研究提示, ADM2/IMD可能与大鼠饮食性高脂血症和高脂血症性脂肪肝病理进程有关, 在脂质代谢紊乱对靶器官的损害中可能扮演重要角色。但其确切的作用机制及与其他蛋白因子(基质金属蛋白酶、环氧合酶-2、脂联素)、细胞因子(TNF- α 、IL-1、细菌脂多糖)等之间的相互作用和影响, 均有待更为深入的研究和探讨。

4 参考文献

- 1 Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; 2: 11-19
- 2 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1035-1037
- 3 Zudaire E, Cuttitta F, Martinez A. Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul Pept* 2003; 112: 121-130
- 4 Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY.

- Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 7264-7274
- 5 Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 2004; 556: 53-58
- 6 Jia YX, Yang JH, Pan CS, Geng B, Zhang J, Xiao Y, Zhao J, Gerns H, Yang J, Chang JK, Wen JK, Tang CS, Qi YF. Intermedin1-53 protects the heart against isoproterenol-induced ischemic injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 117-123
- 7 Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y. Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 558: 128-132
- 8 Hashimoto H, Hyodo S, Kawasaki M, Shibata M, Saito T, Suzuki H, Otsubo H, Yokoyama T, Fujihara H, Higuchi T, Takei Y, Ueta Y. Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats. *Peptides* 2007; 28: 1104-1112
- 9 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 10 石胜利, 聂玉强. 脂联素与非酒精性脂肪肝病. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 272-275
- 11 Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 5-27
- 12 Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R919-927
- 13 Lin Chang C, Roh J, Park JI, Klein C, Cushman N, Haberberger RV, Hsu SY. Intermedin functions as a pituitary paracrine factor regulating prolactin release. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2824-2838
- 14 Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, Liang G. Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1168-1175
- 15 Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, Shimomura I. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev* 2001; 15: 1206-1216
- 16 Isumi Y, Kubo A, Katafuchi T, Kangawa K, Minamino N. Adrenomedullin suppresses interleukin-1 β -induced tumor necrosis factor- α production in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 1999; 463: 110-114
- 17 Wu R, Zhou M, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 downregulate TNF- α in macrophage cell line and rat Kupffer cells. *Regul Pept* 2003; 112: 19-26
- 18 Carrizo GJ, Wu R, Cui X, Dwivedi AJ, Simms HH, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 downregulate inflammatory cytokines and attenuate tissue injury after gut ischemia-reperfusion. *Surgery* 2007; 141: 245-253

编辑 程剑侠 电编 何基才

重症急性胰腺炎肺损伤大鼠sICAM-1水平变化及其意义

张宇, 严际慎, 张勤, 张琪, 裘华森

张宇, 张勤, 张琪, 裘华森, 浙江中医药大学附属第一医院浙江省中医院普通外科, 浙江省杭州市 310006
严际慎, 武汉大学人民医院普通外科 湖北省武汉市 430071
通讯作者: 张宇, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江省中医院普通外科. zhangyu1971@21cn.com
电话: 0571-87070965
收稿日期: 2006-12-20 修回日期: 2007-01-10

Significance of concentration changes of serum soluble ICAM-1 in lung injury associated with severe acute pancreatitis in rats

Yu Zhang, Ji-Shen Yan, Qin Zhang, Qi Zhang, Hua-Sen Qiu

Yu Zhang, Qin Zhang, Qi Zhang, Hua-Sen Qiu, Department of General Surgery, Zhejiang Provincial Chinese Traditional Medicine Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China
Ji-Shen Yan, Department of General Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Yu Zhang, Department of General Surgery, Zhejiang Provincial Chinese Traditional Medicine Hospital, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. zhangyu1971@21cn.com
Received: 2006-12-20 Revised: 2007-01-10

Abstract

AIM: To investigate the relationship between concentration changes of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in severe acute pancreatitis (SAP) and associated lung injury in rat.

METHODS: A Rat SAP model was established by retrograde injection of 30 g/L sodium taurocholate into bile-pancreatic duct. Rats were sacrificed at 0, 3, 6, 12, 24 hours and their sera and left lungs collected. Sera sICAM-1 and myeloperoxidase (MPO) activity in lung tissue were measured.

RESULTS: Increases in sera sICAM-1 concentrations were evident at 3 hours after SAP induced, and the MPO activity of lung tissue was significantly increased at 6 hours. Sera sICAM-1 concentration positively correlation with MPO activity ($r = 0.897$).

CONCLUSION: The concentration change of

serum sICAM-1 is associated with the pathological injury magnitude of lung in rat severe acute pancreatitis.

Key Words: Intercellular adhesion molecule-1; Pancreatitis/acute severe; Lung injury; Myeloperoxidase

Zhang Y, Yan JS, Zhang Q, Zhang Q, Qiu HS. Significance of concentration changes of serum soluble ICAM-1 in lung injury associated with severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2345-2347

摘要

目的: 探讨血清可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1)水平变化与重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤的关系。

方法: SD大鼠采用逆行胰胆管注射30 g/L牛磺胆酸钠方法制作SAP模型取0, 3, 6, 12, 24 h不同时点血清进行sICAM-1检测, 同时检测肺组织髓过氧化物酶活性。

结果: 制模3 h后, 血清sICAM-1水平开始持续上升(34.90-38.99 $\mu\text{mol/L}$), 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性在6 h后明显增强($P < 0.05$), 血清sICAM-1水平与肺组织MPO活性呈正相关($r = 0.897$)。

结论: 重症急性胰腺炎时血清sICAM-1水平的变化可能与肺部损伤程度密切相关。

关键词: 细胞间黏附分子-1; 急性胰腺炎; 肺损伤; 髓过氧化物酶活性

张宇, 严际慎, 张勤, 张琪, 裘华森. 重症急性胰腺炎肺损伤大鼠sICAM-1水平变化及其意义. *世界华人消化杂志* 2007;15(21):2345-2347
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2345.asp>

0 引言

急性肺损伤是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时常见且严重的并发症。研究表明, SAP时大鼠肺组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)基因过度表达^[1], 且与肺损伤严重程度相关^[2]。我们旨在探讨血清可溶性细胞间黏附

■背景资料

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是重症急性胰腺炎最常见、最严重的并发症之一, 其发生率和病死率居该术后并发症之首, 一旦出现临床症状, ARDS常常处于不可逆转阶段, 早期发现胰腺炎相关性肺损伤并进行相应的处理, 将有助于降低重症急性胰腺炎的死亡率。

■创新盘点

本文首次证明了血清sICAM-1水平与重症急性胰腺炎相关性肺损伤严重程度相关, 提出可能采用检测血清sICAM-1水平来预测可能出现的肺部损伤。

表 1 MPO活性变化(U/g)和sICAM-1水平变化($\mu\text{mol/L}$)

分组		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
MPO	对照	1.83 \pm 0.16	1.93 \pm 0.24	1.92 \pm 0.20	1.94 \pm 0.11	1.96 \pm 0.09
	SAP	1.75 \pm 0.12	2.07 \pm 0.11	2.42 \pm 0.23 ^a	2.53 \pm 0.50 ^a	2.68 \pm 0.23 ^a
sICAM-1	对照	34.90 \pm 5.47	38.99 \pm 2.54	38.28 \pm 4.19	39.17 \pm 1.52	39.49 \pm 1.68
	SAP	33.59 \pm 4.03	46.12 \pm 5.61 ^c	55.02 \pm 12.07 ^c	55.29 \pm 14.99 ^c	57.56 \pm 4.81 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组, SAP组0 h, 3 h; ^c $P < 0.05$ vs 对照组, SAP组0 h.

分子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)与大鼠SAP肺损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康Sprague-Dawley(SD)大鼠60只(由武汉大学医学院实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体重180-240 g, 室温, 光照周期12 h : 12 h 条件饲养。牛磺胆酸钠购自Sigma公司, sICAM-1 ELISA试剂盒购自深圳晶美生物工程公司, MPO试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 SAP 模型建立及分组 应用编号法随机分为急性胰腺炎组($n = 30$)和对照组($n = 30$), 平均分5个时间点: 术后0, 3, 6, 12, 24 h每点各6只。参照Aho *et al*^[3]的方法并略加改进。术前12 h禁食, 自由饮水, 25 g/L戊巴比妥钠ip麻醉(1 mL/kg体重), 用钝性细针头通过十二指肠壁经乳头插入胆总管, 用无损伤血管夹分别夹闭肝门处的胆总管以及针头插入部位的胆总管。向胆胰管内加压注入30 g/L牛磺胆酸钠溶液, 1 mL/kg体重, 注射速度0.1 mL/30 s。注射完毕后, 抽出针头的同时原位夹闭胆胰管, 3 min后松开无损伤血管夹。对照组操作同胰腺炎组, 仅向胆胰管内加压注入相当容量的生理盐水。所有动物术毕用无创缝线两层缝合腹壁关腹。

1.2.2 取材与检测 分别于术后0, 3, 6, 12, 24 h, 采取断颈方法分批处死动物。采集心血及肺脏组织标本。血液于含EDTA试管中静置后, 3000 r/min离心15 min, 取上清液, 血清及肺组织均置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。取部分肺组织做HE染色常规病理观察。血清sICAM-1水平采用ELISA方法检测, 按试剂盒说明进行。肺髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性测定, 取肺组织加邻联茴香胺制成肺组织匀浆, 冻融并超声粉碎, 离心后取上清加反应液, 在分光光度计460 nm波长下进行2 min的扫描, 记录第30 s和第90 s的光密度差值, 以此1 min吸光度的变化代表酶活

力的改变。

统计学处理 所有数据以mean士SD表示, 通过SAS6.12统计软件, 分别采用 t 检验和方差分析, 对各时点、各组均数进行显著性检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 并对MPO与sICAM-1水平进行相关性分析。

2 结果

2.1 肺脏组织病理改变 对照组镜下观可见肺组织结构清晰, 无肺泡壁增厚与中性粒细胞浸润; SAP组0 h无肺泡壁增厚和中性粒细胞浸润, 在制模3 h后可见肺泡间质水肿, 少许中性粒细胞浸润, 6 h后肺泡壁充血水肿, 肺间质中性粒细胞浸润增多, 肺泡腔内可见游离红细胞, 12 h后肺泡壁明显增厚, 肺间质、肺泡腔及肺泡壁可见大量炎症细胞浸润、渗出以及肺泡萎陷, 并持续至24 h。

2.2 肺组织MPO活性和sICAM-1水平变化 SAP组6, 12, 24 h MPO活性均明显高于对照组和SAP组0, 3 h($P < 0.05$), SAP组0 h和3 h, 6, 12和24 h MPO活性分别也无差异; SAP组3, 6, 12, 24 h sICAM-1水平均高于对照组和SAP组0 h($P < 0.05$, 表1)。肺组织MPO活性与血清sICAM-1水平之间密切相关($r = 0.897$, $P < 0.05$)。

3 讨论

急性胰腺炎对生命的威胁除少数猝死病例外, 主要不在于胰腺病变本身, 更大程度上取决于胰腺坏死后产生很多且严重的并发症^[4]。ARDS为急性坏死性胰腺炎最常见、最严重的并发症之一, 其发生率和病死率居该病术后并发症之首^[5-6]。其临床表现为进行性呼吸加快、急促、气短、紫绀, 伴有辅助呼吸肌过度运动, X线片可见肺门周围肺野出现毛玻璃样阴影, 吸氧情况下 PaO_2 进行性下降至8.0 kPa以下, $\text{PaCO}_2 < 4.67$ kPa, 增加吸氧浓度30 min后, PaO_2 仍不能明显增高。研究表明, 当有上述临床表现时, 病理上往

■应用要点

检测血清sICAM-1水平可能有助于早期发现重症急性胰腺炎相关性肺部损伤, 但是其具体临床应用尚需进一步研究验证。

往已出现血管内液体漏出、纤维蛋白沉积于间质和透明膜形成, 肺实变导致肺内分流, 疾病已处于不可逆阶段^[7]. 因此ARDS的早期诊断和防治无疑是提高SAP治愈率、降低死亡率的有效措施. 我们观察到SAP肺部的病理损伤特点是肺内中性粒细胞浸润和肺泡壁厚度增加, 中性粒细胞浸润可能是肺泡壁水肿增厚的主要原因. 研究表明, ICAM-1在肺部的高表达介导白细胞浸润入肺, 肺内中性粒细胞浸润引起肺泡壁增厚(肺水肿的重要病理表现), 激活的中性粒细胞产生并释放超氧阴离子, 从而损伤周围的组织细胞, 使肺内皮损伤变性, 通透性增加, 间质水肿, 氧交换障碍; 同时中性粒细胞和内皮细胞产生血栓素A₂(TXA₂), 后者是一强有力的缩血管物质, 可引起肺动脉高压, 导致通气血流比例失调、低氧血症, 从而引发ARDS^[8].

MPO存在于中性粒细胞的嗜天青颗粒中, 约占细胞干重的5%, 因此通过测定MPO的活力可推算中性粒细胞的数量, 肺组织MPO活性常常用来作为反映肺组织损伤的指标^[9-10]. 我们发现SAP组大鼠肺组织MPO活性在模型复制成功6 h后明显增高, 其后维持在高水平. 提示SAP复制成功6 h后, 中性粒细胞在肺组织聚集, 引起肺组织损伤. SAP时, 胰腺和肺部尤其是肺泡细胞表面高表达ICAM-1的脱落, 是血清sICAM-1的主要来源^[11-12], 因此认为血清sICAM-1可以反映出肺部病理损伤程度. 研究表明, sICAM-1诱导肺内巨噬细胞产生巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)和TNF- α , 并增加中性粒细胞在肺内的聚集, 加重肺部损伤^[13-14]. 我们发现, 与对照组相比, SAP组sICAM-1水平在模型复制成功3 h后即增高, 3 h以后各组sICAM-1水平均高于对照组. 相关性研究显示, 血清sICAM-1水平与肺组织MPO活性呈正相关($r = 0.897, P < 0.05$), 即血清sICAM-1水平增高与MPO活性增强关系密切. 而且从我们研究的结果来看, 血清sICAM-1水平的增高要早于肺组织MPO活性增强.

鉴于血清sICAM-1的临床可监测性以及其与SAP相关的肺部损伤的高度相关性, 故认为血清sICAM-1的动态监测可作为临床预测SAP相关的ARDS的一个重要指标. 其具体的临床应用尚需进一步的研究验证.

4 参考文献

- Masamune A, Shimosegawa T, Kimura K, Fujita M, Sato A, Koizumi M, Toyota T. Specific induction of adhesion molecules in human vascular endothelial cells by rat experimental pancreatitis-associated ascitic fluids. *Pancreas* 1999; 18: 141-150
- Sun W, Watanabe Y, Wang ZQ. Expression and significance of ICAM-1 and its counter receptors LFA-1 and Mac-1 in experimental acute pancreatitis of rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5005-5009
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- Zhu AJ, Shi JS, Sun XJ. Risk factors influencing mortality of patients with severe acute pancreatitis within 24 hours after admission. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 453-457
- Raghu MG, Wig JD, Kochhar R, Gupta D, Gupta R, Yadav TD, Agarwal R, Kudari AK, Doley RP, Javed A. Lung complications in acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 177-185
- Zhu AJ, Shi JS, Sun XJ. Organ failure associated with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2570-2573
- 沈魁, 钟守先, 张圣道. 胰腺外科. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 334-335
- Burger R, Bryan AC. Pulmonary hypertension after postlavage lung injury in rabbits: possible role of polymorphonuclear leukocytes. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1990-1995
- Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 403-407
- Liu KX, Wu WK, He W, Liu CL. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 299-305
- Kaufmann P, Smolle KH, Brunner GA, Demel U, Tilz GP, Krejs GJ. Relation of serial measurements of plasma-soluble intercellular adhesion molecule-1 to severity of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2412-2416
- Kaufmann P, Demel U, Tilz GP, Krejs GJ. Time course of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) is related to severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2565-2571
- Schmal H, Czermak BJ, Lentsch AB, Bless NM, Beck-Schimmer B, Friedl HP, Ward PA. Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury. *J Immunol* 1998; 161: 3685-3693
- Mendez MP, Morris SB, Wilcoxon S, Greeson E, Moore B, Paine R 3rd. Shedding of soluble ICAM-1 into the alveolar space in murine models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L962-970

■同行评价

本文发现重症急性胰腺炎时血清sICAM-1水平与肺泡肺组织MPO活性呈正相关, 立意新颖, 研究方法先进、科学, 结果可靠, 讨论层次清晰, 是一篇较好的实验研究论著

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

上消化道间叶源性肿瘤临床病理特征46例

丁芳, 程斌, 谢华平, 赵秋, 杨玉珍

■背景资料

上消化道间叶源性肿瘤(GIMTs)是指食管、胃及十二指肠的非上皮、非淋巴的软组织肿瘤, 借助免疫组化和超微结构观察可分为间质瘤、平滑肌瘤与神经鞘瘤。其中, 间质瘤(GISTs)具有从良性到恶性以至显著恶性的广谱生物学行为特征。

丁芳, 程斌, 谢华平, 赵秋, 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

通讯作者: 程斌, 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. bcheng@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663585 传真: 027-83662831

收稿日期: 2007-02-26 修回日期: 2007-03-17

Clinical and pathological characteristics of upper gastrointestinal mesenchymal tumors: An analysis of 46 cases

Fang Ding, Bin Cheng, Hua-Ping Xie, Qiu Zhao, Yu-Zhen Yang

Fang Ding, Bin Cheng, Hua-Ping Xie, Qiu Zhao, Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Bin Cheng, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. bcheng@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-02-26 Revised: 2007-03-17

Abstract

AIM: To study the clinical, pathological and immunohistochemical characteristics of upper gastrointestinal mesenchymal tumors (GIMTs), so as to provide guidance for clinical diagnosis and treatment.

METHODS: Forty-six cases of upper GIMT were clinically diagnosed by endoscopic ultrasonography (EUS). The samples obtained by surgery or endoscopic mucosal resection were observed by pathological sectioning and staining. The expression of CD117, CD34, smooth muscle antibodies (SMA) and S-100 was assayed by immunohistochemical staining.

RESULTS: Twenty-four of the 46 GIMTs were esophagus mesenchymal tumors, 5 of which were stromal tumors (20.8%) and 19 were leiomyomas (79.2%). Twenty-two of the 46 tumors were gastric mesenchymal tumors, which included 20 stromal tumors (90.9%), 1 leiomyoma

and 1 neurilemmoma. Twenty-one of the 25 upper gastrointestinal stromal tumors were CD117 positive (84%) and 24 were CD34 positive (84%). SMA and S-100 were expressed only in leiomyoma and neurilemmoma, respectively.

CONCLUSION: The pathological characteristics of upper GIMTs are similar by microscopic observation, and can be differentiated by combined assay of some immunohistochemical markers such as CD117, CD34, SMA and S-100. Most esophagus mesenchymal tumors are leiomyomas, and most gastric mesenchymal tumors are stromal tumors. Leiomyoma and neurilemmoma are rare.

Key Words: Gastrointestinal mesenchymal tumor; Gastrointestinal stromal tumor; Leiomyoma; Neurilemmoma; Immunohistochemistry

Ding F, Cheng B, Xie HP, Zhao Q, Yang YZ. Clinical and pathological characteristics of upper gastrointestinal mesenchymal tumors: An analysis of 46 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(21):2348-2353

摘要

目的: 观察上消化道间叶源性肿瘤(GIMTs)的临床病理及免疫组化特征, 探讨其临床诊断及处置策略。

方法: 46例内镜超声检查拟诊为上消化道间质瘤的病例, 采用光镜观察其手术或黏膜切除术(EMR)标本的病理特征, 免疫组化检测其CD117, CD34, 平滑肌抗体(SMA)和S-100的表达状况, 并分析其病理诊断与临床的关系。

结果: 46例GIMTs中食管肿瘤占24例, 其中间质瘤5例(20.8%), 平滑肌瘤19例(79.2%); 22例胃GIMTs中间质瘤20例(90.9%), 平滑肌瘤1例, 神经鞘瘤1例。25例上消化道间质瘤中CD117阳性21例(84%)、CD34阳性24例(96%)。而平滑肌瘤与神经鞘瘤分别仅表达SMA和S-100。

结论: 上消化道间叶源性肿瘤光镜下病理特征相似, 联合检测CD117, CD34, SMA和S-100等免疫组化标记物可区别上消化道GIMTs。在

食管以平滑肌瘤多见;而在胃则以间质瘤多见,平滑肌瘤与神经鞘瘤非常少见。

关键词: 上消化道间叶源性肿瘤;胃肠道间质瘤;平滑肌瘤;神经鞘瘤;免疫组化

丁芳, 程斌, 谢华平, 赵秋, 杨玉珍. 上消化道间叶源性肿瘤临床病理特征46例. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2348-2353

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2348.asp>

0 引言

与胃肠道间叶源性肿瘤(gastrointestinal mesenchymal tumors, GIMTs)一样,上消化道间叶源性肿瘤是指食管、胃及十二指肠的非上皮、非淋巴的软组织肿瘤。这类肿瘤多以梭形细胞分化为主,可伴有上皮样细胞,光镜下酷似平滑肌细胞、神经鞘细胞,故传统上常诊断为“平滑肌瘤、神经鞘瘤”。随着免疫组化和超微结构研究的不断深入,发现这类肿瘤细胞大多无明确肌性分化或神经分化特征,并显示出特有的CD117、CD34阳性表达,从而提出胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)的概念^[1-2],也有一部分可分别完全向肌性或神经分化的则为真正的平滑肌瘤或神经鞘瘤。其中,GISTs是一种特殊类型的间叶源性肿瘤,具有从良性到恶性以至显著恶性的广谱生物学行为^[3-5],有必要将其与其他GIMTs进行区分。我们对46例内镜超声诊断为间质瘤的病例进行回顾分析,对其病理标本行常规病理及CD117、CD34、SMA、S-100免疫组化检查,旨在探讨上消化道间叶源性肿瘤的临床病理特征,提高GIMTs,尤其是GISTs的诊断水平。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-01/2007-02 46例上消化道GIMTs病理标本,男26例,女20例,年龄13-76(中位43)岁。其中手术标本23例,内镜下黏膜切除术(EMR)标本23例。所有标本均经40 g/L甲醛固定12 h以上。术前均行内镜超声检查(EUS),病灶位于第4层(相当于固有肌层)者21例,第2层(相当于黏膜肌层)者25例。

1.2 方法

1.2.1 病理及免疫组化检查 固定标本常规石蜡包埋,5 μm切片,HE染色后普通光镜观察,诊断标准参照阿克曼外科病理学^[6]。免疫组化采用EnVision二步法^[7]:病理切片常规脱水,微波抗原修复,50 mL/L山羊血清消除非特异性背景。分别

表1 46例上消化道GIMTs病理诊断与病变部位

部位	n	平滑肌瘤	神经鞘瘤	GISTs
食管	24	19	0	5
胃	22	1	1	20
十二指肠	0	0	0	0
合计	46	20	1	25

加一抗CD117(1:100)、CD34(1:150)、抗平滑肌抗体(SMA, 1:150)、S-100(1:400)置37℃湿盒内1 h,再加入二抗EnVision复合物混合液,37℃作用30 min, DAB显色,苏木精复染后光镜观察。上述特异性一抗及EnVision试剂盒购自美国Santa Cruz公司。已知阳性切片作阳性对照,以TBS代替一抗作阴性对照。结果判断分阳性和阴性,阳性为细胞呈棕黄色着色,CD117阳性为胞质和/或胞膜着色,S-100为胞质和胞核着色,其余均为胞质着色。

1.2.2 GIMTs诊断及良恶性判断标准 根据免疫组化结果,结合病理组织形态学表现,将CD117和/或CD34阳性者划为GISTs; SMA表达阳性而CD117、CD34阴性者划为平滑肌瘤;而将S-100阳性,CD117、CD34、SMA均阴性者划为神经鞘瘤。参考文献对间质瘤进行良恶性判断^[8-10]:即手术时见其出现黏膜浸润、或侵犯邻近器官及肝脏、淋巴结及腹膜转移则视为“恶性”,肿瘤直径多大于4 cm,切开可见肿瘤组织出血、坏死,核分裂像多大于5-10/50HPF,属高度侵袭危险性;而肿瘤直径小于4 cm,与周围组织界限清楚、无黏连,无肿瘤组织坏死,核分裂像小于5/50HPF判断为低度侵袭危险性,视为“良性”。

2 结果

2.1 临床诊断 本组46例上消化道GIMTs中,位于食管者24例,占52.3%、胃22例,占47.7%、十二指肠则为0例。24例食管GIMTs中GISTs仅5例(占20.8%)、平滑肌瘤19例(占79.2%)、神经鞘瘤0例;22例胃GIMTs中GISTs20例(占90.9%)、平滑肌瘤1例、神经鞘瘤1例(表1)。25例GISTs中判断为“良性”19例,“恶性”6例,均为胃间质瘤。

本组10例GIMTs出现呕血和/或黑便,均为巨大胃间质瘤表面坏死、溃疡形成所致;6例GIMTs患者出现吞咽梗阻感,其中3例为胃底及贲门间质瘤,3例为食管平滑肌瘤。21例GIMTs患者出现暖气、反酸、烧心及上腹痛、腹胀不

■应用要点

本文通过对46例上消化道GIMTs病理标本的观察发现其光镜下病理特征极为相似,联合检测CD117、CD34、SMA、S-100等免疫组化标记物可区别上消化道间质瘤、平滑肌瘤与神经鞘瘤等。进一步对其临床及常规内镜、内镜超声(EUS)资料进行回顾性研究,发现食管GIMTs中EUS显示起源于黏膜肌层者为平滑肌瘤;胃GIMTs无论起源于黏膜肌层或固有肌层者多为间质瘤,而且发现具有恶性行为特征者均为胃间质瘤,而平滑肌瘤和神经鞘瘤均表现为良性生物学特征。因此,EUS对合理制定上消化道GIMTs处置策略可提供重要依据。

同行评价

本文是一篇基础结合临床的回顾性总结文章, 病历资料完整, 统计方法正确. 图表制作清晰, 对比性好, 对于指导临床工作有一定的意义.

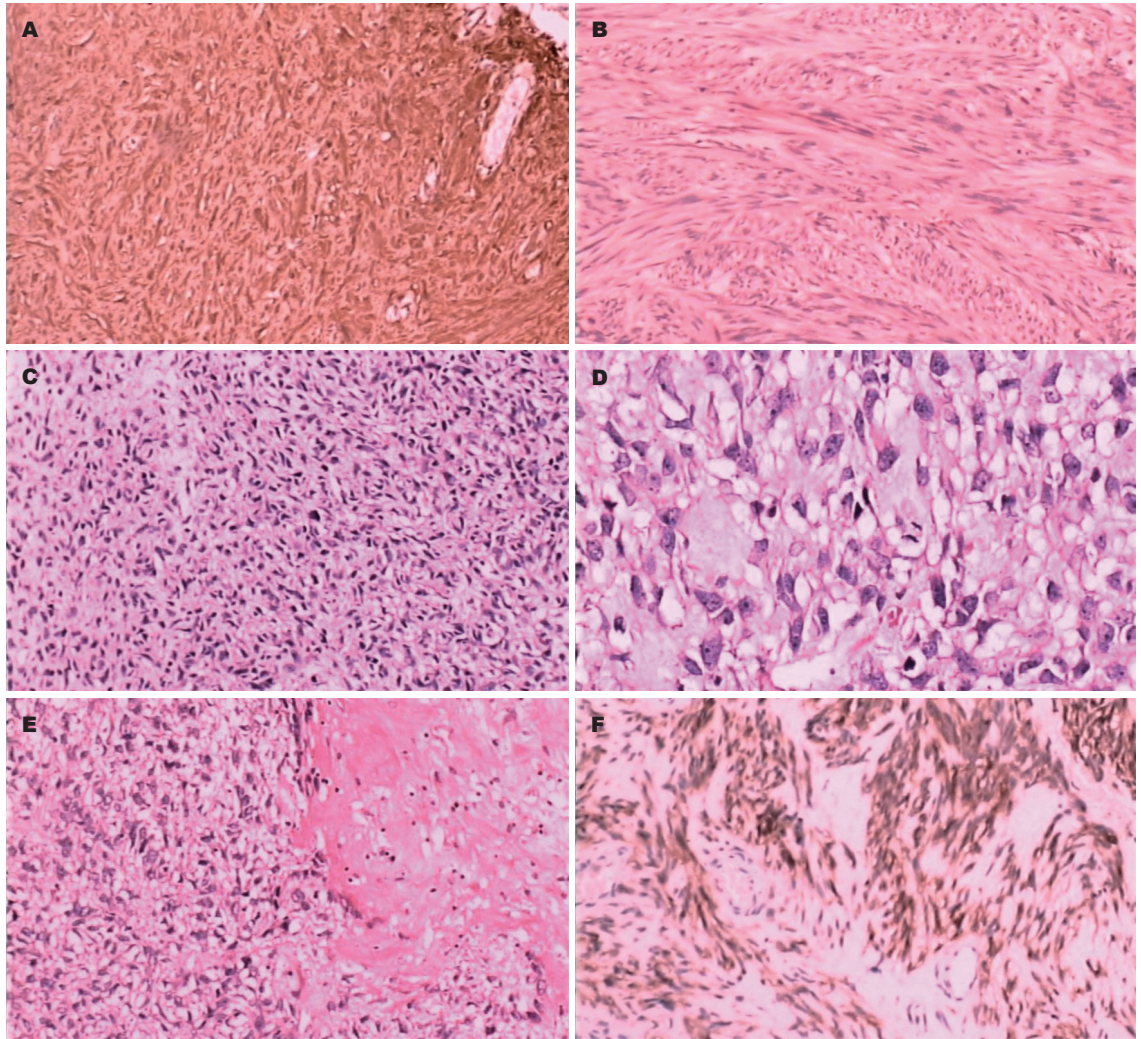


图1 平滑肌瘤和间质瘤的组织病理学改变(HE ×100). A: 平滑肌瘤; B: 间质瘤; C: 间质瘤示细胞密度高; D: 间质瘤示核分裂象; E: 间质瘤示肿瘤坏死; F: 神经鞘瘤.

适等非特异性症状. 另有9例GIMTs患者无任何症状, 因体检或其他疾病行胃镜检查偶然发现.

2.2 内镜及EUS情况 46例GIMTs术前均行内镜及内镜超声检查, 10例出现上消化道出血的患者, 内镜检查均发现肿瘤较大, 见表面糜烂及溃疡形成, 未出现消化道出血的患者大多体积相对较小、表面光滑. 24例食管GIMTs中, EUS显示起源于黏膜肌层的23例, 19例为平滑肌瘤, 4例为间质瘤; 起源于固有肌层的1例, 为间质瘤; 22例胃GIMTs中, EUS显示起源于黏膜肌层的2例, 为胃间质瘤, 起源于固有肌层的20例, 其中18例为间质瘤, 1例为平滑肌瘤, 1例为神经鞘瘤.

2.3 病理组织学特征 平滑肌瘤显微镜下细胞形态主要有两种: 一种以梭形细胞为主型, 比正常平滑肌细胞稍大, 胞质红染, 核长而两端钝圆, 瘤细胞水肿时可有空泡形成, 瘤细胞多平行排列, 或呈束状交织排列. 另一种以上皮样细胞为

主型, 瘤细胞大多呈梭形及圆形, 胞质呈双色性或微嗜酸性, 核圆形或卵圆形, 位于中央, 可有空泡形成(图1A). 间质瘤光镜下可分为梭形细胞型、上皮细胞型或两者细胞的混合型, 常出现交叉束状、弥漫片状排列, 有的呈栅栏状、花瓣样、血管内皮瘤样排列. 以梭形细胞为主型, 细胞两端钝圆或长梭形, 胞质丰富嗜酸性, 肿瘤细胞排列呈束状、编织状或漩涡状; 以上皮细胞为主型, 形态不一, 可呈多边形或圆形, 胞质丰富, 嗜酸性透亮, 胞核深染居于细胞中央或偏位、核仁突出, 并可见瘤巨细胞(图1B). 如出现细胞密度增加(图1C); 核形多样、核分裂象多见(图1D); 肿瘤坏死(图1E)及黏液样变性等, 则多为恶性间质瘤改变. 神经鞘瘤显微镜下显示以神经鞘细胞为主要成分, 细胞形态与GIMTs差别不大, 可明显呈栅栏状或漩涡状排列, 有些细胞间黏液成分较多, 组织结构相对较为疏松(图1F).

尽管3种GIMTs似乎各有特点, 但显微镜下很难将GISTs与平滑肌瘤及神经鞘瘤进行区分, 必须借助免疫组化检查分析其细胞表型。

2.4 免疫组化表型 46例上消化道GIMTs均行CD117, CD34, SMA, S-100等免疫组化检查, 其中CD117, CD34免疫组化染色见图2。根据其结果确诊为GISTs 25例, 占54.3%(25/46), 其中CD117阳性21例, 占84%(21/25), CD34阳性24例, 占96%(24/25), CD117与CD34共同阳性20例, 占80%(20/25), 值得注意的是还有10例间质瘤中还存在SMA的阳性表达。确诊为平滑肌瘤者20例, SMA均表达阳性, 而其CD117, CD34, S-100均阴性。确诊为神经鞘瘤1例, 仅有S-100的阳性表达(表2)。

3 讨论

胃肠道间叶源性肿瘤(GIMTs)包括GISTs、平滑肌源性与神经源性肿瘤, 其中以GISTs发病率最高, 达76.2%, 其发病年龄多在50-70岁, 无明显性别差异^[11-12]。Fletcher *et al*^[9]与Miettinen *et al*^[10]对GISTs的长期随访观察发现其具有从良性、潜在恶性到不同程度恶性等复杂的生物学行为特征。而真正分化发育良好的平滑肌瘤、神经鞘瘤则多具有良性特征, 其临床处置策略完全不同。因此, 有必要准确区别间质瘤与其他的间叶源性肿瘤。本组46例上消化道GIMTs中食管占24例, 其中间质瘤5例(占20.8%)、平滑肌瘤19例(占79.2%); 22例胃GIMTs中间质瘤20例(占90.9%)、平滑肌瘤与神经鞘瘤各1例。可见, 食管GIMTs中以平滑肌瘤为主, 而在胃GIMTs中GISTs占绝大多数, 平滑肌源性肿瘤与神经源性肿瘤极少, 与文献报道基本一致^[13-14]。

从内镜超声检查来看, 24例食管GIMTs中EUS显示起源于黏膜肌层者23例, 其中19例为平滑肌瘤, 4例为间质瘤; 1例起源于固有肌层者为间质瘤; 22例胃GIMTs中, EUS显示起源于黏膜肌层者2例, 为胃间质瘤, 起源于固有肌层者20例, 其中18例为间质瘤, 1例为平滑肌瘤, 1例为神经鞘瘤。本组资料仅研究了行EMR或手术治疗者, 不能反映上消化道间叶源性肿瘤的全貌, 但可初步说明, 食管GIMTs中, 起源于黏膜肌层者多为真正的平滑肌瘤, 而胃内病灶无论是起源于黏膜肌层还是起源于固有肌层者则大多为间质瘤。从临床症状来看, 上消化道GIMTs大多无症状或仅有反酸、烧心及上腹不适及嗝气

表 2 46例上消化道间叶源性肿瘤免疫组化阳性表型结果

病种	n	CD117	CD34	SMA	S-100
间质瘤	25	21	24	10	0
平滑肌瘤	20	0	0	20	0
神经鞘瘤	1	0	0	0	1
合计	46	21	24	30	1

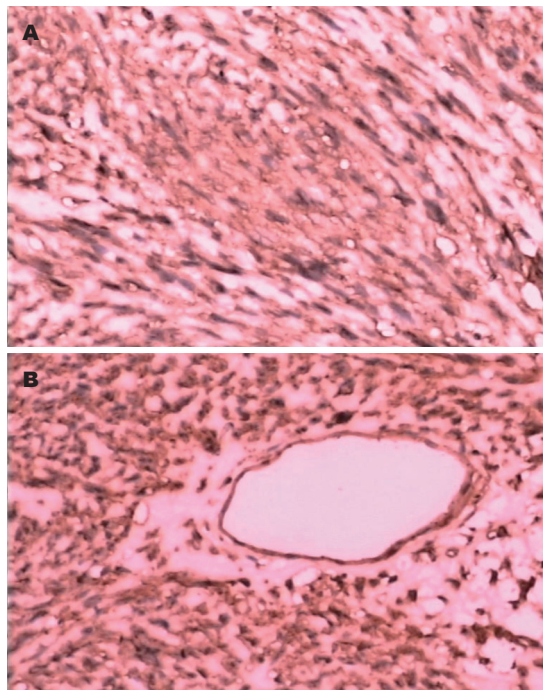


图 2 上消化道间叶源性肿瘤免疫组化表型($\times 200$)。A: CD117阳性; B: CD34阳性。

等非特异性的临床表现, 10例出现上消化道出血和/或贫血者多为胃巨大间质瘤表面溃疡形成所致; 6例出现吞咽困难或吞咽梗阻感者3例为胃底及贲门巨大间质瘤所致, 另3例为食管平滑肌瘤, 但病灶均小于1 cm, 行EMR并按胃食管反流病治疗后症状消失, 推测可能与焦虑紧张及胃食管反流病有关。

间质瘤与平滑肌瘤、神经鞘瘤均可由梭形细胞、上皮细胞或两种细胞混合组成。平滑肌瘤细胞多平行排列, 或呈束状交织排列; 神经鞘瘤可呈栅栏状或漩涡状排列, 组织结构相对较为疏松; 而GISTs则多呈交叉束状、弥漫片状排列等, 细胞密度相对较高。3种GIMTs病理组织学特征极为相似, 光镜下难以区分, 其鉴别诊断有赖于电镜与免疫组化。晚近研究发现, 原癌基因C-kit的表达产物CD117蛋白是胃肠道间质瘤最为敏感而特异的标记物, 为诊断胃肠道间质瘤的金标准^[15-18]。本组25例GISTs中CD117

表达阳性21例,占84%,CD34阳性24例,占96%,CD117与CD34共同阳性20例,占80%。Miettinen *et al*^[19-20]认为,典型的间质瘤CD117和CD34表达阳性,本组病例中部分间质瘤不表达CD117可能是由于C-kit基因片段缺失影响CD117蛋白表达所致^[21]。本组间质瘤病例中CD34阳性表达率高达96%,故确诊GISTs需联合检测CD117与CD34。值得注意的是还有10例间质瘤中还存在SMA的阳性表达,推测可能与其部分组织具有平滑肌分化特征有关。20例平滑肌瘤只表达SMA阳性,而CD117,CD34,S-100均阴性。1例神经鞘瘤仅有S-100的阳性表达。目前已形成共识,GISTs具有从良性到潜在恶性、低度、中度乃至高度恶性等复杂的生物学行为特征。本组病例通过对EMR和手术标本行全瘤活检发现6例具有恶性特征者均为胃间质瘤,肿瘤直径多大于4 cm,切开可见肿瘤组织出血、坏死,核分裂像大于5-10/50HPF。而平滑肌瘤及神经鞘瘤者未发现恶性行为特征,与国内外文献报道一致^[4,22]。

总之,通过对46例上消化道GIMTs病理标本的观察发现其光镜下病理特征极为相似,联合检测CD117、CD34、SMA、S-100等免疫组化标记物可区别上消化道间质瘤、平滑肌瘤与神经鞘瘤等GIMTs。进一步对其临床及内镜、EUS资料进行回顾性研究,发现食管GIMTs中EUS显示起源于黏膜肌层者多为平滑肌瘤;胃GIMTs无论起源于黏膜肌层或固有肌层者多为间质瘤,平滑肌瘤与神经鞘瘤非常少见。而且发现具有恶性行为特征者均为胃间质瘤,而平滑肌瘤和神经鞘瘤均表现为良性生物学特征。因此从临床处置策略角度看,我们认为对上消化道间叶源性肿瘤应区别对待:对EUS显示起源于第2层且相对较小的食管GIMTs可行动态观察,患者如有焦虑紧张情绪或强烈要求时可行内镜下黏膜切除术;对于胃GIMTs,多为GISTs,如大于4 cm,尤其合并上消化道出血或贫血者需行手术治疗,如小于2 cm者可行动态观察,对大小在2-4 cm者有条件可经内镜超声引导下的细针穿刺活检(EUS-FNA)、切割活检或深挖活检等行病理及免疫组化检查,有助于及早采取有效治疗措施。另外,准确诊断GISTs,特别是CD117免疫组化检测是选择格列卫分子靶向治疗的前提。

4 参考文献

- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580
- Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2006; 56: 1-9
- Shinomura Y, Kinoshita K, Tsutsui S, Hirota S. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2005; 40: 775-780
- 马大烈, 白辰光. 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2367-2371
- 伍晓汀, 夏霖. 胃肠道间质瘤的临床诊断和分期. 中国实用外科杂志 2006; 26: 572-574
- 回允中. 罗赛阿克曼外科病理学. 第8版. 沈阳: 辽宁教育出版社, 1999: 645-664
- 陈丽荣, 王海军, 许晶虹, 姚丽芳. 胃肠道间质瘤的电镜和免疫组织化学研究. 中华病理学杂志 2003; 32: 101-105
- Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 82-87
- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- Miettinen M, El-Rifai W, H L Sobin L, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002; 33: 478-483
- Tran T, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 162-168
- Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005; 103: 821-829
- 宁建文, 季峰, 王丽君, 许国强, 厉有名. 265例胃肠道间叶源性肿瘤的临床病理特征及超声内镜诊断价值. 中华消化杂志 2006; 26: 381-385
- 杨其昌, 季晓华, 沈屹, 韩枋, 张晓娟, 刘宏斌. 74例胃肠道间质瘤临床病理与生物学行为评价. 中华病理学杂志 2005; 34: 6-10
- Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998; 78: 1633-1636
- Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 4297-4300
- 侯英勇, 朱雄增, 王坚, 谭云山, 孙孟红, 杜祥, 施达仁. 胃肠道间质瘤起源和分化的探讨. 中华病理学杂志 2003; 32: 106-110
- 程斌, 邹晓平, 李兆申. 上消化道间质瘤的研究进展及内镜超声在其诊断中的应用. 中华消化内镜杂志

- 2004; 21: 210-212
- 19 Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999; 30: 1213-1220
- 20 Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 211-222
- 21 Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002; 160: 1567-1572
- 22 Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3813-3825

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

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年国家级继续医学教育项目“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.

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

胃癌组织RASSF1基因启动子区甲基化的意义

李学彦, 傅宝玉

■背景资料

RASSF1是一种新型候选抑癌基因, RASSF1A基因是人类肿瘤中经常失活的抑癌基因, 研究发现基因启动子区域的异常甲基化是其失活的主要机制之一。

李学彦, 傅宝玉, 中国医科大学附属一院消化科 辽宁省沈阳市 110003

通讯作者: 李学彦, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文化路83号, 沈阳军区总医院综合二科. xylhome001@sina.com
电话: 024-23051185

收稿日期: 2007-03-13 修回日期: 2007-04-21

Methylation of the RASSF1A gene promoter in gastric carcinoma

Xue-Yan Li, Bao-Yu Fu

Xue-Yan Li, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, Chinese Medical University, the First Affiliated Hospital, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Yan Li, Department of Oncology, Comprehensive Section 2, the PLA General Hospital of Shenyang of Chinese PLA, 83 WenHua Road, Shenhe District, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. xylhome001@sina.com

Received: 2007-03-13 Revised: 2007-04-21

Abstract

AIM: To investigate the methylation status of the suppressor gene RASSF1A promoter in gastric carcinoma and benign gastric disease, and its clinicopathological significance.

METHODS: Methylation status of the RASSF1A promoter was detected by methylation specific-polymerase chain reaction (MS-PCR) in 32 patients with gastric carcinoma, adjacent non-carcinomatous gastric tissues, and 46 patients with benign gastric disease.

RESULTS: The frequency of RASSF1A promoter methylation in gastric carcinoma was 62.5% (20/32), and in adjacent non-carcinomatous gastric tissues, it was 3.1% (1/32), while in chronic shallow gastritis and chronic atrophic gastritis, it was 3.3% (1/30) and 37.5% (6/16), respectively. The rates of RASSF1A promoter methylation in gastric carcinoma and adjacent non-carcinomatous gastric tissues were significantly correlated ($P < 0.01$). Methylation of RASSF1A promoter in gastric carcinoma had no relationship with differentiation grade, lymph node metastasis and tumor size.

CONCLUSION: Methylation of RASSF1A promoter in gastric carcinoma may be an important molecular change and contribute to the development of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; RASSF1A; Suppressor gene; Methylation specific-polymerase chain reaction

Li XY, Fu BY. Methylation of the RASSF1A gene promoter in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2354-2357

摘要

目的: 探讨抑癌基因RASSF1A启动子在胃癌组织及胃良性病变中甲基化的发生情况及与临床特征的关系。

方法: 采用甲基化特异性聚合酶链反应(MS-PCR)方法检测32例胃癌组织及32例相应的癌旁组织, 以及46例胃良性病变中RASSF1A基因甲基化发生情况。

结果: 在32例胃癌DNA标本中, RASSF1A基因甲基化发生率为62.5%(20/32)。而在32例癌旁组织中, 只有1例存在甲基化, 占3.1%(1/32), 二者之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在胃良性病变, 浅表性胃炎和萎缩性胃炎中甲基化发生频率分别为3.3%和37.5%。RASSF1A基因甲基化发生率与胃癌分化程度、肿瘤大小及淋巴结转移之间无显著相关性。

结论: RASSF1A基因启动子区甲基化在胃癌的发生发展中起重要作用。

关键词: 胃癌; RASSF1A; 抑癌基因; 甲基化特异性聚合酶链反应

李学彦, 傅宝玉. 胃癌组织RASSF1基因启动子区甲基化的意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15(21): 2354-2357
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2354.asp>

0 引言

胃癌是全世界最常见的肿瘤, 我国是胃癌高发区。对胃癌的发生发展的研究一直是学者们关

注的焦点. RASSF1(ras-association domain family 1)即ras相关区域家族1基因, 是2000 a从肺癌细胞株3号染色体短臂克隆的新型候选抑癌基因^[1, 2]. 它有多种不同mRNA剪接体, RASSF1A是其中主要的一种. 研究发现, RASSF1A基因在正常组织中广泛表达, 而在肿瘤组织中表达经常缺失, RASSF1A基因是人类肿瘤中经常失活的抑癌基因^[3]. 随着表观遗传学的发展, 发现基因启动子区域的异常甲基化是抑癌基因失活的主要机制之一. 我们采用巢式甲基化特异性逆转录聚合酶链反应法, 观察RASSF1A在胃癌及胃良性病变中甲基化发生情况及与临床特征的关系, 为胃癌早期诊断提供有价值的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-06/2005-06手术切除胃癌组织及相应的癌旁组织各32例. 2004-06/2005-06间胃镜下活检标本46例, 包括浅表性胃炎30例, 萎缩性胃炎16例. 离体后迅速放入液氮中冻存, 后转入-80℃冰箱保存备用. 所有患者术前均未经放化疗. 高分化腺癌12例, 中分化腺癌9例, 低分化腺癌11例. 有淋巴结转移25例, 无淋巴结转移7例, 全部病例均经两位病理科医生确诊. 根据美国Medlin国立图书馆基因库检索基因全序列, 电脑软件Primer 5.0版自行设计, RASSF1A测定甲基化(m)和非甲基化(u)程度引物由北京三博远志生物技术有限公司Primer合成. RT-PCR试剂盒购于TaKaRa大连宝生物. PCR反应体系购于上海生工生物技术有限公司.

1.2 方法 组织标本约0.1 g剪碎, 置于DNA裂解液中, 按照DNA试剂盒说明提取基因组DNA, UV-1201型(日本)紫外分光光度计测定DNA浓度, 浓度 A_{260} 约等于1.6, -20℃保存备用. 取5 μg DNA(10 μL)加3 mmol/L的NaOH 15.5 μL, 再加超纯水24.5 μL, 37℃放置15 min. 向碱变性的DNA中加入新鲜配制的3 mmol/L亚硫酸氢钠(NaHSO₃ pH5.0)280 μL和10 mmol/L氢醌(C₆H₆O₂)15 μL, 以矿物油2滴覆盖液面, 50℃保温放置16-20 h. 利用Wizard DNA纯化试剂盒纯化修饰后的DNA. 加入3 mmol/L NaOH 5.5 μL, 室温下放置10-20 min脱硫. 加入6 mmol/L 乙酸氨(NH₄AC)40 μL, 再加预冷的无水乙醇沉淀DNA, 以超纯水30 μL溶解, -20℃过夜. RASSF1A甲基化特异性聚合酶链反应(MS-PCR)共设计了2对引物, 分别用来扩增RASSF1A基因启动子5' CpG位点处于m状态和u状态的等位基因. RASSF1A-m-F 5'-GTG

TTAACGCGTTGCGTATC-3'; RASSF1A-m-R 5'-AACCCCGCGAACTAAAAACGA-3', 扩增长度128 bp, RASSF1A-u-F 5'-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG-3'; RASSF1A-u-R 5'-CAAACCC CACAAACTAAAAACAAA-3', 扩增长度109 bp. PCR反应体积25 μL. 取DNA-Na 5 μL, dd.H₂O 13.3 μL, 10×buffer 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL, Tag酶0.2 μL, 分别取RASSF1A-m上下游引物、RASSF1A-u上下游引物各1 μL. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 95℃变性60 s, 55℃ 60 s, 74℃延伸2 min, 共30个循环, 最后一个循环74℃补延伸5 min. 取上述PCR产物15 μL经20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. 电泳成像拍照并用Kodak 3.5专用软件进行图象分析. 随机选取2例胃癌标本, RASSF1A基因甲基化和未甲基化PCR产物, 送北京三博远志生物技术有限公司测序仪测序分析.

统计学处理 采用卡方检验, 检验水准为: 双侧 $\alpha = 0.05$, 结果用SPSS9.0统计软件处理.

2 结果

2.1 胃癌RASSF1A甲基化发生率 在胃癌全部32例标本中, 有20例(62.5%)发生了RASSF1A基因启动子区甲基化, 其中, 少数为纯甲基化, 大部分为甲基化和非甲基化并存, 即部分甲基化, 而在32例癌旁组织中, 存在RASSF1A基因启动子区甲基化的只有1例(3.1%). 在胃良性病变中, 浅表性胃炎甲基化发生率3.3%低, 而萎缩性胃炎甲基化发生率37.5%高, 胃癌甲基化发生率与癌旁组织及浅表性胃炎发生率比较差异有显著性($P < 0.05$), 其余各组之间比较差异无显著性(图1, 图2). 在RASSF1A甲基化胃癌标本中, 其基因启动子CpG岛的16个CpG位点有14个发生了甲基化, 而未甲基化胃癌标本中, CpG岛的胞嘧啶(C)全部转变成尿嘧啶(T).

2.2 RASSF1A甲基化与病理分型及临床特征的关系 在病理分型之间高分化、中分化胃癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化发生率低于低分化胃癌, 分别为33.3%, 55.6%, 63.6%, 但各类型标本中甲基化发生率各组间比较差异无显著意义($P > 0.05$). 胃癌中有淋巴结转移组甲基化发生率为64%(16/25), 无淋巴结转移组甲基化发生率42.8%(3/7), 两组之间比较差异无显著性.

3 讨论

RASSF1基因是一种抑癌基因, 全长1873 bp, 包

■创新盘点

本文检测RASSF1A在胃癌及胃良性病变中甲基化发生率, 比较良性病变与恶性病变甲基化发生不同情况, 为临床诊断治疗提供依据.

应用要点

本文观察RASSF1A在胃癌中失活情况,进一步研究可应用甲基化抑制剂5-氮-2脱氧胞苷(5-aza-dC)处理后使RASSF1A重新活化,观察其抑癌作用,为临床治疗提供数据。

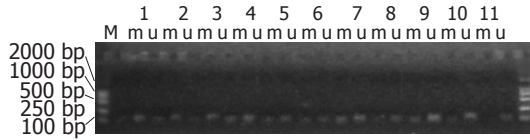


图1 胃癌、胃良性病变中RASSF1A基因MSP结果. M: Marker; m: 甲基化条带; u: 非甲基化条带. 1-2: 癌旁组; 3-4: 浅表胃炎; 5-6: 萎缩胃炎; 7-11: 胃癌。

含2个启动子及6个外显子,在其启动子区域存在16个CpG位点. RASSF1基因由于使用了不同的剪接和启动子,形成3个主要的转录本,即: RASSF1A, RASSF1B, RASSF1C. RASSF1A作为一种肿瘤抑制基因,其功能失活将导致对肿瘤的抑制作用丧失. 现已发现在肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌等多种肿瘤组织中有RASSF1A基因频繁转录失活^[4-5]. 现已明确, RASSF1A在多种肿瘤中表达失活的机制是由于其启动子区CpG岛的特异性高甲基化所致. 并可见到DNA甲基化转移酶I的异常增高. 由此可见,高甲基化介导抑癌基因表达沉寂,在肿瘤的发生中起到重要作用^[6]. 非癌组织中的RASSF1A基因未见或仅见极低频率的甲基化. RASSF1A基因启动子区发生高甲基化的比率在胃癌中是35%-60%,在原发性非小细胞肺癌、乳腺癌中的比率分别是72%-78%, 49%-61%^[7-8]. RASSF1A的失活还可由于突变引起,但突变率小于10%. 失活的RASSF1A经甲基化抑制剂5-氮-2脱氧胞苷(5-aza-dC)处理后重新活化^[9]. 这给临床治疗提供了理论依据。

目前国外有许多RASSF1A甲基化状态的报道. Kang *et al*^[10]应用特异性PCR检查方法,检测了268例胃组织标本中RASSF1A甲基化程度,其中包括急性胃炎、慢性胃炎,肠上皮化生(IM),胃癌(GC)等. 结果发现, RASSF1A高甲基化发生在胃癌中,而在其它病变,如胃腺瘤、肠上皮化生及慢性胃炎中该基因的甲基化率极低^[11]. 另一些研究应用甲基化特异性PCR检查方法检测胃肠上皮化生与甲基化发生率状态关系的结果也证实了这一点^[12-13]. 我们采用巢式MSP法,使扩增倍数更高,灵敏度更高,对胃癌组织及胃良性病变中RASSF1A启动子存在甲基化状态进行检测. 结果发现,在32例胃癌组织中,有62.5%(20/32)的标本中存在RASSF1A基因启动子区甲基化,而癌旁胃组织,存在甲基化的比率只有3.1%,二者之间比较差异有显著意义($P<0.05$). 表明RASSF1A启动子区甲基化参与

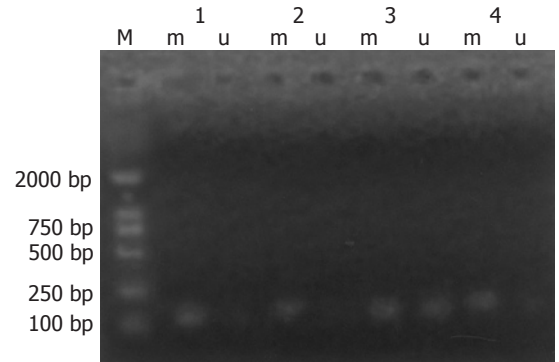


图2 胃癌、胃良性病变中RASSF1A基因MSP结果. M: Marker; m: 甲基化条带; u: 非甲基化条带; 1: 癌旁组织; 2: 浅表胃炎; 3: 萎缩胃炎; 4: 胃癌。

了胃癌的发生发展. 在胃良性病变中,浅表性胃炎甲基化发生率低3.3%,而萎缩性胃炎甲基化程度略高为37.5%,但二者之间比较差异无显著性,可能因为病例少的原因. 胃癌甲基化发生率与癌旁组织及浅表性胃炎发生率比较差异有显著性($P<0.01$). 在胃癌病理组织分化中高分化、中分化胃癌RASSF1A甲基化发生率低于低分化胃癌,但各组之间比较差异无显著性. 本研究表明胃癌中有淋巴结转移和无淋巴结转移组甲基化发生率者分别为64%(16/25)和42.8%(3/7),两组之间比较差异无显著性. 说明RASSF1A甲基化与病理分化程度及淋巴结转移无明显相关性. 本实验PCR产物测序结果显示, RASSF1A甲基化胃癌标本中基因启动子区CpG岛的16个CpG位点有14个发生了甲基化,而未甲基化胃癌标本中, CpG岛的胞嘧啶(C)全部转变成尿嘧啶(T). 说明在胃癌组织中, RASSF1A基因启动子区确实存在CpG位点被甲基化现象. 与文献研究结果一致^[14-15].

根据已被广泛证实的启动子区域的DNA甲基化胞嘧啶的密度和基因转录活性的相互关系^[16],可以认为启动子区域CpG位点甲基化是RASSF1A失活的主要机制,在胃癌的发生过程中发挥主要作用。

4 参考文献

- 1 Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 2000; 60: 6116-6133
- 2 Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25:

- 315-319
- 3 Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 1281-1285
 - 4 Schagdarsurengin U, Seidel C, Ulbrich EJ, Kolbl H, Dittmer J, Dammann R. A polymorphism at codon 133 of the tumor suppressor RASSF1A is associated with tumorous alteration of the breast. *Int J Oncol* 2005; 27: 185-191
 - 5 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812
 - 6 Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M. Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer* 2006; 108: 129-134
 - 7 Dammann R, Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Rastetter M, Papritz M, Hattenhorst UE, Hofmann HS, Silber RE, Burdach S, Hansen G. CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1223-1236
 - 8 Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, Pankow W, Viacava P, Maher ER, Latif F. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients. *Oncogene* 2003; 22: 147-150
 - 9 Zhang X, Yashiro M, Ohira M, Ren J, Hirakawa K. Synergic antiproliferative effect of DNA methyltransferase inhibitor in combination with anticancer drugs in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97: 938-944
 - 10 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
 - 11 To KF, Leung WK, Lee TL, Yu J, Tong JH, Chan MW, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 623-628
 - 12 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
 - 13 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
 - 14 Umetani N, de Maat MF, Sunami E, Hiramatsu S, Martinez S, Hoon DS. Methylation of p16 and Ras association domain family protein 1a during colorectal malignant transformation. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 303-309
 - 15 Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7034-7038
 - 16 Chen YJ, Tang QB, Zou SQ. Inactivation of RASSF1A, the tumor suppressor gene at 3p21.3 in extrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1333-1338

■同行评价

本文研究了RASSF1A在胃癌的发生发展中起重要作用是由于其基因启动子区甲基化。立题新颖,方法成熟,数据可信,对临床指导有重要意义。

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。

原发性胆汁性肝硬化患者自身抗体测定的意义

刘宁, 谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 徐承云

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是肝内胆管进行性破坏并以慢性胆汁淤积为主要特征的不明原因的疾病。中老年女性多见,主要表现为肝内胆管进行性破坏伴门脉炎症改变,最终导致纤维化及肝硬化。PBC检测正日益受到临床的重视,其中以自身抗体的检测最为常用,血清自身抗体的检测对诊断、治疗和阻止原发性胆汁性肝硬化的发展有着十分重要作用。

■研究前沿

原发性胆汁性肝硬化患者检测自身抗体对其疾病的诊断有着十分重要的意义,但还有许多机理不是十分清楚;对自身抗体的检测目前大多还是定性,定量检测将是今后研究的热点。

刘宁, 谭立明, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 南昌大学第二附属医院检验科 江西省南昌市 330006
董叶, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
徐承云, 南昌大学第二附属医院肾内科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 谭立明, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院检验科. yuuje@sohu.com
收稿日期: 2007-03-15 修回日期: 2007-04-21

Clinical application of autoantibodies in patients with primary biliary liver cirrhosis

Ning Liu, Li-Ming Tan, Ye Dong, Li-Ping Cao, Hua Li, Li-Li Cai, Cheng-Yun Xu

Ning Liu, Li-Ming Tan, Li-Ping Cao, Hua Li, Li-Li Cai, Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Ye Dong, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Cheng-Yun Xu, Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Li-Ming Tan, Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yuuje@sohu.com
Received: 2007-03-15 Revised: 2007-04-21

Abstract

AIM: To study the clinical significance of autoantibodies in patients with primary biliary liver cirrhosis (PBC).

METHODS: The patients with PBC ($n = 52$), non-PBC ($n = 202$) and healthy physical examination people ($n = 40$) were examined in this research. Autoantibodies against cell nuclei (ANA), smooth muscle (SMA), mitochondria (AMA), heart cells, skeletal muscle, parietal cells, double-stranded DNA, live-kidney microsomes, soluble antigen, and neutrophil cytoplasm were detected by indirect immunofluorescence assay, and anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies were detected by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS: AMA positive rate was 88.5% (46/52),

which was the highest positive rate in PBC patients. ANA positive rate was 71.2% (37/52) in PBC patients. In non-PBC patients, 20 (positive rate 9.9%) were positive for AMA and 51 (25.2%) were positive for ANA, and these levels were much lower than those in patients with PBC ($P < 0.01$). AMA and SMA in patients with PBC and autoimmune hepatitis (AIH) were markedly different from each other ($P < 0.01$). However, ANA did not differ between PBC and AIH patients. Among 18 patients with primary sclerosing cholangitis (PSC), six were positive for ANA, seven for AMA, and these rates were lower than those in PBC. The ANA positive rate in hepatitis B and hepatitis C patients was 9.0 and 22.2%, respectively. AMA positive rate in hepatitis B and hepatitis C patients was 7.9 and 3.7%, respectively. These data were significantly different from those in PBC patients ($P < 0.01$). ANCA positive rate was 26.9% (14/52) in PBC patients, followed by MPO (25.0%). After χ^2 test, both were much higher than those in AIH patients ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Determination of serum autoantibodies is important for the diagnosis and treatment of PBC, and is valuable for distinguishing PBC from other diseases.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Mitochondrial autoantibodies; Antinuclear autoantibodies; Neutrophil cytoplasmic autoantibodies; Anti-myeloperoxidase; autoantibodies; Indirect immunofluorescence assay; Enzyme-linked immunosorbent assay

Liu N, Tan LM, Dong Y, Cao LP, Li H, Cai LL, Xu CY. Clinical application of autoantibodies in patients with primary biliary liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2358-2361

摘要

目的: 探讨自身抗体测定对诊断原发性胆汁性肝硬化(PBC)的临床意义。

方法: PBC患者52例和非PBC患者202例,其中包括自身免疫性肝炎(AIH)41例,原发性硬化型胆管炎(PSC)18例,乙型肝炎(HBV)89例,丙型肝炎(HCV)54例以及健康体检者40例,采用间接免疫荧光法(IIF)检测抗核抗体

(ANA)、抗平滑肌抗体(SMA)、抗线粒体抗体(AMA)、抗心肌抗体(HRA)、抗骨骼肌抗体(ASA)、抗胃壁细胞抗体(PCA)、抗双链DNA(ds-DNA)抗体、抗肝肾微粒体抗体(LKM)、抗可溶性肝抗原(SLA)抗体和抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)等自身抗体,ELISA法检测抗髓过氧化酶抗体(MPO),并对其结果进行回顾性分析。

结果: PBC患者中AMA阳性例数最高为46例(88.5%), ANA阳性率为71.2%(37/52);非PBC患者中阳性例数则分别为20例(9.9%)和51例(25.2%),两组比较,有非常显著性意义($P<0.01$)。AMA、SMA抗体检测在PBC与AIH患者中,均有非常显著性意义($P<0.01$)。但两组之间的ANA阳性率无显著性意义($P>0.05$)。PSC患者18例ANA阳性6例,AMA阳性7例均低于PBC患者。HBV、HCV感染患者检测ANA阳性率分别只有9.0%和22.2%;AMA阳性率也只有7.9%和3.7%,与PBC患者比较均有显著性差异($P<0.01$)。PBC患者及对照组检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果显示PBC患者检测最高的ANCA阳性率为26.9%(14/52),其次是MPO阳性率为25.0%(13/52),与AIH比较,均有非常显著性意义($P<0.01$)。

结论: 血清自身抗体的检测对诊断、治疗和阻止原发性胆汁性肝硬化的发展有着十分重要作用。对提高PBC同其他疾病鉴别诊断和治疗有着非常重要的意义。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化;抗线粒体抗体;抗核抗体;抗中性粒细胞胞质抗体;抗髓过氧化酶抗体;间接免疫荧光法;酶联免疫测定

刘宁, 谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 徐承云. 原发性胆汁性肝硬化患者自身抗体测定的意义. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2358-2361
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2358.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性进展性自身免疫性疾病,中老年女性多见,主要表现为肝内小胆管进行性破坏伴汇管区炎性改变,最终导致纤维化及肝硬化。过去认为国内很少发病,而且对PBC的认识非常模糊,随着医学免疫学的发展和人们认识水平不断提高,国外文献报道该病患病率呈逐年增加趋势。国内随着检测抗线粒体抗体

(antimitochondrial antibody, AMA)的开展,关于PBC的报道也越来越多。作者应用免疫荧光法对52例PBC患者及202例非PBC等患者进行了自身抗体检测,现将结果报告分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 52例PBC及202例非PBC患者均为南昌大学第二附属医院2000-01/2006-12月门诊、住院确诊病例,均符合2000年美国肝病学会(AASLD)诊断建议^[1],52例PBC患者中男9例,女43例,年龄14-69岁(平均45岁);所查各项病毒感染指标均为阴性,但肝功能均不同程度异常;202例非PBC分别为自身免疫性肝炎(AIH)41例,原发性硬化型胆管炎(PSC)18例,乙型肝炎(HBV)89例,丙型肝炎(HCV)54例,男38例,女164例,年龄为23-71(平均42);健康对照组40例,均为我院体检中心健康体检者,男15例,女25例,年龄22-59(平均37)。ANA、SMA、AMA、HRA、ASA、PCA、ds-DNA、ANCA等自身抗体试剂由德国欧蒙公司生产;MPO采用德国欧蒙公司产生的ELISA法试剂。

1.2 方法 所采的被检标本均为空腹不抗凝血2-3 mL,以2500 r/min速度离心15 min分离血清,各种自身抗体检测的操作方法严格按试剂说明及我科SOP标准文件进行操作。

统计学处理 数据分析均采用SPSS11.5软件进行统计分析,计数资料行 χ^2 检验。

2 结果

PBC组中AMA阳性率最高88.5%(46/52);非PBC对照组AMA阳性率为10.4%(21/202),两组比较,有显著性差异($P<0.01$) (表1)。PBC及非PBC患者检测6种基质片中ANA、SMA、AMA、HRA、ASA和PCA抗体结果显示PBC患者AMA抗体阳性率最高,为88.5%(46/52);其次为ANA阳性率71.2%(37/52),与健康对照组比较,均有显著性差异($P<0.01$)。AMA、SMA抗体检测在PBC与AIH中,均有非常显著性意义($P<0.01$)。但两组之间的ANA阳性率无显著性意义($P>0.05$)。其中PBC患者SMA抗体的阳性率明显低于AIH患者(表2)。PBC患者、非PBC患者及对照组检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果显示PBC患者检测最高的是ANCA阳性率为26.9%(14/52),其次是MPO阳性率为25.0%(13/52),ANCA和MPO抗体检测在PBC与

■ 相关报道

原发性胆汁性肝硬化患者检测自身抗体相关文章不少,但都不是十分全面,而本研究则对其全面报道,特别是ANCA和MPO等抗体的检测是其关键,其相关报道甚少。

■ 创新点

本研究对原发性胆汁性肝硬化患者血清自身抗体进行了检测,并对其结果进行了比较的研究,进一步加深了对原发性胆汁性肝硬化与自身抗体产生关系的认识。其创新之处在于抗MPO抗体的检测。

■应用要点

原发性胆汁性肝硬化与自身抗体的产生有着密切的相关性,原发性胆汁性肝硬化患者的血清中常会出现一些特征性的自身抗体,对于与其他各种肝炎鉴别诊断是极为重要的,其中AMA、ANA、MPO和ANCA抗体同原发性胆汁性肝硬化疾病有着密切的关系。

表 1 PBC与非PBC患者检测ANA、AMA及ANCA的检出率比较

分组	n	ANA		AMA		ANCA	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%
PBC	52	37 ^b	71.2	46 ^b	88.5	14	26.9
非PBC	202	51	25.2	20	9.9	33	16.3
合计	254	88	34.1	66	26.0	47	18.5

^b $P < 0.01$ vs 非PBC.

表 2 PBC及非PBC患者检测ANA、SMA、AMA、HRA、PCA和ASA抗体结果

疾病	n	ANA		SMA		AMA		HRA		ASA		PCA	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%
PBC	52	37	71.2	6 ^b	11.5	46 ^b	88.5	1	1.9	0	0.0	0	0.0
AIH	41	25	61.0	26	63.4	4	9.8	0	0.0	2	4.9	1	2.4
PSC	18	6	33.3	0	0.0	7	38.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
HBV	89	8 ^d	9.0 ^d	1	1.1	7	7.9	0	0.0	1	1.1	0	0.0
HCV	54	12 ^d	22.2 ^d	0	0.0	2	3.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0
对照组	40	2	5.0	0	0.0	1	2.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0

^b $P < 0.01$ vs AIH; ^d $P < 0.01$ vs PBC.

表 3 PBC患者及非PBC患者检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果

疾病	n	ds-DNA		ANCA		LKM		SLA		MPO	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%
PBC	52	1	1.9	14 ^b	26.9	1	1.9	8	15.4	13 ^b	25.0
AIH	41	9	22	25	61.0	4	9.8	4	9.8	26	63.4
PSC	18	1	5.6	8	44.4	0	0.0	0	0.0	7	38.9
HBV	89	0	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
HCV	54	0	0	0	0.0	1	1.9	0	0.0	0	0.0
对照组	40	0	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

^b $P < 0.01$ vs AIH.

■名词解释

髓过氧化物酶(MPO):是存在于中性粒细胞的嗜天青颗粒和单核细胞的溶酶体中,约占中性粒细胞蛋白总量的5%,是分子量为140 KD,等电点为11.0的高阳离子糖蛋白。MPO可以催化过氧化氢(H_2O_2)与氯化铁反应生成次氯酸,在中性粒细胞的氧爆炸产生超氧离子的过程中发挥作用,并可作为抗生素杀灭吞噬的微生物和细菌。

AIH中,差异具有显著性($P < 0.01$)(表3).

3 讨论

PBC是一种可能与自身免疫有关的慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病,主要发生于中年女性,病理学表现为非脓性肝内胆管慢性炎症阻塞和汇管区淋巴细胞浸润,从而导致胆汁淤积,发生肝纤维化及肝硬化。PBC患者常同时合并干燥综合征、SLE等其他自身免疫性疾病。ANA、AMA和ANCA等自身抗体是PBC重要的免疫学诊断指标。本研究表明PBC患者中ANA 37例阳性,阳性率为71.2%、AMA阳性46例,阳性率为88.6%,14例ANCA阳性,阳性率为26.9%,其中AMA阳性率最

高。与其他两组比较,具有显著性意义。

线粒体存在于各种组织细胞,线粒体抗原位于线粒体的内膜和外膜,AMA作为一种自身抗体可进入细胞,并直接与线粒体抗原作用,导致组织细胞的免疫损伤^[2]。以目前研究表明,许多肝病如PBC、HCV、HEV等与自身免疫反应密切相关,但其发生机制仍未完全明了,Covini *et al*^[3]认为病毒可能参与激活自身免疫性疾病及自身抗体的产生。目前为止,发现线粒体膜上存在9种自身抗原(M_{1-9}), M_2 与PBC关系最大^[4-8]。

AMA诊断PBC的特异性比较高,为本病最突出的免疫学指标异常,也是最重要的诊断手段。本研究对52例PBC患者进行了AMA的检测结

果阳性46例,阳性率达88.5%,与非PBC组比较差异有非常显著性意义($P<0.01$).与文献报道基本一致^[10-11].PBC一般认为是免疫调节紊乱引起的自身免疫性疾病,细胞免疫功能低下,同时有体液免疫功能显著增强,血液中可检测到多种自身抗体^[12],特别是AMA对PBC具有重要的早期诊断价值.因此对于长期梗阻性黄疸的患者,尤其是女性患者,在除外肝外梗阻原因后,应及早进行AMA的检测,以便早期明确诊断,降低误诊率.

PBC及非PBC患者检测六种基质片结果显示PBC患者AMA抗体阳性率最高;其次为ANA阳性率为71.2%(37/52),经 χ^2 检验,AMA抗体检测在PBC与AIH中,有非常显著性意义, $P<0.01$.而非PBC患者SMA抗体只有6例阳性,阳性率为11.5%,AIH患者SMA抗体阳性则有26例,阳性率为63.4%,明显高于PBC.与文献报道基本一致^[8-9].18例PSC患者检测结果显示ANA阳性6例、AMA阳性7例均低于PBC,HBV、HCV患者检测ANA阳性率分别只有9.0%和22.2%;AMA阳性率也只有7.9%和3.7%,与PBC比较均明显低于PBC患者.PBC患者及非PBC患者检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果显示PBC患者检测最高的ANCA阳性率为26.9%(14/52),其次是MPO阳性率为25.0%(13/52),经 χ^2 检验,ANCA抗体检测在PBC与AIH中,均有非常显著性意义($P<0.01$).ANCA指与中性粒细胞及单核细胞胞质中的溶酶体反应的抗体,常见抗原是PR3和MPO.Sobajima *et al*^[13]研究发现在AIH中p-ANCA的靶抗原是高泳动类蛋白.p-ANCA是AIH相关自身抗体之一.其靶抗原主要是MPO.部分PSC可检测出该抗体^[14],故p-ANCA有助于PSC的诊断,但不是疾病特异性抗体,p-ANCA还可见于AIH、溃疡性结肠炎、克罗恩病和其他疾病.

我们对肝病患者进行自身抗体的检测,结果阳性率均高于对照组.该结果报道的HBV和HCV提示,HBV患者也可以检出自身免疫抗体,其ANA阳性率为9.0%、SMA阳性率为1.1%和AMA阳性率为7.9%;HCV患者ANA阳性率为22.2%、AMA阳性率为3.7%,同HCV可以诱导产生自身免疫抗体的结论相符^[15-16].提示自身免疫反应有可能参与了肝病的发病,或是与自身抗体具有共同抗原成份有关.所以,我们对肝病患者进行自身抗体的检测十分必要.

总之,血清自身抗体的检测对诊断、治疗和阻止PBC的发展有着十分重要作用.对提高

PBC在临床上同其他疾病鉴别诊断和治疗有着非常重要的意义.

4 参考文献

- 1 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 2 卢建溪,邓练贤,李刚,姚春澜,姚集鲁.肝病患者血清抗线粒体抗体的检测及临床意义. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 220-221
- 3 Covini G, von Muhlen CA, Pacchetti S, Colombo M, Chan EK, Tan EM. Diversity of antinuclear antibody responses in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 26: 1255-1265
- 4 Joplin RE, Neuberger JM. Immunopathology of primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 587-593
- 5 Nakajima M, Shimizu H, Miyazaki A, Watanabe S, Kitami N, Sato N. Detection of IgA, IgM, and IgG subclasses of anti-M2 antibody by immunoblotting in autoimmune cholangitis: is autoimmune cholangitis an early stage of primary biliary cirrhosis? *J Gastroenterol* 1999; 34: 607-612
- 6 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 7 Klein R, Huizenga JR, Gips CH, Berg PA. Antimitochondrial antibody profiles in patients with primary biliary cirrhosis before orthotopic liver transplantation and titres of antimitochondrial antibody-subtypes after transplantation. *J Hepatol* 1994; 20: 181-189
- 8 马东来,张少静,文夫瑞德·斯特克.自身抗体及其免疫荧光模式.第1版.北京:北京科学技术出版社,2000: 58-60
- 9 阎惠平, Winfried Stocker, 贺立香, 张世斌, 李秀惠, 董德庄, 赵春惠.不同肝病患者抗肝抗原自身抗体的研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2002; 22: 522-525
- 10 姜永新.自身抗体的检测与临床应用. *辽宁医学杂志* 1995; 9: 169-171
- 11 Bassendine MF, Yeaman SJ. Serological markers of primary biliary cirrhosis: diagnosis, prognosis and subsets. *Hepatology* 1992; 15: 545-548
- 12 Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Autoimmune cholangitis within the spectrum of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2000; 31: 1231-1238
- 13 Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, Osakada F, Inoue M, Fukuda Y, Shirakawa H, Yoshida M, Rokuhara A, Imai H, Kiyosawa K, Nakao K. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44: 867-873
- 14 Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 239-249
- 15 McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 689-701
- 16 Manns MP. Hepatotropic viruses and autoimmunity 1997. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 1: 7-10

■同行评价

本文采用简介免疫荧光法对52例原发性胆汁性肝硬化(PBC)与202例非PBC患者及健康人的血清进行了多种自身抗体的检测,得出了一些有意义的结果,实验资料可信,对临床工作者具有实际指导意义,有较好的参考价值.

腹腔镜手术治疗机械性肠梗阻的应用价值

周保军, 宋伟庆, 闫庆辉, 张占学, 林林, 李冬斌, 任鹏涛

■背景资料

肠梗阻是临床上常见的疾病之一, 大部分的肠梗阻患者需要手术治疗, 常规的开放性手术对肠梗阻的治疗效果良好, 但是对患者的创伤较大、术后黏连性肠梗阻的发生率高, 部分患者需要反复手术, 其效果不尽人意。腹腔镜技术的出现和水平的不断提高, 为治疗机械性肠梗阻提供了一个切实可行的方法。

周保军, 宋伟庆, 闫庆辉, 张占学, 林林, 李冬斌, 任鹏涛, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
通讯作者: 周保军, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科. zhoubaojun67@hotmail.com
电话: 0311-66002983
收稿日期: 2007-04-09 修回日期: 2007-05-11

Clinical application of laparoscopy for treatment of mechanical intestinal obstruction

Bao-Jun Zhou, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Zhan-Xue Zhang, Lin Lin, Dong-Bin Li, Peng-Tao Ren

Bao-Jun Zhou, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Zhan-Xue Zhang, Lin Lin, Dong-Bin Li, Peng-Tao Ren, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Bao-Jun Zhou, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhoubaojun67@hotmail.com
Received: 2007-04-09 Revised: 2007-05-11

Abstract

AIM: To assess the feasibility and safety of laparoscopy for treatment of mechanical intestinal obstruction.

METHODS: Thirty patients with mechanical intestinal obstruction underwent laparoscopic treatment. The etiology of the mechanical intestinal obstruction was: intestinal adhesion ($n = 18$), internal hernia ($n = 1$), volvulus ($n = 1$), intussusception induced by diverticulum of the small intestine ($n = 1$), intestinal stromal tumor ($n = 3$), small colorectal cancer ($n = 1$), inflammatory bowel disease ($n = 3$), and colon cancer ($n = 2$).

RESULTS: Twenty-eight patients were successfully treated by laparoscopy; 17 of these underwent a laparoscopic operation, and 11 underwent a laparoscopy-assisted procedure. Conversion to a laparotomy occurred in two patients because of serious adhesions. Operation time for the 28 patients who were successfully treated ranged from 30 to 200 minutes. After their operation, patients felt less pain and recovered

quicker than usual, and bowel function recovered within 1-2 days. The average postoperative length of stay was 5 d. Patients were followed up for 4--32 months, and none had recurrence.

CONCLUSION: Laparoscopy is a good diagnostic tool, as well as being applicable to clinical treatment of mechanical intestinal obstruction. Laparoscopy may reduce subsequent formation of adhesions.

Key Words: Laparoscopy; Mechanical intestinal obstruction; Surgery

Zhou BJ, Song WQ, Yan QH, Zhang ZX, Lin L, Li DB, Ren PT. Clinical application of laparoscopy for treatment of mechanical intestinal obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2362-2365

摘要

目的: 探讨腹腔镜在机械性肠梗阻手术中的可行性与安全性。

方法: 应用腹腔镜技术为机械性肠梗阻30例患者实施了手术治疗, 包括肠粘连18例、肠管内疝1例、肠扭转1例、小肠憩室导致肠套叠1例、小肠间质瘤3例、小肠癌1例、肠道炎症3例和结肠癌2例。

结果: 28例患者在腹腔镜下完成手术, 其中完全腹腔镜手术17例, 腹腔镜辅助手术11例。其余2例患者因腹腔内粘连严重中转开腹。成功进行腹腔镜手术的时间30-200 min, 患者术后疼痛轻、肠道功能恢复快、术后排气时间1-2 d, 无手术并发症的发生。平均术后住院时间5 d, 经过4-32 mo随访, 均无肠梗阻症状的发生。

结论: 腹腔镜手术治疗机械性肠梗阻是一种比较安全且有效的手术方法, 能够减少术后腹腔内再粘连的形成。

关键词: 腹腔镜; 机械性肠梗阻; 手术治疗

周保军, 宋伟庆, 闫庆辉, 张占学, 林林, 李冬斌, 任鹏涛. 腹腔镜手术治疗机械性肠梗阻的应用价值. *世界华人消化杂志* 2007; 15(21): 2362-2365

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2362.asp>

0 引言

对于机械性肠梗阻, 传统的开腹手术虽能去除病因解除梗阻, 但创伤较大, 术后并发症多, 恢复期长. 随着腹腔镜技术的不断成熟与发展, 人们开始探索使用腹腔镜治疗小肠梗阻^[1-2]. 我们应用腹腔镜技术治疗机械性肠梗阻30例, 取得比较满意的临床效果.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-08/2007-01, 采用腹腔镜治疗机械性肠梗阻30例, 男14例, 女16例, 年龄16-72岁. 其中急性肠梗阻13例, 不完全性肠梗阻17例, 其中11例患者由于肠梗阻经常发作而反复住院, 住院后经胃肠减压、禁食、补液等保守治疗, 急性肠梗阻症状虽有缓解, 但出院后症状仍存在, 时常出现腹痛和腹胀. 有腹部手术史患者19例, 肠梗阻病因包括: 粘连性梗阻($n = 18$)、肠管内疝($n = 1$)、肠扭转($n = 1$)、小肠憩室导致肠套叠($n = 1$)、小肠间质瘤($n = 3$)、小肠癌($n = 1$)、肠道炎症($n = 3$)、结肠癌($n = 2$)等. 手术方法: 完全腹腔镜手术17例, 腹腔镜辅助手术11例, 中转开腹手术2例. 采用30度腹腔镜, 腔镜用无创抓钳、剪刀、电剪刀、超声刀.

1.2 方法 全麻术前准备同常规开腹手术, 患者均采用气管内插管、静脉全身麻醉, 平卧位, 显示器位置在患者的头侧或脚侧, 手术者的位置根据手术中的情况不同随时调整. 对于由既往腹部手术后粘连, 以及其他各种因素导致的粘连性肠梗阻, 实施腹腔镜肠粘连松解术; 对于肠扭转患者, 实施腹腔镜小肠扭转复位术. 对于在分离过程中出现肠管破裂, 术者可根据自己的技术水平选择腹腔镜下单纯缝合修补或体外修补治疗. 对于小肠肿瘤、小肠局限性炎症狭窄、广泛的小肠粘连分离困难、或浆膜损伤过大者、严重的小肠损伤、不能单纯缝合修补者、肠套叠、可疑肠绞窄、肠系膜血液供应障碍者, 行腹腔镜辅助下肠管部分切除术或中转开腹手术.

1.2.1 穿刺孔的位置 第一穿刺孔(观察孔)选择非常重要, 成功地放置好第一个穿刺套管, 建立起人工气腹, 意味着手术成功了一半. 由于大部分患者有腹部手术史, 其手术切口多数同脐部的距离较小, 在脐下形成粘连的机会大, 如果采用脐部为第一穿刺孔, 容易损伤腹腔脏器. 再者, 观察腹腔全貌需要将腹腔镜进行360度旋转, 操作不方便. 因此, 根据切口的位置不同, 首先选择远离切口的左上腹或左下腹为第一穿刺孔,

这样不但可以减少腹腔脏器损伤的可能, 而且能够方便地对腹腔全貌进行观察, 再根据腹腔探查情况在腹壁上其他部位选择穿刺点. 应注意操作孔的穿刺套管中至少有1-2个套管直径应是10-12 mm以便于腹腔镜和器械的位置互换观察孔, 以便对腹腔内可能存在的盲区进行观察和方便手术操作. 各操作孔之间的位置不宜过近, 以免各手术器械互相碰撞干扰, 影响手术操作, 一般穿刺套管相距在8-10 cm为宜, 使术者左右手的器械夹角为60度最为合适. 对于第一穿刺套管的置入, 最好采用开放性技术置入穿刺套管鞘的方法, 可有效地避免损伤肠管等腹腔内脏器. 当然也可以采用常规用气腹针穿刺的方法建立气腹后进行穿刺放置套管.

1.2.2 腹腔内脏器的探查 腹腔镜手术中寻找梗阻部位的方法与传统的开腹手术基本相同, 可以通过肠管的扩张来判定, 肠管扩张与非扩张的交界处常常是肠管的梗阻部位. 手术中可根据观察孔位置不同, 可采用从上到下或从下到上的顺序对小肠进行探查. 具体操作时使用两把无创抓钳交替抓持小肠从空肠起始部自上而下的顺序对肠管进行检查从而找到梗阻的部位, 或从回盲部开始用两把无创抓钳交替抓持小肠, 循远端小肠逐步向近端小肠移动, 直到找到肠管梗阻的部位. 一般情况下, 从回盲部逆行寻找梗阻部位操作相对更容易. 找到梗阻部位后, 可以明确诊断机械性肠梗阻的原因如肠管粘连成角、粘连带压迫、肠套叠、肠扭转、肠管内疝或恶性肿瘤等, 从而针对不同病因进行相应处理. 在梗阻解除后, 可见到扩张肠管的张力消失, 肠管逐渐转红润, 病变段肠管在腹腔内可以任意移动. 这时, 应再次仔细检查是否存在腹腔脏器的损伤, 并排除腹腔内其他疾病. 对于腹腔镜手术中偶然发现的肿瘤等其他疾病, 术者可根据自己的腹腔镜技术水平、临床经验及设备情况灵活处理.

1.2.3 分离器械的使用 剪刀分离: 正确使用剪刀是外科医师应掌握得基本功之一. 剪刀是剪断血管、腹膜和分离粘连的最好的器械, 使用方便, 但组织易出血; 电刀分离: 电刀的工作原理是电流通过人体组织时, 因电阻大引起发热, 产生100℃-200℃高温使组织细胞变性、坏死、干燥、汽化、碳化、焦痂, 而达到止血或切割的目的. 对于疏松的组织粘连, 用电刀可以轻松对其进行松解, 但对于成团或致密的粘连用电刀处理就比较困难, 容易引起组织损伤且易出

■创新盘点

本文将腹腔镜在肠梗阻疾病的应用范围由治疗单纯黏连性肠梗阻扩展到对机械性肠梗阻的病因探查及手术治疗, 并探讨了手术方法, 对腹腔镜技术的推广和应用有一定价值.

■应用要点

本文阐明腹腔镜肠梗阻手术的意义:腹腔镜手术不但可以明确机械性肠梗阻的病因,而且可以选择对患者创伤较小的手术方法对肠梗阻进行治疗,并能够减少术后黏连性肠梗阻发生的机率,可取得良好的临床效果。

血,手术时间长,电刀工作时,会产生大量的烟雾,对手术视野的清晰度会产生一定影响。但其价格便宜,易于普及;超声刀分离:超声刀的工作原理是通过超声频率发生器将电能转换为机械能,使金属刀头产生55.5 kHz的机械振荡,带动组织振动,继而使组织内水分子汽化、蛋白质氢键断裂、细胞崩解、组织被切开或凝固、血管闭合。与电刀相比,超声刀的优点有:精确的切割作用,超声刀产热少,且波及范围一般为2 mm,不会传导损伤周围组织。在肠粘连松解术中用超声刀分离粘连索带等粘连的组织时,肠管热损伤的机会比电刀要少。超声刀同时具有分离、止血、切割等功能,故术中不需频繁更换手术器械,而且少烟少焦痂,使术野更清晰,手术时间短。超声刀对使组织、肠管的创伤小,可减少钛夹、线结等异物的腹腔内存留,能够降低腹腔内组织创面的渗出,使术后再次出现肠粘连的几率明显变小。但是,超声刀价格较昂贵,使其广泛使用受到一定程度上的限制^[3]。

1.2.4 粘连的分离和再粘连的预防 临床上机械性肠梗阻以手术后所致粘连梗阻最多见。有时粘连仅是一条纤维束带,多数情况下粘连的分离并不困难,只要松开粘连即可治愈疾病。当肠粘连发生在原腹壁手术切口疤痕处时,要根据实际情况灵活使用剪刀、电刀和超声刀。分离肠管与腹壁的粘连时应遵循宁伤腹壁,勿伤肠管原则,尽可能保留肠管的完整性。若遇到肠道间多处致密粘连,腹腔镜下操作困难时,应适时改为腹腔镜辅助下手术或中转开腹,以减少肠管的损伤。对存在明显腹腔炎症、术中有肠管修补或止血不理想、肠切除肠吻合等情况,放置腹腔引流管比较稳妥。术中操作时要轻柔,尽量避免对肠管和组织的损伤,减少创面渗出。术中应严密止血,彻底清洗腹腔以稀释腹腔创面上的炎性介质和纤维蛋白原,减少腹腔渗液,可降低术后腹腔内组织机化形成新粘连带的几率。手术结束前于腹腔内脏器创面涂抹防粘连药物如几丁糖、透明质酸钠或生物蛋白胶,特别是生物蛋白胶可以形成薄膜封闭创面,促进创面修复,预防术后再粘连的发生^[4]。

2 结果

本组患者30例,17例患者在完全腹腔镜下完成手术,手术方式包括:腹腔粘连带切断($n = 6$)、肠管同腹壁粘连松解($n = 7$)、小肠扭转复位($n = 1$)、肠管之间粘连松解($n = 3$)、肠管镜下缝合

修补($n = 2$)。11例患者用腹腔镜完成腹腔内手术,再在腹壁做一小切口将肠管提出腹腔外,行肠管修补、部分肠管的切除及吻合、右半结肠切除术。手术时间最短30 min,最长200 min,平均手术时间 52 ± 27 min。患者均于术后第1-2 d下床活动,术后48 h内胃肠功能恢复肛门排气排便、进食后无梗阻症状出现,术后平均住院时间5 d。其余2例,因腹腔内粘连严重,腹腔镜手术困难而中转开腹手术。

本组患者切口皆甲级愈合痊愈出院,无围手术期并发症。所有病例均获随访4-32 mo,无肠梗阻复发等远期并发症的发生。

3 讨论

腹腔镜手术治疗机械性肠梗阻是一种既可以明确梗阻原因又可以进行有效治疗的方法^[5-6],腹腔镜肠梗阻手术成功的关键是病例的选择,也就是手术适应证的掌握,但由于目前报道病例较少,还没有比较公认的手术适应证,根据相关的文献资料^[7-8],结合我们的实践经验认为(1)适应证:腹腔镜手术治疗机械性肠梗阻的适应证同传统的开腹手术没有根本的区别,但由于腹腔镜技术的特点而受到一定的限制。一般而言,其手术适应证相对更加严格一些,包括各种原因引起轻、中度腹胀的急性单纯性机械性肠梗阻;慢性不完全性机械性肠梗阻;复发性肠梗阻或腹部手术后曾经发作3次以上的机械性肠梗阻。(2)禁忌证:绝对禁忌证:腹腔镜急性肠梗阻手术的绝对禁忌证和其他腹腔镜手术相同,包括出血性疾病,不能耐受全麻和气腹者等;严重腹胀、肠管极度扩张者,不宜建立气腹,严重影响术野的显露和观察者。相对禁忌证:弥漫性腹膜炎者;术中发现肠襻间广泛致密的包裹性粘连;肠管血运障碍明显、复位困难的肠扭转者,这时开腹手术较为安全;术者认为手术危险性较大者,或依靠目前的腹腔镜技术与设备难以安全完成手术者,均应开腹手术,适时中转开腹是保证病人的安全的必要措施。

本研究表明腹腔镜手术可以解除腹腔内的粘连,具有创伤小、对腹腔干扰小、下床活动早、胃肠道功能恢复快等优点,同Leon *et al*^[9], Khaikin *et al*^[10]报告一致,腹腔镜手术不受体态肥胖、腹壁肥厚等因素的影响,手术视野广且具有清晰的放大功能,可对腹腔进行比较全面的探查,并能清楚地观察到开腹手术不易观察到的部位,做出较为准确的术中诊断,对手术方

案的确定有较大帮助. 腹腔镜手术腹壁创伤微小, 手术在密闭状态下操作, 避免了肠管等腹内脏器暴露于干燥的空气中并可减少对肠管的机械、物理刺激, 使肠管和脏器的损伤降低到最低点, 也弥补了开腹手术手套滑石粉、微粒物质容易进入腹腔的不足, 腹腔内异物污染的可能性也极小. 由于腹腔内组织炎症反应小, 腹腔镜手术可显著降低术后肠粘连梗阻的发生率^[11]. 从微创外科角度上看, 许多情况下, 急性机械性肠梗阻的手术亦只是一剪之劳, 传统的开腹手术给腹壁带来的创伤远远大于腹腔内的创伤, 因此, 腹腔镜手术治疗急性肠梗阻是能够充分体现微创外科技术优越性的手术之一. 但是腹腔镜只能观察脏器的表面病变情况, 术者又不能用手直接触摸腹腔内的组织, 在很大程度上丧失了外科医师的精细触觉功能, 易造成腹膜间位或后位器官、部分腹内脏器等病变的遗漏. 腹腔镜手术设备及器械有一定的局限性, 在探查腹腔寻找梗阻部位及术野暴露上不如开腹手术方便. 腹腔镜手术只能依赖专用手术器械处理病变, 手术操作难度增大. 腹腔镜手术器械纤细, 而梗阻肠管充血水肿扩张, 肠管壁变薄、脆性增大, 稍有不慎易损伤肠管且损伤后寻找及处理亦相对困难.

总之, 应用腹腔镜技术治疗机械性肠梗阻是一种比较有效且实用的治疗方法, 在临床上有很好的推广和应用价值, 但必须严格掌握手术适应症. 由于机械性肠梗阻手术治疗是一种不定型手术, 因此需要具有熟练的腹腔镜技术、临床经验丰富的医师来操作才能最大限度保证手术的安全性, 减少医疗差错和医疗事故的发生.

4 参考文献

- 1 Lujan HJ, Oren A, Plasencia G, Canelon G, Gomez E, Hernandez-Cano A, Jacobs M. Laparoscopic management as the initial treatment of acute small bowel obstruction. *JSLs* 2006; 10: 466-472
- 2 Chowbey PK, Panse R, Sharma A, Khullar R, Soni V, Baijal M. Elective laparoscopy in diagnosis and treatment of recurrent small bowel obstruction. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2006; 16: 416-422
- 3 李前, 王存川, 吴东波, 徐以浩. 超声刀在腹腔镜肠粘连松解术中的应用. *中国普外基础与临床杂志* 2005; 12: 71-73
- 4 Boris WJ, Gu J, McGrath LB. Effectiveness of fibrin glue in the reduction of postoperative intrapericardial adhesions. *J Invest Surg* 1996; 9: 327-333
- 5 Franklin ME Jr, Gonzalez JJ Jr, Miter DB, Glass JL, Paulson D. Laparoscopic diagnosis and treatment of intestinal obstruction. *Surg Endosc* 2004; 18: 26-30
- 6 Liauw JJ, Cheah WK. Laparoscopic management of acute small bowel obstruction. *Asian J Surg* 2005; 28: 185-188
- 7 Al-Mulhim AA. Laparoscopic management of acute small bowel obstruction. Experience from a Saudi teaching hospital. *Surg Endosc* 2000; 14: 157-160
- 8 Kirshtein B, Roy-Shapira A, Lantsberg L, Avinoach E, Mizrahi S. Laparoscopic management of acute small bowel obstruction. *Surg Endosc* 2005; 19: 464-467
- 9 Leon EL, Metzger A, Tsiotos GG, Schlinkert RT, Sarr MG. Laparoscopic management of small bowel obstruction: indications and outcome. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 132-140
- 10 Khaikin M, Schneiderei N, Cera S, Sands D, Efron J, Weiss EG, Noguera JJ, Vernava AM 3rd, Wexner SD. Laparoscopic vs. open surgery for acute adhesive small-bowel obstruction: patients' outcome and cost-effectiveness. *Surg Endosc* 2007; 21: 742-746
- 11 Tsao KJ, St Peter SD, Valusek PA, Keckler SJ, Sharp S, Holcomb GW 3rd, Snyder CL, Ostlie DJ. Adhesive small bowel obstruction after appendectomy in children: comparison between the laparoscopic and open approach. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 939-942; discussion 942

■同行评价

本文分析了腹腔镜在机械性肠梗阻手术治疗中的应用是安全有效的, 选题实用, 分析有据, 结论可信, 对临床应用有很强的参考价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才

HBV感染后外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与疾病进展的相关性

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞毒性病毒,其导致的肝细胞损坏是由机体针对HBV特异性抗原的免疫反应所引起,而且HBV感染的发生、发展和转归与宿主的免疫状态密切相关。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞可抑制天然及获得性免疫系统功能,对于维持免疫耐受及稳态具有重要作用。

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲, 中国医科大学附属第一医院辽宁省沈阳市 110001
辽宁省教育厅高等学校科研项目, No. 05L548
通讯作者: 李异玲, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化科. zhouliping750825@163.com
电话: 024-83282164
收稿日期: 2007-01-21 修回日期: 2007-02-08

Correlation between expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and progression of hepatitis B virus infection

Li-Ping Zhou, Xin Chen, Jing Ba, Lian-Shuang Zhao, Yi-Ling Li

Li-Ping Zhou, Xin Chen, Jing Ba, Lian-Shuang Zhao, Yi-ling Li, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: The Scientific Research Project for Universities of Education Department of Liaoning Province, No. 05L548

Correspondence to: Yi-Ling Li, the Department of Gastroenterology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhouliping750825@163.com
Received: 2007-01-21 Revised: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between progression of hepatitis B virus (HBV) infection and expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

METHODS: One hundred and thirty-six HBV-infected patients and 40 healthy controls were selected. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells expressing was detected by flowcytometry, clinical data of HBV infected patients was considered.

RESULTS: Expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in HBV-infected patients increased markedly compared with that in healthy controls (7.48 ± 1.03% vs 3.58 ± 0.71%, *P* < 0.01). There was also a significant difference chronic hepatitis B compared with chronic severe hepatis-

tis B (6.55 ± 1.26% vs 8.65 ± 2.58%, *P* < 0.05). The log value of HBV load correlated positively with the expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (*r* = 0.332, *P* < 0.05).

CONCLUSION: Peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells levels are closely correlated with the progression of HBV infection.

Key Words: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells; Hepatitis B virus; Flow cytometry

Zhou LP, Chen X, Ba J, Zhao LS, Li YL. Correlation between expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and progression of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2366-2369

摘要

目的: 探讨HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平与HBV感染后疾病进程的相关性。

方法: HBV感染者136名及健康对照40名,应用流式细胞仪胞内染色技术检测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达,结合HBV感染者临床情况进行分析。

结果: HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高(7.48% ± 1.03% vs 3.58% ± 0.71%, *P* < 0.01);慢性乙肝组与慢性重型乙肝组相比,外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率有明显差异(6.55% ± 1.26% vs 8.65% ± 2.58%, *P* < 0.05); HBV病毒载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率之间存在正相关(*r* = 0.332, *P* < 0.01)。

结论: HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平与疾病进展明显相关。

关键词: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞; 乙型肝炎病毒; 流式细胞仪

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲. HBV感染后外周血

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与疾病进展的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2366-2369
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2366.asp>

0 引言

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞占健康人外周CD4⁺T细胞数量的5%-10%,可抑制天然及获得性免疫系统的功能,对于维持免疫耐受及稳态具有重要作用^[1],但CD25分子在其他T淋巴细胞中也有表达,不能作为调节性T细胞的特异性标志.目前多项研究表明,叉头状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor, Foxp3)主要表达在CD4⁺CD25⁺调节性T细胞上,与调节性T细胞的功能密切相关,是目前定义CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的最好标志物^[2].乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞毒性病毒,其所致的肝细胞损坏是由机体针对HBV特异性抗原的免疫反应所引起,而且HBV感染的发生、发展和转归与宿主的免疫状态密切相关.由于CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞可以控制机体损伤后的免疫反应^[3],我们通过流式细胞仪技术检测HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平,结合患者临床分期及病毒载量,探讨CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与HBV感染后疾病进程的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-06/2006-12住院HBV感染者136例,男84例,女52例,年龄21-75岁.其中慢性乙肝53例,慢性重型乙肝42例,肝炎肝硬化41例,无重叠或混合感染.所有病例均符合2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断分型标准^[4].选择健康人40例作为健康对照组,无急慢性心、肝、肾等疾病.APC标记的鼠抗人CD25mAb(抗CD25-APCmAb),FITC标记的鼠抗人CD4mAb(抗CD4-FITCmAb),PerCP标记的鼠抗人CD3mAb(抗CD3-PerCPmAb),溶血素等均为美国BD公司产品;PE anti-human Foxp3染色试剂盒购自美国eBioscience公司;HBV DNA采用实时定量PCR定量检测,试剂选用深圳匹基公司生产HBV核酸扩增(PCR)检测试剂盒.

1.2 方法 静脉血2 mL,EDTA抗凝,混匀,取全血100 μL放入另一试管,分别加入CD3-PerCP 10 μL、抗CD4-FITC 10 μL和抗CD25-APC 10 μL,混匀后室温避光放置30 min,然后加入溶血素2 mL,室温避光10 min.用PBS洗涤后加入

破膜/固定剂1 mL,4℃避光染色40 min.洗涤后加入20 mL/L鼠血清2 μL,4℃避光15 min,加入anti-Foxp3-PE及IgG2a-PE同型对照,4℃避光30 min,洗涤后加入含10 g/L多聚甲醛的PBS重悬,FACS Aria流式细胞仪Diva软件进行分析.以FSC、SSC、CD3-PerCP、CD4-FITC定义CD4⁺T细胞,计算这一细胞群内CD25⁺Foxp3⁺细胞的比率.病毒载量采用实时荧光定量PCR方法,用美国Roche公司的LightCycler自动载量仪测定HBV病毒载量.

统计学处理 不同HBV感染组及健康组CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞水平比较采用方差分析,LSD法进行两两比较;相关性分析采用Pearson相关系数.数据用mean±SD表示,所有资料采用SPSS11.5软件系统进行分析.

2 结果

2.1 HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达 HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率为7.48%±1.03%,健康对照组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率为3.58%±0.71%.HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高($t = 14.724, P < 0.001$).

2.2 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达与临床分期的关系 不同临床分期的HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率均明显高于健康对照组($P < 0.05$,表1),其中慢性乙肝组,重型乙肝组,肝硬化组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达百分率分别为6.65%,8.65%和7.26%.慢性乙肝组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率与慢性重型乙肝组相比有统计学意义($P < 0.05$).慢性乙肝组T调节细胞表达率虽低于乙肝后肝硬化组,但差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.3 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞表达与HBV载量的相关性 136位患者均进行了HBV-DNA含量的检测,检测结果为 $5.0 \times 10^5 - 10^{10}$ copies/L.HBV载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率之间存在正相关($r = 0.332, P < 0.01$).

3 讨论

目前研究认为HBV感染引起的慢性肝炎主要是免疫损伤所致,HBV感染免疫状态研究对于进一步分析HBV感染的发病机制有重要的作用^[5].

■应用要点
 监测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞比例有望成为评价HBV感染者体内细胞免疫状态和了解疾病进展的有效细胞免疫指标.

■名词解释

调节性T细胞: 是近年发现的具有免疫抑制功能的抑制性T细胞群, 对于维持免疫系统稳态及免疫耐受具有重要作用, 可通过非抗原特异性方式如直接接触抑制或分泌细胞因子等抑制免疫系统的功能, 但其免疫抑制机制尚不完全清楚。

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞是近年发现的具有免疫抑制功能的抑制性T细胞群, 对于维持免疫系统稳态及免疫耐受具有重要作用, 可通过非抗原特异性方式如直接接触抑制或分泌细胞因子等抑制免疫系统的功能, 但其免疫抑制机制尚不完全清楚^[6]。Franzese *et al*^[7]对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在急慢性HBV感染中的发病机制进行了研究, 认为无论急性HBV感染还是慢性HBV感染, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞均可下调针对HBV特异性抗原的CD8⁺ T细胞的功能。Stoop *et al*^[8]研究认为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与HBV感染慢性化机制有关。目前尚未见到有关CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与HBV感染后疾病进展相关性的报道。我们的研究结果表明, HBV患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高, 这与国外文献报道相一致^[7-8], 提示HBV感染者体内免疫系统功能受抑制, 不能及时有效的清除病毒, 促进疾病慢性化。我们还发现: 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的表达水平与HBV感染的临床分期相关。与慢性重型乙肝组相比, 慢性乙肝组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率有明显统计学差异, 提示HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞介导的免疫耐受和HBV感染后疾病进展程度密切相关, 可能直接参与肝脏免疫损伤的发生过程。因此, 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的表达率可能是一个较好的反映细胞免疫功能的参考指标, 可以在临床上用于免疫功能的监测, 同时该指标亦可判断HBV感染后疾病的进展及预后。我们分析其机制可能为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞能够抑制HBV特异性CD8⁺ T细胞的功能, 使CTL功能受损, 导致疾病进展^[9]。

我们的实验结果还显示, HBV感染后其病毒载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率之间存在正相关, 提示HBV感染后体内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞表达上调, 促进HBV病毒复制。其机制可能为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞可以通过抑制单核细胞和巨噬细胞产生IFN- γ , 而后者可以通过阻断病毒前基因组mRNA介导的核心颗粒装配来抑制HBV复制的^[10]。Furuichi *et al*^[11]在活体动物实验中发现, 如果预先清除小鼠体内的CD25⁺ T细胞, 通过基因治疗后的鼠体内针对HBV特异性的效应CD8⁺ T细胞数量显著升高。因此如果我们能够抑制CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞的增生

表 1 HBV感染者临床分期与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达百分率(%)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
慢性乙肝	53	67.8 ± 8.2	39.3 ± 8.7	6.6 ± 1.3 ^{ac}
		慢性重型	42	66.4 ± 7.4
乙肝	41	64.6 ± 6.5	36.6 ± 7.0	7.3 ± 2.0 ^a
乙肝后肝	40	69.4 ± 10.4	41.2 ± 9.3	3.6 ± 1.1
硬化		健康对照		

^aP<0.05 vs 健康对照组; ^cP<0.05 vs 慢性重型乙肝组。

和分化或阻断其调控途径, 或许能够下调其免疫抑制功能, 同时降低HBV病毒复制, 这将为慢性HBV感染的治疗寻找一条新途径。

总之, HBV感染者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与疾病进展密切相关, 监测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞比例有望成为评价患者体内细胞免疫状态和了解疾病进展的有效细胞免疫指标。我们初步探讨了不同临床分期的HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的数量, 为以后的进一步深入研究打下基础。为了进一步阐明CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞在HBV感染后发病机制及治疗中的作用, 还需要对患者体内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞功能进行详细的研究。

4 参考文献

- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, Mannick JA, Lederer JA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 2005; 174: 2957-2963
- 传染病与寄生虫学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 52-62
- Diepolder HM, Gruener NH, Gerlach JT, Jung MC, Wierenga EA, Pape GR. Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4⁺ T-cell clones. *J Virol* 2001; 75: 7803-7810
- von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338-344
- 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
- 8 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
- 9 Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 1437-1448
- 10 Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66: 222-230
- 11 Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Moriyasu F, Kakimi K. Depletion of CD25⁺CD4⁺T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8⁺ T cell response primed by DNA immunization. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3772-3777

■同行评价

本文检测不同乙肝患者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与乙肝病程等的关系,有一定学术价值,结果可信,讨论条理分明,参考文献引用较新,对HBV感染者的防治提供了有意义的信息。

编辑 何燕 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 •

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。