

# IL-10抗肝纤维化的实验研究及临床现状

王小众, 张莉娟

王小众, 张莉娟, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

王小众, 北京大学医学博士, 纽约大学访问医师, 主任医师, 教授, 博士生导师. 国务院特殊津贴专家, 福建省百千万人才, 主要从事肝纤维化实验与临床和乙型肝炎病毒分子病毒学研究.

福建省科技计划开发项目, No. 2005D094

通讯作者: 王小众, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学协和医院消化内科. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-3357896-8482

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-02

## Status of experimental and clinical research into the anti-fibrotic effects of interleukin-10

Xiao-Zhong Wang, Li-Juan Zhang

Xiao-Zhong Wang, Li-Juan Zhang, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by: Science and Technology Program of Fujian Province, No. 2005D094

Correspondence to: Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. drwangxz @pub6.fz.fj.cn

Received: 2007-05-18 Revised: 2007-08-02

## Abstract

Although liver fibrosis represents a process of healing and scarring in response to chronic liver injury, there is a lack of effective therapy that targets liver fibrosis. Interleukin-10 (IL-10) is a cytokine that down-regulates pro-inflammatory responses. *In vitro* and animal experiments have suggested that IL-10 plays an important role in hepatic fibrogenesis. Recombinant human IL-10 has been produced and is undergoing clinical trials. IL-10 therapy may be clinically effective against liver fibrosis.

Key Words: Liver fibrosis; Interleukin-10

Wang XZ, Zhang LJ. Status of experimental and clinical research into the anti-fibrotic effects of interleukin-10. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2469-2472

## 摘要

肝纤维化是慢性肝损伤时的修复和疤痕形成

过程, 目前尚缺乏有效的治疗方法. 白细胞介素-10(IL-10)为一种下调炎症反应的细胞因子, 体内外试验证实其在肝纤维化过程中有重要作用. 重组人IL-10已在临床试用. IL-10可能是治疗肝纤维化的一种有效方法, 具有潜在的临床应用价值.

关键词: 肝纤维化; 白介素-10

王小众, 张莉娟. IL-10抗肝纤维化的实验研究及临床现状. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2469-2472

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2469.asp>

## 0 引言

肝纤维化不是一个独立的疾病, 而是许多慢性肝病共同病理过程. 肝纤维化是细胞外基质的合成与降解失衡导致细胞外基质在细胞间质的过度沉积<sup>[1-4]</sup>. 有关肝纤维化的研究是目前肝病研究的热点. 抗肝纤维化治疗包括两个方面<sup>[5-6]</sup>: 一是针对原发病的病因治疗; 二是针对肝纤维化本身的治疗, 如抑制肝星状细胞(HSC)的早期活化、增殖、收缩和胶原增生, 促进HSC凋亡及促进胶原降解等. 在目前情况下, 某些病因无法根本去除(如慢性肝炎病毒感染), 则抗肝纤维化治疗成为治疗慢性肝病、防止终末期肝病形成的重要途径. 深入了解肝纤维化的形成机制, 开发研制有效的抗肝纤维化药物是现代肝病研究者肩上的重任.

面对各种病因引起的慢性肝损伤及肝纤维化, 去除病因是根本性手段, 但是就目前医学发展水平而言, 许多病因无法彻底去除, 如乙型肝炎病毒、丙肝病毒等全世界面临的医学难题, 因此抗肝纤维化治疗的重要性日益突显. 著名肝脏病学家Hans Popper说过: “谁能阻止或减缓肝纤维化的发生, 谁就将会治愈大多数慢性肝病”<sup>[7]</sup>. 随着细胞和分子生物学技术的进步, 对肝纤维化发生、发展的分子和细胞机制有了较深入了解. 研究的进展使肝纤维化的有效防治成为可能, 目前认为防治肝纤维化策略主要包括<sup>[8-9]</sup>: (1)去除病因; (2)保护肝细胞; (3)抑制炎症

## ■背景资料

抗肝纤维化治疗是目前治疗慢性肝病、防止终末期肝病形成的重要途径. 深入了解肝纤维化的形成机制, 开发研制有效的抗肝纤维化药物是肝病研究的热点之一.

## ■研发前沿

许多细胞因子或其抗体正成为治疗疾病的新药。细胞因子在肝纤维化的发生、发展过程中具有重要作用, IL-10正是其中之一, 现有越来越多的研究在探讨IL-10在肝纤维化治疗方面的应用。

反应; (4)拮抗促纤维化细胞因子的作用; (5)抑制肝星状细胞活化, 促进其凋亡; (6)抑制细胞外基质的合成, 促进其降解。

## 1 IL-10的细胞保护与抗纤维化作用

越来越多的证据表明, 肝纤维化是细胞因子网络作用的结果<sup>[10]</sup>。因此利用细胞因子及其抗体的治疗逐渐成为临床抗肝纤维化的热点。目前研究较多并得到承认的有:  $\gamma$ -干扰素( $\gamma$ -IFN), 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)抗体, 转化生长因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ 抗体), IL-10等, 有些已用于临床, 但效果还有待提升, 因为细胞因子是一个网络, 要期望有较好的逆转肝纤维化的疗效, 不能忽视细胞因子网络的作用。

IL-10是由Th2细胞产生的一种细胞因子合成抑制因子, 对Th1细胞具有抑制作用<sup>[11]</sup>。机体内多种细胞可合成IL-10, 包括T细胞群(Th2, Tc2, Tr1等)、单核细胞、巨噬细胞等, 机体的许多其他器官也产生IL-10, 如肝脏<sup>[12-13]</sup>。已发现在肝内肝细胞、窦内皮细胞、Kupffer细胞、肝星状细胞(HSC)和肝相关淋巴细胞均可产生IL-10<sup>[14]</sup>。这些细胞在各种外源性或内源性因素的刺激下(如应激、内毒素等), 通过cAMP/蛋白激酶A/CREB-1/ATF-1/SP1等信号途径大量合成IL-10。在近年的肝纤维化研究中, IL-10作为一个多效性细胞因子, 正不断受到研究者的关注<sup>[15]</sup>。IL-10主要通过具有高度亲和力的IL-10受体发挥作用, 其生物学作用广泛<sup>[16-17]</sup>, 主要作用为抑制炎症反应和抑制多种基因转录。基因敲除技术使IL-10的特性被更深入的理解。在病毒性肝炎、自身免疫性肝炎、酒精性肝病和动物实验中发现IL-10在细胞保护、抗纤维化等方面有重要作用<sup>[18]</sup>。IL-10基因敲除小鼠在感染了毒性胞质刚地型虫后即死于严重肝坏死有关的致死性免疫反应, 显示内源性IL-10对肝细胞具有保护作用。在D-半乳糖胺/内毒素诱导的大鼠肝细胞损伤动物模型上给予外源性IL-10, 显示了明显的抗肝细胞损伤作用<sup>[19]</sup>。目前认为, IL-10的肝细胞保护作用主要与以下因素有关<sup>[20-21]</sup>: (1)抑制前炎性细胞因子的分泌是其主要作用; (2)抑制中性粒细胞的激活与其黏附分子的表达, 进而抑制其黏附; (3)抑制组织因子的表达, 从而抑制淋巴窦内播散性血管内凝血的发生; (4)抑制肝损伤时的急性期增殖反应, 并进一步抑制肝纤维化的发生。用电穿孔法将人IL-10基因导入肝纤维化小鼠<sup>[22-23]</sup>, 结果表明, IL-10基因治疗可以逆转小

鼠已经形成的肝纤维化, 以及抑制肝硬化引起的细胞凋亡。IL-10基因治疗可以降低肝纤维化小鼠TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ 和组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的表达, 也显著抑制 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和环氧合酶2(COX-2)的活化。HSC是肝纤维化形成的关键, 体外研究表明HSC表达IL-10受体并产生IL-10<sup>[24-25]</sup>。分离纯化的HSC培养120 d后能检测到IL-10 mRNA, 对于未激活的HSC进行长期培养, 用免疫印迹法和ELISA可以检测到有IL-10表达。对于才培养3 d的HSC则用免疫化学方法无法检测到IL-10表达, 培养7 d后IL-10阳性细胞增加到45%, 培养14 d后阳性率增加到100%并持续到120 d。这表明IL-10在肝纤维化过程中具有重要作用。在四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的大鼠肝纤维化过程中, 有关IL-10与肝星状细胞的作用系列研究发现<sup>[26-27]</sup>, 肝脏星形细胞表达IL-10水平下降, 可能是肝纤维化形成的主要原因。同时, IL-10可通过抑制HSC的功能及促进HSC发生凋亡而发挥抗纤维化作用<sup>[28-29]</sup>。IL-10可直接减少胶原形成及增加胶原酶<sup>[30-31]</sup>, 在肝ECM重建中发挥重要作用, 另外, IL-10通过减少TGF- $\beta$ 1分泌而间接限制纤维化形成。在基因调控方面的研究证实, IL-10可下调胶原基因启动子的活性, 从而抑制肝纤维化的形成。

## 2 IL-10的实验研究与现状的差距

上述实验室的研究结果表明, IL-10在抗肝纤维化的治疗上具有良好的应用前景。在临床方面, 重组人IL-10已在健康志愿者、Crohn'S病、类风湿性关节炎、银屑病、慢性丙肝病毒感染和HIV感染等患者身上试用<sup>[32-35]</sup>。在对健康志愿者的I期临床试验中已经获得了IL-10安全性、耐受性和药代动力学等方面的参数<sup>[36]</sup>, 以及静脉和皮下单剂量和多次给药时IL-10的免疫学和血液学效应。IL-10在25  $\mu\text{g/kg}$ 的剂量以内耐受性好, 没有严重的副作用, 分次给药总剂量在100  $\mu\text{g/kg}$ 时可有轻-中度流感样症状。iv IL-10半衰期约2-3 h。IL-10主要通过肾脏清除, 在中-重度肾功能不全者其T<sub>1/2</sub>和AUC会增加。但总体而言, 给予IL-10后引起的一系列免疫学变化均是机体可以耐受的。国外已有报道IL-10用于临床治疗慢性丙型肝炎患者的研究<sup>[37-38]</sup>, 并取得了令人鼓舞的成效, 但就我国现状而言, 乙肝病毒感染是最大的病因, IL-10对慢性乙肝病毒感染是否同样有着令人惊奇的疗效还不得而知, IL-10在我国用于临床治疗慢性乙肝患者还有一段不小

的距离。目前的模型制作和研究仅限于部分类型的肝纤维化, 大部分的研究也仅对肝纤维化已较明显形成后进行干预, 而在临床上需要的是如何抗肝纤维化的形成、抗肝纤维化的起始时间、需要的治疗疗程等。在实验动物模型中, CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型应用最广, CCl<sub>4</sub>这种模型的最大缺点, 是发病机制和人类病毒性肝炎相差太大, 他是化学毒物引起的肝纤维化或肝硬化, 在停止给药后模型有一定的自愈倾向, 而肝炎病毒引起的慢性肝损伤则是病因的作用持续存在, 用这种模型来评价人类常见的病毒性肝纤维化的发病机制并不适合。为使抗肝纤维化的模型研究更接近人类疾病的特征, 须建立一个能反映人肝纤维化的动物模型, 应考虑以下几个方面: (1)人和动物种属差别; (2)肝纤维化形成过程中的病因和形成机制; (3)自然恢复能力。

### 3 展望

理想的肝纤维化治疗要有肝脏专一性, 长期给药要有相当好的耐受性, 有效减少肝纤维组织堆积而不干扰正常细胞外基质(ECM)的生成。IL-10在临床上的某些应用表明他具有较好的耐受性, 但他是一个多功能的细胞因子, 全身给药很难保证其肝脏作用的专一性, 如何避免其对正常ECM的干扰也将是IL-10用于临床治疗肝纤维化的一大障碍。有必要寻找合适的IL-10剂型及给药途径, 以最大程度发挥其抗纤维化作用, 同时减少其不良反应。将IL-10导入特定的组织以避免全身副作用, 如利用腺病毒载体将IL-10直接导入肝脏以治疗肝纤维化<sup>[39]</sup>, 通过这种更精确的方式, IL-10在治疗肝损伤和预防肝纤维化方面才会有更好的未来。

### 4 参考文献

- 1 Kumar M, Sarin SK. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J Pediatr* 2007; 74: 393-399
- 2 Andrade ZA. Regression of hepatic fibrosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 514-520
- 3 Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007; 6: 7
- 4 Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117: 539-548
- 5 Zhang L, Wang X, Zheng W, Shi M. The effects of interleukin-10 on the expression of Fas and FasL in rat hepatic stellate cells. *Med Chem* 2006; 2: 611-616
- 6 Hoteit MA, Anania FA. Treatment of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol*

- 7 Popper H, Kent G. Fibrosis in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol* 1975; 4: 315-332
- 8 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 9 Huang YH, Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1386-1391
- 10 Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006; 26: 1029-1039
- 11 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095
- 12 Platzer C, Docke W, Volk H, Prosch S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol* 2000; 105: 31-38
- 13 Riese U, Brenner S, Docke WD, Prosch S, Reinke P, Oppert M, Volk HD, Platzer C. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem* 2000; 212: 45-50
- 14 Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, Vincent JL. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J* 1997; 133: 335-339
- 15 Dumoutier L, Renauld JC. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 5-15
- 16 Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caligiuri MA. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 1995; 85: 3577-3585
- 17 Jurlander J, Lai CF, Tan J, Chou CC, Geisler CH, Schriber J, Blumenson LE, Narula SK, Baumann H, Caligiuri MA. Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1997; 89: 4146-4152
- 18 Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1681-1685
- 19 Quattrocchi E, Dallman MJ, Dhillon AP, Quaglia A, Bagnato G, Feldmann M. Murine IL-10 gene transfer inhibits established collagen-induced arthritis and reduces adenovirus-mediated inflammatory responses in mouse liver. *J Immunol* 2001; 166: 5970-5978
- 20 Boniface K, Lecron JC, Bernard FX, Dagregorio G, Guillet G, Nau F, Morel F. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 309-319
- 21 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 77-81
- 22 Chou WY, Lu CN, Lee TH, Wu CL, Hung KS, Concejero AM, Jawan B, Wang CH. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP

### ■应用要点

对IL-10在实验性肝纤维化方面的研究及临床应用情况进行较系统阐述, 分析IL-10用于治疗肝纤维化的可行性及存在的问题, 指出将来的可能研究方向。

## ■同行评价

本文将近几年的IL-10抗肝纤维化的实验研究及临床现状进行了综述,描述逻辑性较强,科学性较好,具有一定的理论和学术价值。

- and TIMP modulation. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 469-476
- 23 Hung KS, Lee TH, Chou WY, Wu CL, Cho CL, Lu CN, Jawan B, Wang CH. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 324-331
- 24 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308
- 25 Popper H. General pathology of the liver: light microscopic aspects serving diagnosis and interpretation. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 175-184
- 26 Mathurin P, Xiong S, Kharbanda KK, Veal N, Miyahara T, Motomura K, Rippe RA, Bachem MG, Tsukamoto H. IL-10 receptor and coreceptor expression in quiescent and activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G981-990
- 27 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 28 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28: 1597-1606
- 29 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1518-1524
- 30 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2706-2710
- 31 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94: 2489-2492
- 32 Louis H, Le Moine O, Goldman M, Deviere J. Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg* 2003; 66: 7-14
- 33 Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 1999; 1: 3-19
- 34 Kingo K, Koks S, Silm H, Vasar E. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun* 2003; 4: 455-457
- 35 Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1999; 1: 151-155
- 36 Huhn RD, Radwanski E, Gallo J, Affrime MB, Sabo R, Gonyo G, Monge A, Cutler DL. Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 171-180
- 37 Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660
- 38 Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32: 98-112
- 39 Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002; 36: 271-277

编辑 何燕 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)

# 肝内肌成纤维细胞和星状细胞在肝纤维化中的作用

李定国, 汪保灿

李定国, 汪保灿, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092

李定国, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肝纤维化的防治研究。

通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科. dingguo\_li@263.net

电话: 021-65790000-3361 传真: 021-55571294

收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-08-13

## Functions of myofibroblasts and hepatic satellite cells in liver fibrosis

Ding-Guo Li, Bao-Can Wang

Ding-Guo Li, Bao-Can Wang, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China. dingguo\_li@263.net

Received: 2007-06-11 Revised: 2007-08-13

### Abstract

Liver fibrosis represents wound-healing responses from liver tissue injury. Multiple mechanisms underlying liver fibrogenesis have been explored. Inflammatory cytokines stimulate fibrogenetic cell proliferation and activation, the production of extracellular matrix (ECM), and the secretion of various cytokines and enzymes. All such alterations lead to a relative increase in the deposition of ECM components. Decreased degradation occurs with resulting excessive ECM accumulation in the liver. It has recently been suggested that, besides hepatic stellate cells, myofibroblasts may also constitute an important population of matrix-producing cells in liver fibrosis, and especially in cholestatic fibrosis. Confirmation of such observations will be required for the development of antifibrotic strategies that specifically and efficiently target cells responsible for the different types of liver fibrosis.

**Key Words:** Myofibroblast; Hepatic satellite cell; Liver fibrosis

Li DG, Wang BC. Functions of myofibroblasts and hepatic

satellite cells in liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(23): 2473-2476

### 摘要

肝纤维化是不同病因长期作用于肝脏所致损伤后修复反应, 发病机制主要是肝内纤维生成, 细胞活化、增殖, 合成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 并伴有ECM降解不足, 最终导致其在肝内大量积聚. 近来有研究提示除肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)外, 肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)可能是另一类参与肝纤维化进程并发挥重要作用的细胞, 进一步确证上述研究结果将有助于针对不同类型肝纤维化寻找和采取不同的干预方法, 以更有效地阻断肝纤维化的进展.

**关键词:** 肌成纤维细胞; 肝星状细胞; 肝纤维化

李定国, 汪保灿. 肝内肌成纤维细胞和星状细胞在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2473-2476

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2473.asp>

### 0 引言

肝纤维化是不同病因长期作用于肝脏所致损伤后修复反应, 发病机制主要是肝内纤维生成细胞活化、增殖, 合成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 并伴有ECM降解不足, 最终导致其在肝内大量积聚. 虽然曾有学者提出具有ECM合成作用的间质细胞(mesenchymal cells)包括肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)、肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)、纤维母细胞(fibroblast)和平滑肌细胞. 但目前研究主要集中在HSC, 认为HSC是肝纤维化时ECM合成的唯一细胞来源, 同时当前研究中存在一些值得思考的现象. 例如: 肝纤维化组织不同区域的纤维生成细胞的表面标记不同; 许多干预因素在体外试验中抑制HSC活化、增殖和分泌作用显著, 而在体内试验中对肝纤维化的防治效果却不尽人意. 因此, 人们设想: 除了HSC外是否还有其他纤维生成细胞在肝纤维化发生发展过程中发挥重要作用?

### ■背景资料

近来有研究提示汇管区肌成纤维细胞可能是另一类参与肝纤维化进程的重要细胞.

## ■应用要点

本文总结了肝内MF和HSC的异同,有助于全面了解不同类型肝纤维化发生的细胞机制,进而为不同类型肝纤维化的特异性干预提供方向。

其生物学特性是否与HSC相似?目前一些研究已经提示MF可能是另一类参与肝纤维化进程并发挥重要作用的细胞,其作用已得到一些学者的认同<sup>[1-2]</sup>。

## 1 MF与HSC的形态结构、肝内分布、特征标志和胚胎起源

MF呈梭形,与纤维母细胞形状类似,但胞质内有大量平行排列的肌丝而具有收缩功能;HSC有多个突起,形态如星状,胞质内含有大量脂滴。另外二者的超微结构也不尽相同, Seifert *et al*<sup>[3]</sup>报道电镜下MF胞质内肌丝间有“高密度颗粒”,而HSC则无。MF和HSC都存在于正常肝组织,前者位于汇管区、中央静脉和胆管周围,后者位于肝窦周围间隙中。

HSC和MF除了一些共同的表达标志外,又分别存在各自的特征性标志。如二者都可以表达:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、结蛋白(desmin)、波形蛋白(vimentin)、血管-细胞黏附分子(vessel-cell adhesion molecule, VCAM)。然而, Fibulin-2、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)只在MF表达,而HSC特异表达神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 突触素(synaptophysin, SYN), Nestin, 神经生长因子(nerve growth factors, NGF), 神经生长因子受体(nerve growth factor receptors, p75)和神经营养因子(neurotrophin)等<sup>[4-7]</sup>。

在胚胎发育阶段, MF由内胚层细胞发育来,但对HSC的胚胎起源,目前还存在争议。早期研究认为HSC也来源于内胚层细胞<sup>[8]</sup>,但近来越来越多的证据提示HSC可能来源于神经外胚层: (1)HSC表达上述神经系统特异性标志。(2)HSC的多突起形状和星形胶质细胞相似,与梭形的纤维细胞形状不同。(3)正常肝组织中许多HSC和神经末梢密切接触<sup>[9-10]</sup>。(4)HSC表达多种类型的肾上腺素受体和儿茶酚胺合成酶(合成肾上腺素的关键酶),并释放肾上腺素<sup>[11]</sup>。(5)肾上腺素和乙酰胆碱可直接促进HSC增殖,合成胶原成分,加入相应受体拮抗剂均明显抑制HSC增殖和分泌<sup>[12-13]</sup>。(6)肾上腺素基因缺失的小鼠HSC在体外培养时生长缓慢,加入肾上腺素后HSC生长活性恢复正常<sup>[11]</sup>。这些研究结果说明HSC不但接受神经递质的调节,还可自分泌神经递质促进自身活化。因此, Roskams *et al*<sup>[14]</sup>认为HSC是外周神经细胞或神经内分泌细胞,但尚待进一步研究以实证HSC的来源。

尽管存在上述争议,且无充分证据说明HSC能够转化为MF,但因活化的HSC形态和MF相似,故有些学者将活化的HSC称为肌成纤维细胞,而不是肌成纤维样细胞,其结果是两种细胞的名称相混淆。另外,目前多数体内外研究通常用desmin<sup>+</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>-</sup>和desmin<sup>+</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>作为静止和活化的HSC的鉴定标记,但已证实MF也能表达desmin和 $\alpha$ -SMA,因而体外或体内研究所谓的HSC并不能排除有MF存在,这就很难区分这些研究结论是HSC抑或二者共同作用的结果。

## 2 MF和HSC生长特性

Dudas *et al*<sup>[15]</sup>将大鼠HSC进行体外培养,原代培养至7 d左右传代,第2代培养时细胞体积变大、分裂比例减少、生长变慢,培养几周后仍不能长至融合状态,并有大量细胞死亡。另外,还发现原代培养7 d时约18%细胞发生凋亡,第2代培养时,约80%HSC发生凋亡。然而,从肝脏分离的MF则不同,他有较强的分裂增殖能力,在体外可以连续传代。由于体外培养时大量HSC自发凋亡,并且原代培养的HSC多混杂有MF,故该学者怀疑长期传代培养的HSC是优势生长的MF。进一步研究发现, HSC在活化过程中同时表达CD95(Fas)和CD95L(Fas配体),因而可通过CD95L-CD95通路自发凋亡。体外培养的MF只表达CD95,不表达CD95L,因而无自发凋亡,给予CD95激活性抗体或肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )可迅速诱导大量MF凋亡<sup>[16]</sup>。然而,也有学者对这项研究结果提出了质疑,关于MF和HSC生长特性尚需进一步研究证实。

## 3 MF和HSC在不同类型肝纤维化中的作用

肝纤维化可由不同的病因引起,且不同病因所致的病变及其机制也有差异。酒精和四氯化碳诱发肝纤维化模型的机制是首先引起肝细胞坏死和实质炎症,并产生大量细胞因子,促进HSC活化增殖和分泌ECM,肝炎病毒诱发肝纤维化的机制与此类似。异种血清和胆总管结扎诱发肝纤维化模型的机制是汇管区水肿和纤维组织增生,而肝实质炎症不如前者明显,胆道病变和血吸虫病等诱发肝纤维化的机制与此类似。简言之,酒精、四氯化碳和肝炎病毒导致的肝纤维化早期是以肝实质病变为主,随后出现纤维组织增生;而异种血清、胆总管结扎、胆道病变和血吸虫病诱发的肝纤维化一开始就以间质纤维组织增生为主。



Cassiman *et al*<sup>[17]</sup>用免疫组化技术检测了人和大鼠不同病因导致的肝纤维化组织中多种细胞标志的表达, 根据表达的标志不同将肝内纤维生成细胞分为3类: (1)实质内窦周纤维生成细胞; (2)汇管区和纤维间隔内纤维生成细胞; (3)纤维间隔/实质交界线的纤维生成细胞, 第3类细胞的标志介于前两类细胞之间. Knittel *et al*<sup>[18]</sup>发现, 正常大鼠肝组织中, HSC(以desmin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>为标记)位于肝血窦周围, MF(以desmin<sup>+</sup>/α-SMA<sup>+</sup>/fibulin-2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>为标记)位于汇管区, 中央静脉周围. 在四氯化碳诱导急性肝损伤时, HSC数量明显增加, 而MF数量基本不变. 然而, 在四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化早期, 纤维间隔中有HSC和MF, 在肝纤维化晚期, MF是纤维间隔中的主要细胞. Beaussier *et al*<sup>[19]</sup>的研究结果也证实, 在胆总管结扎诱发的肝纤维化中, 汇管区间质细胞发挥更重要的作用. 这些研究结果提示: 实质内纤维生成细胞与纤维间隔、汇管区内纤维生成细胞不是同一类, 实质内纤维生成细胞可能是由HSC活化增殖而来, 但纤维间隔内的纤维生成细胞可能是由汇管区MF分裂、增殖而来. 也就是说, 实质内的ECM成分可能是由活化的HSC所分泌, 纤维间隔和汇管区的ECM成分可能是由MF所分泌, 而不是由从实质内迁移来的HSC分泌<sup>[20]</sup>.

总之, HSC和MF是两类表面标志、超微结构、生物学特性、肝内分布位置和作用存在极大差异的细胞群, HSC可能是四氯化碳诱导急性肝损伤的主要参与细胞, MF和HSC共同参与四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化发生发展. 然而, MF在胆汁淤积诱发的肝纤维化发生发展过程中可能具有更重要的作用.

#### 4 展望

目前MF在皮肤创伤后修复中的作用较为肯定, 正常皮肤中无MF, 组织损伤后, 皮肤中纤维母细胞转变为MF形成肉芽组织, 参与损伤修复<sup>[21]</sup>. 肝纤维化也是组织损伤后修复过程, 与机体其他组织修复有共同之处, 另外有证据表明肝内汇管区的纤维母细胞也活化为MF<sup>[22-23]</sup>. 所以Guyot *et al*认为<sup>[24]</sup>正常肝组织并无MF存在, HSC和纤维母细胞均是MF的前体细胞, 在肝损伤时HSC和(或)纤维母细胞活化转变为MF, 分泌ECM、细胞因子和蛋白酶抑制剂等成分参与肝纤维化进程.

尽管上述的研究结果提示除了HSC外, 还存在MF等其他类型的ECM生成细胞, 但是自1999

年Knittel首次报道MF的研究至今已8 a之久, 而针对MF的研究仍然很少, 多数学者对MF在肝内是否存在及其对肝纤维化的作用持怀疑或否定态度, 这些都是因为目前尚没有一种公认的MF分离和培养方法, 因而对其特性及功能的研究也显得模糊, 缺少说服力. 所以, 当务之急是建立一种公认的MF分离和培养方法, 之后才可以解决目前存在的诸多疑问. 如HSC来源的肌成纤维样细胞、纤维母细胞来源的MF和肝内固有的MF是否是同一种细胞? HSC与MF是同一类细胞的不同发育阶段还是不同的两种细胞? 对这些问题的探讨将有助于对肝纤维化发病机制的进一步明确, 也助于针对不同类型肝纤维化寻找和采取不同的干预方法以更有效地阻断肝纤维化的进展.

总之, 目前的研究已提示除HSC外, 还有其他类型的纤维生成细胞参与肝纤维化发生、发展, 并且对不同病因诱导的肝纤维化作用也不相同. 但是由于没有公认的MF分离和培养方法, 目前还有许多问题无法解决, 需今后的进一步深入研究.

#### 5 参考文献

- 1 Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005; 166: 1017-1028
- 2 Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 605-628
- 3 Seifert WF, Roholl PJ, Blauw B, van der Ham F, van Thiel-De Ruiter CF, Seifert-Bock I, Bosma A, Knook DL, Brouwer A. Fat-storing cells and myofibroblasts are involved in the initial phase of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in BN/BiRij rats. *Int J Exp Pathol* 1994; 75: 131-146
- 4 Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158
- 5 Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117: 1205-1221
- 6 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1235-1243
- 7 Cassiman D, van Pelt J, De Vos R, Van Lommel F, Desmet V, Yap SH, Roskams T. Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 1831-1839
- 8 Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara

#### ■同行评价

本文较详细综述了肝内肌成纤维细胞和星状细胞在肝纤维化中的作用, 文章层次清楚, 内容全面新颖, 有较强的可读性和参考性.

- T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc Res Tech* 1997; 39: 336-349
- 9 Akiyoshi H, Gonda T, Terada T. A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver* 1998; 18: 352-359
- 10 Ueno T, Sata M, Sakata R, Torimura T, Sakamoto M, Sugawara H, Tanikawa K. Hepatic stellate cells and intralobular innervation in human liver cirrhosis. *Hum Pathol* 1997; 28: 953-959
- 11 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438-445
- 12 Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 172-177
- 13 Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 685-690
- 14 Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 280: 910-923
- 15 Dudas J, Saile B, El-Armouche H, Aprigliano I, Ramadori G. Endoreplication and polyploidy in primary culture of rat hepatic stellate cells. *Cell Tissue Res* 2003; 313: 301-311
- 16 Saile B, Matthes N, Neubauer K, Eisenbach C, El-Armouche H, Dudas J, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells differ in CD95-mediated apoptosis and response to TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G435-444
- 17 Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002; 36: 200-209
- 18 Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 387-401
- 19 Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 2007; 87: 292-303
- 20 Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004; 84: 153-159
- 21 Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 7-12
- 22 Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 163-173
- 23 Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett* 2004; 559: 107-110
- 24 Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 135-151

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。



# 胰岛素样生长因子 II 与胃癌细胞SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系

高欣, 邓长生

高欣, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

高欣, 2007届武汉大学中南医院硕士研究生, 主要从事胃癌基础与临床研究。

通讯作者: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. kate112@163.com

收稿日期: 2007-06-09 修回日期: 2007-08-09

## *In vitro* relationship of c-fos and c-jun expression with insulin-like growth factor- II in SGC7901 gastric cells

Xin Gao, Chang-Sheng Deng

Xin Gao, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuchang District, Wuhan 430071, Hubei Province, China. kate112@163.com

Received: 2007-06-09 Revised: 2007-08-09

## Abstract

**AIM:** To study the effects of c-fos and c-jun expression in the SGC7901 gastric cancer cell line with insulin-like growth factor (IGF)- II .

**METHODS:** Proliferative activity was determined by the MTT assay. c-fos and c-jun expression was detected by immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

**RESULTS:** IGF- II promoted the proliferation of SGC7901 human gastric cancer cells. The rate of proliferation was time and dosage dependent. Increasing concentrations of IGF- II increased c-fos and c-jun expression at the protein and mRNA level. IGF- II at 10, 50 or 100 mg/L resulted in c-fos and c-jun protein expression of  $41.32 \pm 1.28$ ,  $50.43 \pm 0.57$  and  $64.22 \pm 1.76$  mg/L; and  $52.00 \pm 0.67$ ,  $63.20 \pm 0.95$  and  $76.31 \pm 1.16$  mg/L, respectively. The ratios of c-fos and c-jun expression in mRNA level with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA were  $0.316 \pm 0.021$ ,  $0.392 \pm 0.0357$  and  $0.478 \pm 0.028$ ; and  $0.379$

$\pm 0.006$ ,  $0.412 \pm 0.022$ , and  $0.494 \pm 0.048$ , respectively. The ratios of the experimental group were significantly different from those of the control group ( $30.00 \pm 1.01$  mg/L,  $41.14 \pm 2.02$  mg/L,  $0.220 \pm 0.037$ ,  $0.290 \pm 0.064$ , respectively).

**CONCLUSION:** IGF- II enhances the proliferation of SGC7901 cells. The possible mechanism is that IGF- II induces gastric carcinoma cells to proliferate by increasing c-fos and c-jun expression in a paracrine manner.

**Key Words:** SGC7901; Insulin-like growth factor II; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Gao X, Deng CS. *In vitro* relationship of c-fos and c-jun expression with insulin-like growth factor- II in SGC7901 gastric cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2477-2481

## 摘要

**目的:** 探讨胰岛素样生长因子 II (insulin-like growth factor- II, IGF- II) 与胃癌细胞SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系。

**方法:** 体外细胞培养, 分别用MTT法和免疫组织化学以及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测不同浓度IGF- II (0, 10, 50, 100 mg/L) 作用胃癌细胞后细胞的增殖率和c-fos和c-jun蛋白及mRNA的表达情况。

**结果:** IGF- II 作用于细胞SGC7901的增殖效应呈浓度和时间依赖性; 随着药物浓度的升高, c-fos和c-jun蛋白, mRNA表达均增加。在IGF- II 10, 50, 100 mg/L时, c-fos和c-jun蛋白分别为  $41.32 \pm 1.28$  mg/L,  $50.43 \pm 0.57$  mg/L,  $64.22 \pm 1.76$  mg/L;  $52.00 \pm 0.67$  mg/L,  $63.20 \pm 0.95$  mg/L,  $76.31 \pm 1.16$  mg/L; c-fos, c-jun mRNA与GAPDH mRNA比值分别为  $0.316 \pm 0.021$ ,  $0.392 \pm 0.0357$ ,  $0.478 \pm 0.028$ ;  $0.379 \pm 0.006$ ,  $0.412 \pm 0.022$ ,  $0.494 \pm 0.048$ , 均与相应对照组 ( $30.00 \pm 1.01$  mg/L,  $41.14 \pm 2.02$  mg/L,  $0.220 \pm 0.037$ ,  $0.290 \pm 0.064$ ) 相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## ■背景资料

胃癌是一种发病率很高的恶性肿瘤, 其发病机制目前尚未明确, 近年来随着分子生物学理论和技术的发展, 胃癌基础研究的深入, 人们对胃癌发病分子机制的认识不断更新。研究表明, IGF- II 与肿瘤关系密切, 多种肿瘤均发现有IGF- II 的异常激活和表达, 已经成为研究的热点, 本文通过检测胰岛素样生长因子 II 与胃癌细胞SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系来探讨其可能机制。

## ■ 研发前沿

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,是多因素共同作用的结果。胰岛素样生长因子II与胃癌的关系是目前研究的热点之一。

**结论:**胰岛素样生长因子II可能通过旁分泌上调c-fos和c-jun的表达而诱导胃癌细胞增殖。

**关键词:**胃癌细胞SGC7901;胰岛素样生长因子II;逆转录聚合酶链反应

高欣, 邓长生. 胰岛素样生长因子II与胃癌细胞SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2477-2481

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2477.asp>

## 0 引言

胃癌是一种发病率很高的恶性肿瘤,尤其是在亚洲国家,手术切除仍是目前胃癌治疗的首选方法,其发病机制目前仍尚未明确,近年来随着分子生物学理论和技术的发展,胃癌基础研究的深入,人们对胃癌发病分子机制的认识不断更新。胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)最初由Rinderkench于1976年从人的血清Cohn组中分离得到,目前发现胰岛素样生长因子有2种,分别为IGF-I和IGF-II<sup>[1]</sup>。IGF-II是由67个氨基酸组成的单链多肽,结构与IGF-I,胰岛素原相似,能促进脂肪和糖代谢,尤其对机体的生长发育有着重要的调节作用,但其确切的生理机制尚不清楚。多种肿瘤均发现有IGF-II的异常激活和表达,IGF-II的生物学作用主要是由IGF-I R介导的,可启动PI3K/Akt, Ras/MAPK 2条信号通路,他们在细胞增殖、分化、凋亡中均起重要作用。c-fos和c-jun作为核内转录因子,他们是活化MAPK作用的下游分子,活化的MAPK转导入细胞核并激活c-fos和c-jun基因,表达的c-fos和c-jun蛋白以异二聚体或c-jun同二聚体形式结合到AP-1启动子结合位点,诱导cyclinD1和c-myc等癌基因表达。本实验探讨IGF-II与胃癌细胞SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系,对胃癌的发病机制、诊断及治疗都将有重要的指导意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌细胞SGC7901(武汉大学实验室提供), IGF-II(英国Peprotech公司), c-fos, c-jun抗体(武汉博士德公司), TRIzol试剂(上海华舜生物工程有限公司产品), M-MLV逆转录酶(Promega公司产品), RPMI1640培养基(Sigma公司产品), 胰蛋白酶(Amresco产品), DNA酶(上海丽珠东风制备厂), 人c-fos, c-jun及GAPDH引物(Primer 5.0设计, 由北京奥科生物科技公司合成, 表1)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人胃癌细胞SGC7901复苏后于含100 g/L小牛血清、100 kU/L青霉素及100 kU/L链霉素的RPMI1640的培养液中, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养。

**1.2.2 四唑盐比色法(MTT法)** 取对数生长期细胞, 以10<sup>7</sup>/L的浓度接种于96孔板, 每孔200 μL培养24 h后更换不含血清的培养液, 同时设3个实验组(在不含培养液中分别加入终浓度为10, 50, 100 μg/L的IGF-II)和对照组(无IGF-II), 每组接种3孔, 在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下, 分别培养24, 48, 72 h, 加入5 g/L MTT 20 μL继续培养4 h, 离心吸尽上清液, 加入150 μL二甲基亚砷(DMSO)于摇床上震荡10 min, 于自动酶标仪测570 nm各孔吸光度值。计算细胞增殖率: 增殖率% = (B-A)/A × 100(A: 对照组, B: 实验组)。

**1.2.3 免疫组化染色** 取对数生长期细胞, 消化离心后, 将细胞悬液以2 × 10<sup>8</sup>/L浓度接种到已预置无菌小玻片的24孔板中, 每孔加入1 mL培养基, 培养24 h后去掉上清, 用不含血清的培养液洗2次, 加入含不同浓度的IGF-II(0, 10, 50, 100 μg/L)无血清培养基500 μL, 一共4个组, 每组设3孔, 继续培养48 h, 取出盖玻片, PBS洗3次, 4℃无水乙醇固定15 min。免疫组化方法参照试剂说明书进行, 用计算机图像分析软件计算积分光密度值(IOD), 每组各取片2张, 每张随机观察5个视野, 放大倍数均为200。

**1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法** 取对数生长期细胞, 消化离心后, 将细胞悬液以2 × 10<sup>8</sup>/L浓度接种到24孔板中, 每孔加入1 mL培养基, 培养24 h后去掉上清, 用不含血清的培养液洗2次, 加入含不同浓度的IGF-II(0, 10, 50, 100 μg/L)无血清培养基500 μL, 共4组(A, B, C, D), 每组3个复孔, 继续培育24 h, 分别收集4组细胞, 提取细胞总RNA, RT-PCR法检测c-fos和c-jun的表达。按TRIzol试剂一步法提取胃癌细胞总RNA。经紫外分光光度法定量后, 取2 μg RNA用M-MLV逆转录酶进行逆转录反应合成cDNA。以GADPH为内参照, 分别取1 μL模板进行PCR反应。c-fos和c-jun的反应条件均为预变性95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 28个循环后72℃延伸5 min。结果检测: 20 g/L琼脂糖检测, 100 V电压, EB染色。结果分析: 利用SynGene公司开发的随凝胶成像系统的GeneTools图像软件进行半定量分析, 比较目标基因与内参基因的相对表达量变化, 并将数据转换到Excel表格中, 利用Excel

表 1 各引物的碱基序列

Gene	Oligo	Sequence	Product size (bp)
c-jun	Forward primer	5'GCAGGAGGGAGGTTTGTGA3'	500
	Rerverse primer	5'GGAGTATAACCTGACCATAGCAT3'	
c-fos	Forward primer	5'GGAGAATCCGAAGGGAAGG3'	367
	Rerverse primer	5'ATGCTGCTGATGCTCTTGACA3'	
GAPDH	Forward primer	5'TGGGTGTGAACCATGAGAAGT3'	434
	Rerverse primer	5'TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC3'	

表 2 不同浓度IGF- II 作用于SGC7901的细胞吸光度值及细胞增殖率(mean ± SD, %)

分组	0 μg/L		10 μg/L		50 μg/L		100 μg/L	
	A值	增殖率	A值	增殖率	A值	增殖率	A值	增殖率
24 h	0.374 ± 0.046	0	0.396 ± 0.046	5.88	0.405 ± 0.022	8.29	0.446 ± 0.030	19.25
48 h	0.418 ± 0.019	0	0.449 ± 0.027	7.42	0.496 ± 0.018	18.66	0.559 ± 0.020	33.73
72 h	0.515 ± 0.020	0	0.601 ± 0.044	16.70	0.651 ± 0.043	26.41	0.703 ± 0.033	36.50

做出相对表达趋势图。

**统计学处理** 数据以mean ± SD表示, 应用SPSS11.5统计软件进行分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 MTT法测细胞增殖率** 利用吸光度值计算实验组及对照组细胞增殖率, 随着IGF- II浓度的增加细胞增殖率逐渐增强, 同样药物浓度的IGF- II作用下, 随着时间的延长细胞增殖率逐渐增强(表2)。

**2.2 IGF- II对胃癌细胞SGC7901中c-fos和c-jun蛋白表达的影响** 免疫细胞化学及图像分析结果显示, c-fos, c-jun阳性颗粒均位于胞核, 胃癌细胞SGC7901经IGF- II作用后c-fos, c-jun蛋白的表达增加, 不同浓度的IGF- II组与对照组相比均有显著性差异( $P < 0.05$ ), 随着IGF- II浓度的升高, c-fos, c-jun蛋白的表达增加更甚, 在IGF- II浓度为100 μg/L时, c-fos, c-jun蛋白的表达最多(表3)。

**2.3 IGF- II对胃癌细胞SGC7901中c-fos mRNA和c-jun mRNA表达的影响** 对电泳结果进行激光密度扫描得到c-fos, c-jun, GAPDH mRNA表达的光密度, 以GAPDH为内参照, 计算出c-fos, c-jun mRNA表达量的相对值。结果显示: 10, 50, 100 μg/L的IGF- II刺激SGC7901后的c-fos mRNA与GAPDH mRNA比值分别为 $0.316 \pm 0.021$ ,  $0.392 \pm 0.0357$ ,  $0.478 \pm 0.028$ 与对照组 $0.220 \pm 0.037$ 相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。c-jun mRNA与GAPDH mRNA比值分别为 $0.379 \pm 0.006$ ,  $0.412$

表 3 不同浓度的IGF- II对c-fos和c-jun蛋白表达IOD值的影响(mean ± SD)

分组	IOD ( $10^{-2}$ )	
	c-fos	c-jun
IGF- II组(μg/L)	10 41.32 ± 1.28 <sup>a</sup>	52.00 ± 0.67 <sup>a</sup>
	50 50.43 ± 0.57 <sup>a</sup>	63.20 ± 0.95 <sup>a</sup>
	100 64.22 ± 1.76 <sup>a</sup>	76.31 ± 1.16 <sup>a</sup>
对照组	30.00 ± 1.01	41.14 ± 2.02

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

$\pm 0.022$ ,  $0.494 \pm 0.048$ 与对照组 $0.290 \pm 0.064$ 相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤, 起源于上皮, 在胃的恶性肿瘤中, 腺癌占95%, 它是一种全球性疾病, 但两性间、不同年龄间、各国家地区间、各种族间、甚至同一地区不同时期的发病率都有较大差异。癌症是多种因素的调控作用, 共同参与发病, 癌基因激活、抑癌基因失活、一些生长因子和受体的调节作用、基因突变和DNA修复系统功能的缺陷等在胃癌发生、发展中起着重要的作用。有研究证明, 一些生长因子的上调能促进胃癌的发展<sup>[2-3]</sup>。

IGF- II是一种非常强的丝裂原, 可促进多种细胞的增殖, 抑制细胞凋亡。人类IGF- II基因位于染色体11p15.5, 内含9个外显子(E1-E9)、4个启动子(P1-P4), 前6个外显子编码5'-UTR, 外显

### ■应用要点

本文是以胃癌细胞为研究对象, 得出IGF- II有着促进胃癌细胞增殖的能力, 对其治疗道路提供了一定的思路。对胃癌患者应用反义RNA靶向治疗或阻断IGF- II转导通路的任一环节都可能具有潜在的应用前景。

## ■名词解释

1 酪氨酸蛋白激酶(PTK): 是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质, 能催化蛋白质的酪氨酸残基发生磷酸化反应, 蛋白质的磷酸化和去磷酸化是细胞信号传递的关键变化, PTK通过激活信号转导系统, 调控基因表达、细胞生长和增殖, 影响细胞功能。

2 放射免疫法: 是利用同位素标记的与未标记的抗原, 同抗体发生竞争性抑制反应的方法, 研究机体对抗原物质反应的发生、发展和转化规律。

子7, 8编码成熟IGF-II肽链和E肽N端, 外显子9编码其余E肽及3'-UTR, 由于IGF-II基因转录受4个启动子调控, 在人生发育及病理生理的不同时期, 启动子的激活各不相同, 产生的mRNA具有多种形式, 一共有5种。在启动子P2, P3, P4作用下形成胚胎型IGF-II mRNA, 这种IGF-II mRNA在出生后消失, 由P1启动子作用取代形成成年型IGF-II mRNA。以上各种IGF-II mRNA虽长短不同, 但差别只在非翻译区外显子E1-E3的有无, 而其编码蛋白质的外显子E1-E4却都相同。所以最终翻译成的蛋白成分也相似<sup>[4]</sup>。IGF-II在血液中不单独存在, 而是与其结合蛋白结合。无论是游离的或是以结合形式存在的IGF-II, 均必须与IGF-I或IGF-II受体结合才能发挥作用。IGF-I R由2个 $\alpha$ 和2个 $\beta$ 亚单位所构成的四聚体来介导细胞内的效应<sup>[5]</sup>。 $\alpha$ 亚单位是完全位于膜外侧的肽链, 含有激素结合位点;  $\beta$ 亚单位跨膜穿行, 通过双硫键与 $\alpha$ 亚单位连结, 其膜内结构域含有酪氨酸蛋白激酶(PTK)的活性<sup>[6]</sup>。多数学者认为, IGF-II的生物学作用主要是由IGF-I R介导的<sup>[7-8]</sup>, 可启动2条信号通路, 1条是受体-磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)-Akt(又叫蛋白激酶B)信号通路; 另1条是受体-Ras-Raf-丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路, 这2条通路在细胞增殖、分化、凋亡中均起重要作用<sup>[9-10]</sup>。IGF-II R为果糖-6-磷酸受体, 只有1条肽链, 也跨膜穿行, 膜外侧肽链较长, 但膜内结构域短且无PTK活性, 可能通过G蛋白在细胞内传递信息, 他通过与IGF-II配体结合、细胞内摄取促使IGF-II配体降解而限制IGF-II介导的生长刺激作用, 因此IGF-II R的存在影响细胞外IGF-II的水平<sup>[11-12]</sup>, IGF-II受体基因缺失会引起血清中IGF-II水平的升高, 过度激活IGF-I受体, 导致胚胎过度生长最终死亡, IGF-II R基因缺失与肿瘤的发生、发展有着重要的关系<sup>[13-15]</sup>。

近年来研究表明, IGF-II与肿瘤关系密切, 多种肿瘤如肝癌、结直肠癌、前列腺癌、脂肪肉瘤、胚源性肿瘤和肺癌等, 均发现有IGF-II的异常激活和表达<sup>[16-21]</sup>, IGF-II能促进肿瘤细胞分裂和分化, 抑制肿瘤细胞的凋亡。他在胃癌的发生和发展中也具有重要的作用。Lee *et al*<sup>[22]</sup>通过放射免疫测定法和免疫印迹法测定胃癌患者手术前后血清中IGF-I, IGF-II, IGFBP3的表达情况发现, 3者在手术后的表达明显降低, 尤其以IGF-II最为显著, 随后国内也有相关报道。Yi

*et al*<sup>[23]</sup>利用RT-PCR、竞争性PCR的方法检测5种不同的胃癌细胞株以及胃癌组织、正常对照组织发现, 均有不同程度的IGF-II mRNA表达, 尤其在胃癌组织中呈过度表达。Pavelic *et al*<sup>[24]</sup>从蛋白和mRNA水平研究肠型和弥散型胃癌中IGF-II及其受体的表达情况, 发现IGF-II蛋白水平的表达在弥散型胃癌组织中明显高于肠型, 而IGF-1R蛋白的表达无差别。Zhao *et al*<sup>[25]</sup>应用原位杂交和免疫组织化学方法检测105例胃癌组织中IGF-II和HGF mRNA及CD34的表达, 结果得出胃癌的侵袭深度、侵犯脉管、淋巴结及远处转移均与IGF-II和HGF mRNA的表达水平均有关( $P<0.05$ )。以上研究表明, 胃癌患者血清及胃癌组织中IGF-II均呈过度表达。本次实验是以胃癌细胞为研究对象, 来探讨IGF-II诱导胃癌细胞发生恶性增殖的可能机制。

在肿瘤发生、发展的基因调控中, 即刻早期应答基因c-fos和c-jun尤为重要。他们在正常细胞中表达量很少, 辐射、高血压和应激反应等均可诱导这些基因的早期过度表达。作为核内转录因子, 他们是活化MAPK(mitogen activated protein kinases)作用的下游分子, 活化的MAPK转入细胞核并激活c-fos和c-jun基因, 表达的c-fos和c-jun蛋白以c-fos/c-jun杂合二聚体或c-jun同二聚体形式构成活化蛋白-1(AP-1), AP-1作为转录因子与特定的DNA序列结合, 在转录水平调控基因的表达, 激活cyclin D1和c-myc等多种致癌基因表达, 在细胞的恶性转化以及肿瘤的形成中起一定的作用<sup>[26-27]</sup>。c-fos和c-jun作为AP-1的重要组成部分, 其表达量及活化直接影响AP-1结合DNA的能力。本研究将IGF-II直接作用于胃癌细胞株SGC7901, 根据文献报道IGF-II的生物学特性, 选择10, 50, 100  $\mu\text{g/L}$ 的IGF-II作为实验组用药浓度, 运用MTT, 免疫组化和半定量PT-PCR的方法观察分析, 结果显示, IGF-II有着促进胃癌细胞增殖的能力, 一定浓度时IGF-II单独作用于SGC7901的增殖效应随时间延长而增强, 一定时间下这种增殖效应随浓度增加而增强。随着药物浓度的升高, c-fos和c-jun蛋白及mRNA表达量增加。其机制系IGF-II可能通过旁分泌上调c-fos和c-jun的表达, 诱导胃癌细胞发生恶性增殖。

目前, 恶性肿瘤的治愈率很低, 很重要的一点是就诊时患者已处于晚期, 肿瘤已经发生了浸润、转移。大量研究发现IGF-II的过表达不仅与胃癌有关, 而且是胃癌发生、发展过程中影

响着其分子生物学行为的重要元素之一, 这为我们在其治疗道路上提供了新的思路. 最近有报道反义基因IGF-II转染胃癌细胞株可抑制细胞的恶性表型, 诱导细胞的凋亡. 那么对胃癌患者应用反义RNA靶向治疗或阻断IGF-II转导通路的任一环节都可能潜在的应用前景, 需要进一步探讨.

#### 4 参考文献

- 1 刘真喜, 傅庭焕, 赵彤. IGF-1与细胞凋亡的研究进展. 医学综述 2001; 7: 579-580
- 2 Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielanski W, Starzynska T, Karczewska E, Marlicz K, Stachura J, Hahn EG. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 989-999
- 3 Han SU, Lee JH, Kim WH, Cho YK, Kim MW. Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma. *World J Surg* 1999; 23: 1176-1180
- 4 Tang SH, Yang DH, Huang W, Zhou M, Zhou HK, Lu XH, Ye G. Differential promoter usage for insulin-like growth factor-II gene in Chinese hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 192-203
- 5 Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentini B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1332: F105-126
- 6 Reinmuth N, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmad SA, Stoeltzing O, Bucana CD, Radinsky R, Ellis LM. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3259-3269
- 7 Werner H, LeRoith D. The insulin-like growth factor-I receptor signaling pathways are important for tumorigenesis and inhibition of apoptosis. *Crit Rev Oncog* 1997; 8: 71-92
- 8 Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993; 75: 59-72
- 9 De Meyts P, Wallach B, Christoffersen CT, Urso B, Gronskov K, Latus LJ, Yakushiji F, Ilondo MM, Shymko RM. The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res* 1994; 42: 152-169
- 10 Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, Beck A, Pauwels PJ, Haeuw JF, Corvaia N. A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *Int J Cancer* 2005; 113: 316-328
- 11 Gluckman PD, Pinal CS. Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *J Nutr* 2003; 133: 1741S-1746S
- 12 Durai R, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 203-220
- 13 LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 127-137
- 14 Scott CD, Weiss J. Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor inhibits DNA synthesis in insulin-like growth factor II sensitive cells. *J Cell Physiol* 2000; 182: 62-68
- 15 Delaine C, Alvino CL, McNeil KA, Mulhern TD, Gauguin L, De Meyts P, Jones EY, Brown J, Wallace JC, Forbes BE. A novel binding site for the human insulin-like growth factor-II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor on IGF-II. *J Biol Chem* 2007; 282: 18886-18894
- 16 Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, Khokha R. Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 853-857
- 17 Noble A, Towne C, Chopin L, Leavesley D, Upton Z. Insulin-like growth factor-II bound to vitronectin enhances MCF-7 breast cancer cell migration. *Endocrinology* 2003; 144: 2417-2424
- 18 Wang Z, Ruan YB, Guan Y, Liu SH. Expression of IGF-II in early experimental hepatocellular carcinomas and its significance in early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 267-270
- 19 Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, Shows TB. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986; 46: 6169-6173
- 20 Furstenberger G, Senn HJ. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 298-302
- 21 Toretsky JA, Helman LJ. Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol* 1996; 149: 367-372
- 22 Lee DY, Yang DH, Kang CW, Kim SJ, Joo CU, Cho SC, Kim JS. Serum insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein (IGFBP)-3 in patients with gastric cancer: IGFBP-3 protease activity induced by surgery. *J Korean Med Sci* 1997; 12: 32-39
- 23 Yi HK, Hwang PH, Yang DH, Kang CW, Lee DY. Expression of the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2257-2263
- 24 Pavelic K, Kolak T, Kapitanovic S, Radosevic S, Spaventi S, Kruslin B, Pavelic J. Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *J Pathol* 2003; 201: 430-438
- 25 Zhao ZS, Ru GQ, Ma J. mRNA expression of IGF-II and HGF in relation to microvascular density, tumor progression and prognosis of gastric carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 673-677
- 26 Wagstaff SC, Bowler WB, Gallagher JA, Hipskind RA. Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2175-2181
- 27 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 33-36

#### ■同行评价

本文采用RT-PCR等分子生物学方法, 探讨了胰岛素样生长因子 II 与胃癌细胞系 SGC7901 c-fos和c-jun表达的关系, 研究内容较新颖, 所得出的结果对阐明胃癌的发生机制有一定的意义, 有较好的学术价值.

编辑 程剑侠 电编 张敏



# 靶向XIAP的shRNA重组质粒的构建

吴小力, 张鹏, 张琼, 姚津剑, 林菊生

## ■背景资料

IAP家族成员表达增高是肿瘤细胞逃避各种内源性(线粒体途径)和外源性(死亡受体途径)强凋亡诱导因素导致的死亡事件的主要机制。XIAP是凋亡抑制蛋白家族中抗凋亡作用最强的成员,在包括肝癌的多种恶性肿瘤中表达明显增高。其在肿瘤中的高表达可能是肿瘤进展及导致肿瘤对化疗药物耐药的一个重要机制。

吴小力, 张琼, 姚津剑, 林菊生, 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

张鹏, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科 湖北省武汉市 430030

吴小力, 2000年华中科技大学同济医学院硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。jslin@tjh.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2007-04-26 修回日期: 2007-08-03

## Construction of recombinant plasmids containing short hairpin RNA targeting the X-linked inhibitor of the apoptosis protein gene

Xiao-Li Wu, Peng Zhang, Qiong Zhang, Jin-Jian Yao, Ju-Sheng Lin

Xiao-Li Wu, Qiong Zhang, Jin-Jian Yao, Ju-Sheng Lin, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Peng Zhang, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. jslin@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-04-26 Revised: 2007-08-03

## Abstract

**AIM:** To construct recombinant plasmids containing short hairpin RNA (shRNA) that targets the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) gene, to assay the expression of XIAP in HepG2 cells after transfecting with recombinant plasmids, and to detect the RNAi effect of shRNA.

**METHODS:** Four pairs of shRNAs that target the XIAP gene were designed. The eukaryotic expression vector of psiRNA-Hhneo-XIAP was constructed and transfected via liposomes into HepG2 cells. XIAP mRNA expression was analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. XIAP protein expression was examined by Western blotting. The difference in XIAP gene and protein expression levels between

cells transfected or not transfected by psiRNA-Hhneo-XIAP was compared.

**RESULTS:** The successful construction of recombinant plasmids was confirmed by DNA sequencing of the inserted segments. Transfection of psiRNA-Hhneo-XIAP significantly down-regulated XIAP expression in HepG2 cells. Recombinant plasmid 1 had the strongest effect, with an inhibition ratio of 94.5% at the mRNA level and 92.6% at the protein level, which showed a significant difference from plasmids 3 and 4 (mRNA: 94.5% vs 81.5%, 82.6%, both  $P < 0.01$ ; protein: 92.6% vs 80.7%, 82.9%, both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** XIAP gene targeted shRNA suppresses gene and protein expression.

**Key Words:** X-linked inhibitor of apoptosis protein; Short hairpin RNA; Hepatic cell carcinoma; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Western blotting

Wu XL, Zhang P, Zhang Q, Yao JJ, Lin JS. Construction of recombinant plasmids containing short hairpin RNA targeting the X-linked inhibitor of the apoptosis protein gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2482-2486

## 摘要

**目的:** 设计以X染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)为靶向的shRNA, 构建携带此shRNA的重组质粒, 检测其抑制XIAP表达的效应, 筛选RNA干扰作用最强的shRNA片段。

**方法:** 设计4对针对XIAP基因不同位点的shRNA片段, 构建携带此shRNA片段的真核表达载体psiRNA-Hhneo-XIAP, 通过脂质体介导的方法将重组质粒转染到肝癌细胞株HepG2细胞中。采用逆转录酶链式反应(RT-PCR)及蛋白印迹(Western blotting)方法检测XIAP的mRNA及蛋白表达情况, 比较转染前后其表达差异, 以判断各shRNA的干扰效应。

**结果:** 成功构建含shRNA片段的重组质粒。经质粒测序证实, 插入的DNA片段的序列与设计序列完全一致。重组质粒转染HepG2



细胞后, XIAP基因的mRNA水平及蛋白表达水平明显下调, 其中以1号重组质粒效应最强. shRNA作用48 h后, 对HepG2细胞中XIAP mRNA和蛋白的抑制率与3, 4号重组质粒相比, 均具有显著性差异(mRNA: 94.5% vs 81.5%, 82.6%, 均 $P<0.01$ ; 蛋白: 92.6% vs 80.7%, 82.9%, 均 $P<0.01$ ).

**结论:** 成功构建了携带以XIAP为靶向的shRNA的重组质粒, 其对肝癌细胞内XIAP的表达具有显著抑制效应.

**关键词:** X染色体连锁凋亡抑制蛋白; 短发夹状RNA; 肝癌; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫蛋白印迹

吴小力, 张鹏, 张琼, 姚津剑, 林菊生. 靶向XIAP的shRNA重组质粒的构建. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2482-2486  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2482.asp>

## 0 引言

凋亡抵抗性是肿瘤细胞的一大特征, 使其在凋亡刺激因素的作用下仍能存活, 并对标准化疗方案中的多种化疗药物具有耐药性<sup>[1]</sup>. 凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族是目前所发现的唯一内源性caspase抑制物, 在凋亡调控中发挥着关键作用. 而X染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)则是IAP家族中最具有caspase抑制能力的成员, 因而也具有最强的抗凋亡能力<sup>[2-4]</sup>. XIAP蛋白水平的变化很大程度改变细胞对凋亡刺激的反应, 其过度表达可抑制多种凋亡刺激因素(包括肿瘤坏死因子、Fas、缺血、放疗、化疗)所诱导的细胞凋亡<sup>[5-7]</sup>. 有研究表明XIAP在肿瘤中的高表达可能是肿瘤进展及导致肿瘤对化疗药物耐药的一个重要机制<sup>[8-13]</sup>. 本研究设计并构建以XIAP为靶向的短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)重组质粒, 观察其下调XIAP表达的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株HepG2(购自ATCC)用含100 mL/L新生牛血清的DMEM培养基(美国Gibco公司), 在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养. Ase I 内切酶(MBI Fermentas公司)

**1.2 方法** 针对Pubmed上的基因库中查出XIAP的完整基因序列(序列编号U45880), 利用www.sirnowizard.com上的在线设计软件设计针对XIAP的shRNA, 选择四对碱基序列送上海生工

生物工程技术服务有限公司合成(表1). 将合成的含Bbs I 酶切位点的寡核苷酸链用T4 DNA连接酶(美国NEB公司)插入到psiRNA-hH1neo质粒(购自美国Invitrogen公司)的两个Bbs I 位点之间. 重组质粒转化感受态DH5 $\alpha$ 大肠杆菌. 通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆, 接种到培养基中培养过夜. 用质粒小量提取试剂盒(中国博大泰克公司)抽提质粒, 得到质粒酶切后进行酶切鉴定与测序法鉴定(上海生工生物工程技术服务有限公司测序), 证实重组质粒中插入的shRNA片段的碱基序列与设计序列完全一致. HepG2细胞接种于6孔板及96孔板内, 培养18-24 h后将培养基换为无血清的DMEM培养基, 按照质粒: 脂质体比例为1 g: 6 L滴加入脂质体DNA-Metafectene(德国Biontex公司)及质粒复合物转染细胞, 轻晃孔板混匀. 6 h后换为含150 mL/L新生牛血清的DMEM培养基. 重组质粒为试验组, 空载体为对照组.

**1.2.1 RT-PCR检测XIAP基因表达** 利用Primer 5.0软件分别设计XIAP基因和 $\beta$ -actin的PCR引物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. XIAP引物: 5'-TGGTCAGAACACAGGCGACA-3'(上游); 5'-CCCTCCTCCACAGTGAAAGC-3'(下游), 目的片段长度为270 bp;  $\beta$ -actin引物: 5'-CTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'(上游), 引物: 5'-CTTTAGCACGCACTGTAATTCCTC-3'(下游), 目的片段长度531 bp. 细胞转染48 h后收集细胞提取总RNA, 进行逆转录制备cDNA, 每份样品分别加入XIAP引物和 $\beta$ -actin引物进行PCR反应. 在25  $\mu$ L体系中加入上游及下游引物各1  $\mu$ L, 退火温度52℃, 共30次循环. 制备20 g/L琼脂糖凝胶, PCR产物各取4  $\mu$ L进行电泳, 用UVP凝胶成像系统拍照并使用图像分析软件分析同一样本XIAP基因与 $\beta$ -actin PCR产物条带的吸光度, 计算XIAP条带与 $\beta$ -actin条带吸光度比值, 对XIAP mRNA表达水平进行半定量分析.

**1.2.2 Western blot法检测XIAP蛋白的表达** 收集转染后48 h的HepG2细胞, 用细胞裂解液抽提细胞总蛋白, 在紫外分光光度仪上比色分析, 利用考马斯亮蓝标准曲线计算各样本蛋白浓度. 试验组和对照组分别取总蛋白7  $\mu$ g于120 g/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳后转至PVDF膜. 用含50 g/L脱脂奶粉的TBST封闭后加入1:500鼠抗人XIAP mAb(加拿大Stressgen公司)和1:500兔抗人 $\beta$ -actin mAb(加拿大Stressgen公司)4℃孵育过夜. 洗涤后分别用辣根过氧化物酶标记的相应

## ■ 相关报道

已有学者对XIAP在肺癌、前列腺癌、白血病等恶性肿瘤中的作用进行了研究, 但关于其在肝癌发展过程中所发挥的作用的研究尚少.

## ■应用要点

本研究设计以XIAP为靶向的shRNA, 构建携带此shRNA的重组质粒, 经检测证实其对XIAP表达具有明显抑制效应, 从而筛选出了对XIAP干扰作用最强的shRNA片段, 为进一步观察XIAP在肝癌中作用的研究打下基础。但构建的shRNA的重组质粒能抑制XIAP基因并不意味着该质粒对XIAP的抑制作用具有显著的生物学意义, 尚需对XIAP基因受抑制后的生物学效应作进一步深入研究。

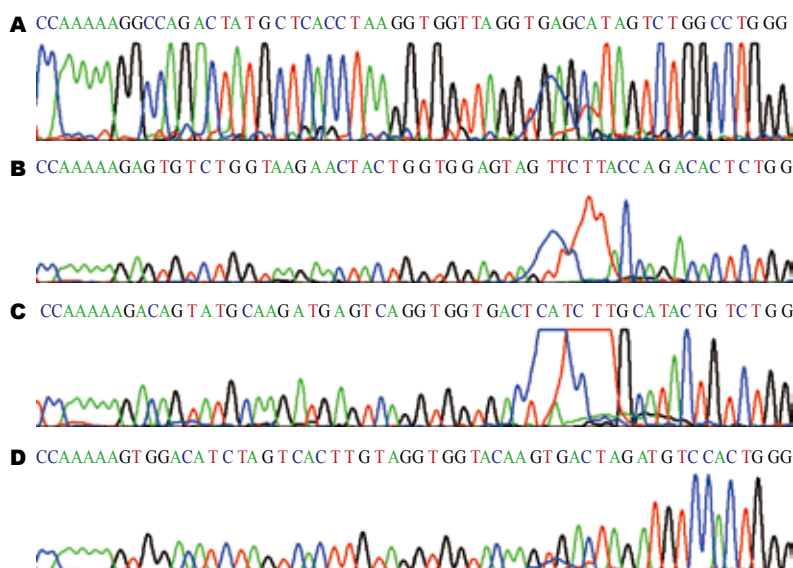


图1 重组质粒DNA测序图谱. A: shRNA1; B: shRNA2; C: shRNA3; D: shRNA4.

表1 针对XIAP基因设计的4种不同shRNA序列

编号	针对XIAP基因的shRNA序列
序列1	正义链: 5'-TCCCAGGCCAGACTATGCTCACCTAACCACCTTAGGTGAGCATAGTCTGGCCTT-3' 反义链: 5'-CAAAAAGGCCAGACTATGCTCACCTAAGGTGGTTAGGTGAGCATAGTCTGGCCT-3'
序列2	正义链: 5'-TCCCAGAGTGTCTGGTAAGAAGTACTCCACCAGTAGTCTTACCAGACACTCTT-3' 反义链: 5'-CAAAAAGAGTGTCTGGTAAGAAGTACTGGTGGAGTAGTCTTACCAGACACTCT-3'
序列3	正义链: 5'-TCCCAGACAGTATGCAAGATGAGTCACCACCTGACTCATCTTGCATACTGTCTT-3' 反义链: 5'-CAAAAAGACAGTATGCAAGATGAGTCAGGTGGTACTCATCTTGCATACTGTCT-3'
序列4	正义链: 5'-TCCCAGTGGACATCTAGTCACTTGTACCACCTACAAGTGACTAGATGTCCACTT-3' 反义链: 5'-CAAAAAGTGGACATCTAGTCACTTGTAGGTGGTACAAGTGACTAGATGTCCACT-3'

二抗(北京中山生物技术公司)孵育1 h, 化学发光(ECL)法显色. 用凝胶图像处理系统分析目的条带吸光度值, 计算XIAP与 $\beta$ -actin蛋白条带吸光度比值, 进行XIAP蛋白表达水平的半定量分析.

**统计学处理** 实验所得数据资料采用SPSS 13.0统计分析软件进行方差分析, 比较各组间差异,  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 重组质粒psiRNA-hH1neo-XIAP的鉴定** 根据蓝白斑筛选取白色克隆株摇菌扩增后抽提重组质粒, 用Ase I内切酶进行单酶切. Ase I酶切后, 空载体由于含有2个酶切位点被切成大小2个片段; 而重组质粒仅含有1个酶切位点, 酶切后被线性化. 制备10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果. 选择酶切鉴定重组成功的质粒进行DNA测序, 证实插入的4个shRNA片段碱基序列与设计序列完全一致(图1).

**2.2 RT-PCR检测结果** 转染重组质粒48 h后RT-PCR产物电泳结果显示(图2), 各组内参 $\beta$ -actin

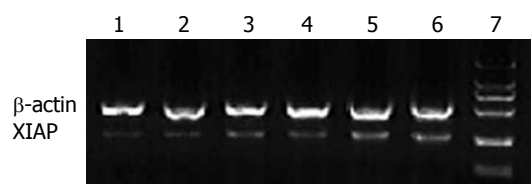


图2 重组质粒转染后XIAP mRNA在HepG2细胞中的表达. 1-4: shRNA1-4; 5: 空质粒; 6: 空白对照组; 7: Marker 2000.

条带亮度相似, shRNA重组质粒转染组XIAP mRNA水平低于空质粒转染组和空白对照组, 其中1号重组质粒转染后XIAP mRNA降低最为明显, 电泳条带光密度值XIAP/ $\beta$ -actin为 $0.0083 \pm 0.0005$ , 对照组为 $0.1512 \pm 0.0211$ . 4种重组质粒与空质粒转染组相比均存在显著性差异( $P < 0.05$ , 表2), 表明4个重组质粒均成功转染HepG2细胞并不同程度下调XIAP基因mRNA的表达. 其中以1号重组质粒抑制效应最强, shRNA作用48 h后, 对HepG2细胞中XIAP mRNA的最大抑制率为94.5%, 与3、4号重组质粒相比, 具有显著性差异( $P < 0.01$ , 表2).

表 2 重组质粒转染HepG2细胞后XIAP的表达(mean  $\pm$  SD)

分组	24 h mRNA		48 h mRNA		72 h mRNA		48 h 蛋白	
	XIAP/ $\beta$ -actin 吸光度比值	抑制率 (%)	XIAP/ $\beta$ -actin 吸光度比值	抑制率 (%)	XIAP/ $\beta$ -actin 吸光度比值	抑制率 (%)	XIAP/ $\beta$ -actin 吸光度比值	抑制率 (%)
空载体	0.1487 $\pm$ 0.0363	0	0.1512 $\pm$ 0.0211	0	0.1534 $\pm$ 0.0278	0	1.36 $\pm$ 0.23	0
psiRNA1	0.0453 $\pm$ 0.0039	69.5 <sup>a</sup>	0.0083 $\pm$ 0.0005	94.5 <sup>a</sup>	0.0078 $\pm$ 0.0013	94.9 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.02	92.6 <sup>a</sup>
psiRNA2	0.0654 $\pm$ 0.0213	56.0 <sup>a</sup>	0.0147 $\pm$ 0.0054	90.3 <sup>a</sup>	0.0139 $\pm$ 0.0073	90.9 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.05	88.3 <sup>a</sup>
psiRNA3	0.0798 $\pm$ 0.0109	46.3 <sup>ad</sup>	0.0279 $\pm$ 0.0058	81.5 <sup>ad</sup>	0.0266 $\pm$ 0.0053	82.7 <sup>ad</sup>	0.26 $\pm$ 0.04	80.7 <sup>ad</sup>
psiRNA4	0.0779 $\pm$ 0.0084	47.6 <sup>ad</sup>	0.0263 $\pm$ 0.0056	82.6 <sup>ad</sup>	0.0234 $\pm$ 0.0089	84.7 <sup>ad</sup>	0.23 $\pm$ 0.04	82.9 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空载体; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs psiRNA1.

2.3 Western blot检测结果 转染48 h后, 各组细胞 $\beta$ -actin蛋白杂交条带亮度相似, 在54 kDa蛋白条带位置均呈现XIAP特异性蛋白杂交条带表达, 但亮度有明显差异(图3). shRNA干扰组细胞的XIAP蛋白条带亮度明显低于空质粒转染组和脂质体对照组, 其中1号质粒转染组蛋白条带亮度最弱. 凝胶图像处理系统分析显示, XIAP/ $\beta$ -actin吸光度值: 1号质粒为0.10  $\pm$  0.02, 对照组为1.36  $\pm$  0.23. 各重组质粒与空质粒转染组相比均存在显著性差异( $P < 0.05$ , 表2). 表明4个重组质粒均成功转染HepG2细胞并不同程度下调XIAP基因蛋白的表达, 尤以1号质粒产生效应最强, 与3, 4号重组质粒相比, 存在显著性差异( $P < 0.01$ ). shRNA干扰后, HepG2细胞中XIAP蛋白表达抑制率最高达92.6%.

### 3 讨论

在肿瘤的发生与发展中, 有多种内源性及外源性凋亡刺激因素作用于肿瘤细胞, 促其凋亡. 但由于其具有凋亡抵抗性, 肿瘤细胞可逃避死亡进程, 继续生长. 尤其是应用对增殖细胞具有强凋亡诱导性的化疗药物进行化疗治疗时, 这种凋亡抵抗性显得尤为突出. 这种凋亡通路异常对肿瘤细胞的持续性生长和增殖具有关键作用, 并导致了肿瘤细胞的化疗抵抗性<sup>[12-15]</sup>.

IAP家族成员表达增高是肿瘤细胞逃避各种内源性(线粒体途径)和外源性(死亡受体途径)强凋亡诱导因素导致的死亡事件的主要机制<sup>[16]</sup>. XIAP是凋亡抑制蛋白家族中抗凋亡作用最强的成员, 在细胞畸变、肿瘤形成时表达明显增加<sup>[17-22]</sup>. XIAP高表达与急性粒细胞白血病的预后不良相关<sup>[23-24]</sup>, 并且其表达水平与放疗、化疗抵抗性<sup>[8-13]</sup>呈正相关.

我们前期研究发现, 在人肝癌组织和肝癌

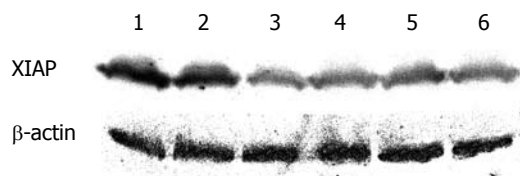


图 3 shRNA转染48 h后HepG2细胞内XIAP蛋白表达. 1: 空白对照组; 2: 空质粒转染组; 3-6: 1-4号重组质粒.

细胞系中XIAP基因的mRNA和蛋白表达水平明显高于癌旁组织与正常肝细胞系, 提示XIAP基因的高表达与肝癌的发生、发展密切相关<sup>[25]</sup>. 在此基础上, 我们构建针对XIAP基因的小RNA干扰(siRNA)真核表达载体, 然后转染高表达XIAP基因的肝癌细胞HepG2. 转染psiRNA-Hhneo-XIAP后, HepG2细胞XIAP表达明显低于空载体转染组, 说明所构建真核表达载体psiRNA-Hhneo-XIAP能特异性下调XIAP的表达. 在所合成的4个shRNA中, 1号shRNA抑制XIAP mRNA和蛋白表达的作用最为明显, 作用48 h抑制率达94.5%及92.6%, 与3, 4号shRNA相比具有显著性差异. 由于XIAP基因的过表达与肿瘤对多药化疗的抵抗性有关<sup>[26-28]</sup>, 且XIAP基因敲除鼠未发现明显病理变化, 提示敲除XIAP对正常细胞无毒性<sup>[29]</sup>, 故XIAP基因被认为是具有潜力的肿瘤治疗靶点. 在本研究结果中, 使用针对XIAP的shRNA, 可显著抑制肝癌细胞株内XIAP mRNA与蛋白表达, 这将为以XIAP为位点的肝癌靶向治疗提供科学的实验依据.

### 4 参考文献

- 1 Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003; 3: 17-22
- 2 Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999; 18:

### 同行评价

本文以XIAP为靶向的shRNA, 成功构建了含shRNA片段的重组质粒, 设计合理, 具有一定的创新性, 采用的技术先进, 结果可信, 为进一步利用shRNA的重组质粒来研究抑制XIAP基因功能对肝癌细胞生物学特征的影响奠定了基础.

- 5242-5251
- 3 Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914-6925
  - 4 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320
  - 5 LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259
  - 6 Holcik M, Yeh C, Korneluk RG, Chow T. Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene* 2000; 19: 4174-4177
  - 7 Marienfeld C, Yamagiwa Y, Ueno Y, Chiasson V, Brooks L, Meng F, Patel T. Translational regulation of XIAP expression and cell survival during hypoxia in human cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 1787-1797
  - 8 Li J, Feng Q, Kim JM, Schneiderman D, Liston P, Li M, Vanderhyden B, Faught W, Fung MF, Senterman M, Korneluk RG, Tsang BK. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 2001; 142: 370-380
  - 9 Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res* 2003; 63: 6815-6824
  - 10 Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* 2006; 13: 179-188
  - 11 Wright CW, Duckett CS. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* 2005; 115: 2673-2678
  - 12 Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7414-7430
  - 13 Wrzesien-Kus A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A, Robak T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis* 2004; 9: 705-715
  - 14 Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432: 307-315
  - 15 Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-288
  - 16 LaCasse EC, Holcik M, Korneluk RG, MacKenzie AE. Apoptosis in health, disease, and therapy: overview and methodology. In: *Apoptosis in health and disease: clinical and therapeutic aspects*. Cambridge: Cambridge University Press 2005: 1-48
  - 17 Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1796-1803
  - 18 Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000; 70: 113-122
  - 19 Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Ito K, Yamamoto N, Yamanaka T, Fujikawa K, Murata K, Nakano T. Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003; 12: 705-708
  - 20 Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruij FA, Pinedo HM, van Tinteren H, Giaccone G. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2468-2474
  - 21 Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1104-1110
  - 22 Takeuchi H, Kim J, Fujimoto A, Umetani N, Mori T, Bilchik A, Turner R, Tran A, Kuo C, Hoon DS. X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression level in colorectal cancer is regulated by hepatocyte growth factor/C-met pathway via Akt signaling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7621-7628
  - 23 Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, Wuchter C. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3737-3744
  - 24 Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haferlach T, Ludwig WD, Wuchter C. XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J* 2004; 5: 489-495
  - 25 陶璐薇, 林菊生, 陈孝平, 周鹤俊, 蔡晓坤, 李超. 肝细胞癌中XIAP mRNA及蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2788-2791
  - 26 Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, Lu GC. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 509-514
  - 27 Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, Glinsky GV. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 2378-2386
  - 28 Wilkinson JC, Cepero E, Boise LH, Duckett CS. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7003-7014
  - 29 Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3604-3608

编辑 何燕 电编 张敏

# TFF2在幽门螺杆菌感染胃体部黏膜中的表达

金仁顺, 方贞花, 朴东明

金仁顺, 朴东明, 延边大学附属医院病理科 吉林省延吉市 133000  
方贞花, 吉林省延吉市医院消化内科 吉林省延吉市 133000  
金仁顺, 副主任医师, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤病理研究。  
吉林省教育厅科技计划项目, No. 2006-10  
通讯作者: 金仁顺, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院病理科. rsjin@163.com  
电话: 0433-2660121  
收稿日期: 2007-04-05 修回日期: 2007-07-28

## Expression of trefoil factor family 2 in fundic glands with *Helicobacter pylori* infection

Ren-Shun Jin, Zhen-Hua Fang, Dong-Ming Piao

Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Department of Pathology, Affiliated Hospital to Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Zhen-Hua Fang, Department of Gastroenterology, Hospital of Yanji City, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Supported by: the Science and Technology Planning Project of Education Department of Jilin Province, No. 2006-10  
Correspondence to: Ren-Shun Jin, 133000, Department of Pathology, Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Jilin Province, China. rsjin@163.com  
Received: 2007-04-05 Revised: 2007-07-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the protein expression of the trefoil factor family 2 (TFF2) in fundic glands with *Helicobacter pylori* infection.

**METHODS:** Protein expression of TFF2 was detected by immunohistochemistry in paraffin-embedded samples from 29 (92 blocks) surgical specimens from five patients gastric ulcer and 24 with gastric carcinoma.

**RESULTS:** Expression of TFF2 was found in mucous neck cells and cells with pseudopylori gland metaplasia. Positive cells were distributed above the 1/2 to 2/3 portions of fundic glands in normal gastric mucosa. The ratio of TFF2-positive cells in the basal portion of the fundic glands was 18.0, 42.9 and 90.5% in mild, moderate and severe glandular atrophy, respectively, and these differences were significant ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** *H. pylori* infection increases the

expression of TFF2 in deeper parts of the fundic gland, and is also associated with the degree of glandular atrophy. The expression of TFF2 is related to mucosal protection and repair processes.

**Key Words:** Trefoil factor family 2; *Helicobacter pylori*; Fundic gland; Mucous neck cell; Pseudopylori gland metaplasia

Jin RS, Fang ZH, Piao DM. Expression of trefoil factor family 2 in fundic glands with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2487-2490

### 摘要

**目的:** 探讨三叶因子2(TFF2)在幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染胃体腺黏膜中表达的意义。

**方法:** 选择有*H. pylori*感染的胃手术切除标本29例(92个蜡块), 其中胃及十二指肠溃疡5例, 胃癌24例, 用免疫组织化学方法检测TFF2的分布和表达。

**结果:** 在*H. pylori*感染胃黏膜中, TFF2主要在胃体腺的颈黏液细胞和假幽门腺化生细胞中表达; 在正常黏膜中TFF2主要分布在胃固有腺的上1/3-2/3; 在轻度萎缩黏膜中, 腺底部仅见少量阳性细胞, 随着萎缩程度的加重, 在腺底部出现的阳性细胞增多; 在轻、中度萎缩黏膜中其强阳性率分别为18.0%和42.9%, 而在重度萎缩中达90.5%。在轻、中度和重度萎缩之间有显著性差异( $P < 0.01$ )。

**结论:** *H. pylori*感染增加在腺底部的TFF2表达, 并与黏膜的萎缩程度有关。

**关键词:** 三叶因子2; 幽门螺杆菌; 胃体腺黏膜; 颈黏液细胞; 假幽门腺化生

金仁顺, 方贞花, 朴东明. TFF2在幽门螺杆菌感染胃体部黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2007; 15(23): 2487-2490  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2487.asp>

### 0 引言

*H. pylori*感染慢性胃炎伴有的化生性病变除了肠上皮化生以外还有胃体腺区的颈黏液细胞

### ■背景资料

*H. pylori*感染慢性胃炎除了肠上皮化生以外还有胃体腺区的颈黏液细胞增生(MNC)和假幽门腺化生(PPGM), 但目前为止没有得到足够的重视, 在正常胃黏膜中TFF2在贲门腺和幽门腺以及颈黏液细胞中有表达。MNC和PPGM以及TFF2的表达可能在*H. pylori*感染胃炎中起很重要的作用, 因此有必要进行深入的研究。



## ■创新盘点

*H. pylori*感染增加在腺底部的TFF2表达,并与黏膜的萎缩程度有关,提示TFF2的表达与*H. pylori*感染胃黏膜的保护和修复有关,另外,还可能与胃癌的发生有关。

增生(mucous neck cell, MNC)和假幽门腺化生(pseudopylori gland metaplasia, PPGM),但目前为止没有得到足够的重视。Takizawa *et al*<sup>[1]</sup>曾报道过慢性萎缩性胃炎除了肠上皮化生为主型胃炎外,还有假幽门腺化生为主型的胃炎的存在。我们利用全切胃标本研究了*H. pylori*与化生性病分布,结果发现了肠上皮化生轻度而颈黏液细胞增生和假幽门腺化生为主的病例<sup>[2-3]</sup>,认为*H. pylori*感染性胃炎中黏液细胞的增生和假幽门腺化生同肠上皮化生一样重要。

研究表明,当在胃体腺黏膜部位诱发溃疡或糜烂时,出现假幽门腺化生细胞,认为与黏膜的修复有关。另外,胃体腺的固有腺细胞有缺损时颈黏液细胞反应性增多,转变成假幽门腺化生细胞,说明颈黏液细胞不仅是由干细胞转化为主细胞的中间型移行细胞,而且他的增殖与假幽门腺化生细胞与损伤黏膜的修复机制有关。近年的研究发现颈黏液细胞分泌黏液成分的同时分泌三叶因子<sup>[4]</sup>,在正常胃黏膜中,TFF2在贲门腺和幽门腺以及颈黏液细胞中有表达<sup>[5-6]</sup>。颈黏液细胞的增生和假幽门腺化生以及TFF2的表达可能在*H. pylori*感染胃炎中起到很重要的作用,因此,我们探讨了TFF2在*H. pylori*感染胃炎中的表达以及与颈黏液细胞和假幽门腺化生细胞的相关性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 外科手术切除的胃标本按常规方法取材做蜡块,在HE染色上观察有无幽门*H. pylori*感染,然后选择标本保存及固定好、有幽门螺杆菌*H. pylori*感染的标本29例,其中,胃十二指肠溃疡5例,早期胃癌14例,进展期胃癌10例。男15例,女14例,年龄38-79(平均57.3)岁。在每个病例的胃体部取4-5块组织,按常规方法40 g/L甲醛中固定48-72 h后制作蜡块,共92块,做连续切片,行苏木素-伊红常规染色和TFF2免疫组织化学染色。

1.2 方法 脱蜡至水后,330 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10 min,灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗3次,用苦味酸缓冲液Autoclave(高压锅)120℃、3 min进行抗原修复,冷却至室温,PBS冲洗3-5次,滴加正常血清封闭液10 min,倾去血清,滴加TFF2抗体(clone: GE16c, 稀释倍数1:25, Novocastra Laboratories Newcastle, UK),室温2 h, PBS冲洗3-5次,滴加二抗1 h, PBS冲洗3-5次, DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片后显微镜下观察。黏黏膜的萎缩程度根据Updated

Sydney System<sup>[7]</sup>标准来判断轻度、中度和重度。TFF2的表达:在细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,在固有腺底部出现的TFF2阳性细胞≤10%定为+(阳性),>10%为++(强阳性)。

统计学处理 采用Scheffe's F方法, $P<0.01$ 为有差异。

## 2 结果

胃黏膜29例均见中性粒细胞及淋巴-浆细胞浸润,呈慢性活动性胃炎的表现,并可见黏膜的萎缩,而每个病例的萎缩程度不同,胃癌的病例较胃十二指肠溃疡病例萎缩程度重。在萎缩的胃黏膜中见不同程度的颈黏液细胞的增生和假幽门腺化生。在胃黏膜的黏液层或在胃黏膜的表层上皮中均能观察到*H. pylori*感染。

在正常胃黏膜,TFF2主要在幽门腺和贲门腺及腺颈部的部分颈黏液细胞中表达,表面上皮和胃固有腺未见表达。在本研究中TFF2在胃体腺黏膜颈部的颈黏液细胞和假幽门腺化生细胞中均有表达(图1A)。在正常黏膜中TFF2阳性细胞从腺颈部至固有腺的1/3-2/3中分布(图1B);而在萎缩黏膜中,腺底部可见阳性细胞,其表达程度与黏膜的萎缩程度有关,随着萎缩程度的加重,TFF2阳性细胞在固有腺底部出现的比例增高(图1C),在轻度、中度和重度萎缩黏膜中其阳性率和强阳性率分别为,+: 82.0%, 57.1%和9.5%; ++: 18.0%, 42.9%和90.5%。在轻度、中度萎缩与重度萎缩之间有显著性差异( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

三叶因子2(Trefoil factor 2, TFF2)又称解痉多肽(spasmolytic polypeptide, SP),在胃体腺黏膜中其阳性细胞主要分布在黏膜的腺颈部,在本研究中TFF2在腺颈部的颈黏液细胞和假幽门腺化生细胞中均有表达。在萎缩黏膜中TFF2阳性细胞不仅分布在腺颈部,且在腺底部也有分布,其分布与胃体腺的黏膜萎缩程度有关。即在轻度萎缩黏膜中TFF2主要在胃黏膜颈部表达,在腺底部仅有少量表达,但随着黏膜萎缩程度加重,在腺底部出现的阳性细胞增多。提示*H. pylori*感染增加TFF2在固有腺底部的表达,并TFF2阳性表达与黏膜的萎缩程度有关。Wright *et al*<sup>[8]</sup>在消化道再生结构机制研究中提出UACL(ulcer-associated cell lineage)概念,消化道黏膜受损伤之后,在黏膜的修复过程中可以观察到UACL,



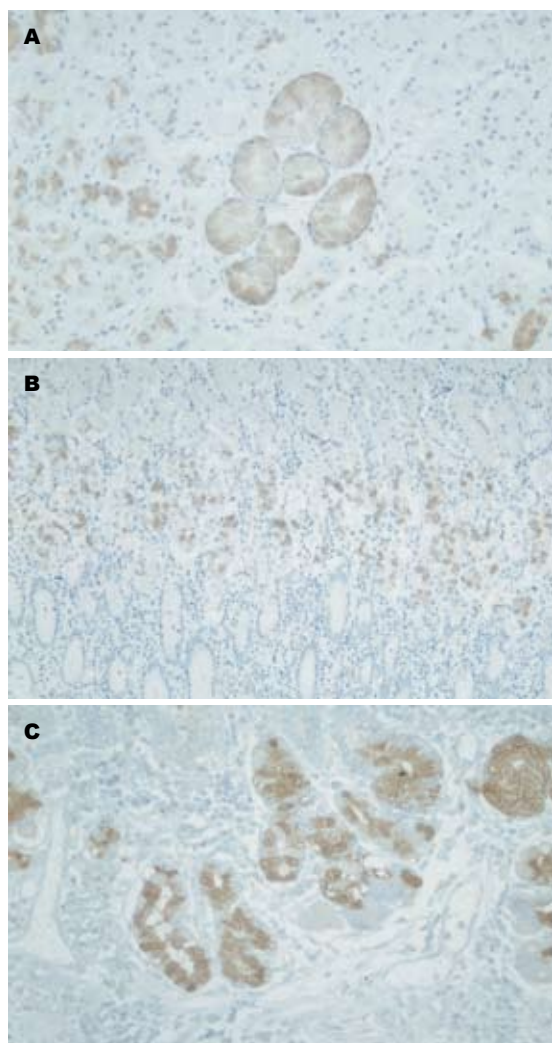


图1 TFF2的表达(Elivison二步法). A: 胃体腺黏膜颈部的颈黏液细胞和假幽门腺化生细胞中均有表达; B: 腺颈部至固有腺的1/3-2/3中分布; C: 固有腺底部.

而这种细胞TFF呈阳性<sup>[9-10]</sup>. 动物实验已证实对胃体腺黏膜诱发溃疡或糜烂性损伤时, 溃疡或糜烂黏膜边缘出现颈黏液细胞的增加和假幽门腺化生, 认为与黏膜的损伤修复有关. 在本研究中 *H. pylori* 感染性萎缩性胃炎黏膜中出现颈黏液细胞的增生和假幽门腺化生, 并且TFF2呈阳性表达. 根据Wright理论, 推测在 *H. pylori* 感染胃黏膜中TFF2表达阳性的细胞可能是UACL的一种, 与 *H. pylori* 感染及其引起的炎症性损伤黏膜的防御与修复有关.

Wang *et al*<sup>[11]</sup>在 *H. pylori* 感染C57BL/6大鼠研究中发现 *H. pylori* 感染大鼠的胃体腺黏膜中, 出现与人类 *H. pylori* 感染性萎缩性胃炎相似的病变, 即壁细胞和主细胞减少的同时腺颈部的颈黏液细胞增加, 这种细胞TFF2呈阳性表达, 称之SP阳性黏膜细胞系(SP-positive mucous cell lineage), 随后Schmidt *et al*<sup>[12]</sup>在 *H. pylori* 感染

胃体腺黏膜研究中, 观察到TFF2阳性细胞在电子显微镜下与Wang *et al*<sup>[11]</sup>的SP阳性黏膜细胞系相似, 把他称为解痉多肽表达性化生细胞系(SP-expressing metaplasia mucous cell lineage), 简称SP-EM. 之后研究者们发现在胃癌的癌旁黏膜及异型增生黏膜中可以观察到SP-EM, 考虑与胃癌的发生有关<sup>[13-17]</sup>. 在本研究中, 认为癌前期病变的萎缩性黏膜中可见TFF2的表达, 且随着胃体腺萎缩程度的加重, 在黏膜固有层及其底部的TFF2阳性细胞分布增多. 而在这些病例中胃癌黏膜的萎缩程度明显比胃十二指肠溃疡黏膜重, 从此考虑在萎缩胃体黏膜中的TFF2阳性表达可能与胃癌的发生有关.

总之, TFF2阳性表达(SP-EM)与 *H. pylori* 感染胃炎的胃体腺黏膜的萎缩程度有关, 在 *H. pylori* 感染引起的胃黏膜损伤的保护和修复中起重要的作用<sup>[18-19]</sup>, 这对 *H. pylori* 感染引起的消化性溃疡及胃炎等黏膜损伤性疾病的预防和治疗提供新的理论依据<sup>[20]</sup>. 另外, SP-EM可能与胃癌的发生有关, 但SP-EM在胃癌的发生机制中作用还不很清楚, 有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Takizawa T, Koike M. Chronic gastric from pathological changes of corpus gland mucosa. *I to Cho (Stomach and intestine)* 1985; 20: 611-624
- 2 Jin RS, Ban SI, Takahama MH. Immunohistochemical study on the relationship between the distribution of *Helicobacter pylori* and metaplastic lesions using whole-mucosal step sectioning of resected stomachs. *J Saitama Med School* 2001; 28: 81-88
- 3 金仁顺, 朴东明. 幽门螺杆菌与化生性病变在胃黏膜中的分布. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2030-2033
- 4 Hanby AM, Poulosom R, Playford RJ, Wright NA. The mucous neck cell in the human gastric corpus: a distinctive, functional cell lineage. *J Pathol* 1999; 187: 331-337
- 5 Hanby AM, Poulosom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 1993; 105: 1110-1116
- 6 Katoh M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med* 2003; 12: 3-9
- 7 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 8 Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 1990; 343: 82-85
- 9 Pera M, Heppell J, Poulosom R, Teixeira FV, Williams J. Ulcer associated cell lineage glands expressing trefoil peptide genes are induced by

#### ■同行评价

本文提示了TEF2的表达与幽门螺杆菌感染胃黏膜的保护有关, 全文逻辑性较强, 结构紧凑, 论证有据, 文字通顺, 对临床应用有很大的意义.

- chronic ulceration in ileal pouch mucosa. *Gut* 2001; 48: 792-796
- 10 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000; 47: 792-800
- 11 Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, Koh TJ, Fox JG. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* 1998; 114: 675-689
- 12 Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulsom R, Wright NA, Goldenring JR. Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* 1999; 79: 639-646
- 13 Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M, Lee JR. Association of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia with carcinogen administration and oxyntic atrophy in rats. *Lab Invest* 2002; 82: 1045-1052
- 14 Oshima M, Oshima H, Matsunaga A, Taketo MM. Hyperplastic gastric tumors with spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia caused by tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent inflammation in cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 transgenic mice. *Cancer Res* 2005; 65: 9147-9151
- 15 Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 910-914
- 16 Halldorsdottir AM, Sigurdardottir M, Jonasson JG, Oddsdottir M, Magnusson J, Lee JR, Goldenring JR. Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia (SPEM) associated with gastric cancer in Iceland. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 431-441
- 17 Nomura S, Baxter T, Yamaguchi H, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia to preneoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 2004; 127: 582-594
- 18 Suzuki K, Hayama M, Nakamura M, Yamauchi K, Maruta F, Miyagawa S, Ota H. Trefoil factor 2 in gland mucous cell mucin in the mucous gel covering normal or damaged gastric mucosa using the Mongolian gerbil model. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1390-1397
- 19 Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J, Fox JG, Wang TC. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 2007; 75: 471-480
- 20 张绍荣, 宋于刚, 陈学清, 林英卓. 三叶因子2基因治疗对实验性大鼠胃溃疡愈合影响的研究. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 1418-1420

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 •

### 2007 全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学会主办, 中华消化内镜学会胃病学组、浙江省消化内镜学会、温州医学院、上海市胃肠肿瘤重点学科承办的2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会将于2007-11-16/18在浙江省温州市举行. 邀请国内外专家作专题讲演及内镜操作演示.

#### 1 征文内容和要求

(1)有关早期胃癌及消化病进展; (2)胃癌及消化病诊疗的最新技术及研究成果. 投稿截止日期: 2007-10-10.

#### 2 联系方式

325000, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院消化内科夏宣平或浙江省温州市温州医学院附属第一医院消化内科贾国葆收. Email: feyhx@163.com或xxpsummer@yahoo.com.cn.

# 胃癌组织中微淋巴管的生成特点及临床病理意义

项锋钢, 徐 静, 于文娟

项锋钢, 于文娟, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003  
徐静, 青岛大学显微结构学实验室 山东省青岛市 266071  
项锋钢, 1986年青岛大学医学院本科毕业, 1992年青岛大学医学院研究生毕业, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤病理的研究.  
通讯作者: 项锋钢, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院病理科. xiangfenggang@163.com  
电话: 0532-2911533  
收稿日期: 2007-04-13 修回日期: 2007-08-08

## Clinicopathological significance of lymphangiogenesis in gastric cancer

Feng-Gang Xiang, Jing Xu, Wen-Juan Yu

Feng-Gang Xiang, Wen-Juan Yu, Department of Pathology, Affiliated Hospital of the Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Jing Xu, The Laboratory of Microscopic Structure, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China  
Correspondence to: Feng-Gang Xiang, Department of Pathology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. xiangfenggang@163.com  
Received: 2007-04-13 Revised: 2007-08-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the distribution patterns and proliferative activity of lymphatic vessels in gastric cancer and their relationship with lymphatic metastasis and clinicopathological features.

**METHODS:** Lymphatic microvessel density (LMVD) in tumorous areas of 56 cases of gastric cancer and non-tumorous areas of 12 corresponding normal tissues were immunohistochemically evaluated using a monoclonal antibody for podoplanin. Ki-67 protein expression of the lymphatic lining cells was simultaneously detected by double-labeling immunohistochemistry. The distribution patterns and the relationship between LMVD and clinicopathological features were analyzed.

**RESULTS:** Intratumoral lymphatic vessels, which were not often seen, had ill-defined lumina, while peritumoral lymphatic vessels had

large and open lumina. LMVD at peritumoral regions were significantly more prevalent than at intratumoral areas and normal gastric submucosa ( $11.89 \pm 3.95$  vs  $5.83 \pm 3.26$ ,  $6.93 \pm 1.32$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The Ki-67 labeling index of the lymphatic lining cells at peritumoral regions was significantly higher than that in normal gastric submucosa and intratumoral regions ( $0.04 \pm 0.02$  vs  $0$ ,  $0$ , both  $P < 0.05$ ). LMVD protein expression significantly correlated with the differentiation of gastric cancer, lymphatic involvement by tumor cells, and lymph nodes metastasis ( $P < 0.05$ ). The peritumoral Ki-67 labeling index of lymphatic lining cells was only significantly correlated with lymphatic involvement of tumor cells ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Newly formed lymphatic vessels are found in gastric cancer, especially in peritumoral regions. Peritumoral lymphatic microvessels are the main route for lymphatic metastasis.

**Key Words:** Gastric tumor; Lymphatic microvessel density; Lymphangiogenesis; Podoplanin

Xiang FG, Xu J, Yu WJ. Clinicopathological significance of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2491-2495

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌组织中微淋巴管的生成特点及与临床病理特征之间的关系.

**方法:** 对胃癌56例及相应正常胃组织12例进行双重免疫组织化学染色, 采用微淋巴管特异标记物Podoplanin标记微淋巴管, 同时采用Ki-67来检测微淋巴管内皮细胞的增殖活性, 并观察微淋巴管分布特点, 分析其与临床病理特征之间的关系.

**结果:** 胃癌组织中存在微淋巴管, 但分布不一致. 癌内微淋巴管数目少, 并且多呈闭锁条索状, 癌周微淋巴管数目多且多扩张, 呈管腔样, 有时可在其中发现癌栓. 胃癌癌周微淋巴管密度( $11.89 \pm 3.95$ )与癌内微淋巴管密度( $5.83 \pm$

## ■背景资料

肿瘤淋巴管生成(微淋巴管)与恶性肿瘤的转移关系密切, 并成为肿瘤研究的热点. 随着淋巴管内皮细胞特异性标记物Podoplanin的发现和运用, 为肿瘤淋巴管生成的研究提供了较为可靠的手段. 然而, 胃癌中淋巴管生成的特点和作用却鲜有报道.

## ■相关报道

Jia *et al*对结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移的关系进行了探讨; 牟江洪 *et al*采用免疫组织化学双重标记法系统探讨了结直肠癌淋巴管生成的特点及意义; Van *et al*对乳腺癌中淋巴管生成的意义进行探讨; Nakamura *et al*的研究揭示出胃癌中淋巴管的重要作用, 他是胃癌的预后指标和早期胃癌发生淋巴结转移的预测指标。

3.26)相比较, 差别有显著统计学意义( $P<0.01$ ), 与相应正常组织微淋巴管密度( $6.93\pm 1.32$ )相比较, 差别亦有统计学意义( $P<0.05$ )。胃癌癌周微淋巴管内皮细胞Ki-67指数( $0.04\pm 0.02$ )分别与癌内微淋巴管内皮细胞Ki-67指数(0)及相应正常胃组织微淋巴管内皮细胞Ki-67指数(0)相比较, 差别均有统计学意义( $P<0.05$ )。胃癌癌周微淋巴管密度与肿瘤的分化程度、淋巴结转移以及淋巴管受累相关( $P<0.05$ )。胃癌癌周微淋巴管内皮细胞Ki-67指数仅与淋巴管受累相关( $P<0.05$ )。

**结论:** 胃癌组织中存在新生淋巴管, 且主要存在于癌周, 癌周淋巴管是发生淋巴结转移的主要途径。

**关键词:** 胃癌; 微淋巴管密度; 淋巴管生成; 微淋巴管特异标记物

项锋钢, 徐静, 于文娟. 胃癌组织中微淋巴管的生成特点及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2491-2495  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2491.asp>

## 0 引言

淋巴道转移是胃癌最常见和最重要的转移途径, 也是影响患者生存的重要因素之一。然而长期以来, 由于缺乏淋巴管特异性标记物, 对肿瘤淋巴管生成、分布及其与肿瘤转移播散之间关系的研究一直较为薄弱。肿瘤内新生淋巴管存在与否, 以及肿瘤细胞是通过原有淋巴管还是新生淋巴管进行转移等问题一直存在争议。胃癌局部淋巴结转移十分常见, 但其淋巴管的生成、分布及与淋巴道转移之间的关系目前仍不清楚。为此, 我们采用新近发现的淋巴管特异性标记物Podoplanin来标记胃癌组织的微淋巴管, 同时用检测细胞增殖状态的抗体Ki-67来显示微淋巴管内皮细胞的增殖状态, 即通过免疫组织化学双重标记法, 对56例胃癌及12例相应正常胃组织同时显示微淋巴管及处于增殖状态的微淋巴管内皮细胞, 从而探讨胃癌微淋巴管的生成特点以及与相关临床病理特征之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取青岛大学医学院附属医院病理科2005-01/12手术切除的胃癌存档蜡块56例及相应正常胃组织蜡块12例, 其中每1例胃癌蜡块均包含取自于癌中央区(即癌内)及癌组织和周围正常组织交界区(即癌周)的组织。术前未接受过化放

疗。其中, 男31例, 女25例, 平均年龄58(42-75)岁, >58岁21例, <58岁35例; 高分化腺癌8例, 中分化腺癌20例, 低分化腺癌28例; 采用1987年国际抗癌联盟(UICC)PTNM分期标准, I期+II期为35例, III期+IV期21例; 根据肿瘤浸润深度, 侵犯至黏膜及黏膜下层6例, 侵犯至肌层者18例, 侵犯至浆膜及浆膜外32例; 根据病情进展情况, 早期胃癌6例, 中晚期胃癌50例; 伴有淋巴结转移27例, 淋巴结无转移29例; 淋巴管受累35例; 肿瘤直径 $\geq 4$  cm 24例, <4 cm 32例。所有蜡块均行连续石蜡切片, 厚度为4  $\mu$ m, 1张行HE染色, 由2名病理医师复核诊断, 余者行免疫组织化学双重染色。

**1.2 方法** 采用免疫组织化学双重染色。一抗分别为淋巴管内皮细胞特异性标记物Podoplanin和检测细胞增殖状态的抗体Ki-67, 分别购自Angiobio公司和北京中杉试剂公司。Histastain<sup>tm</sup>-DS双染试剂盒购自Zymed公司。染色步骤如下: 切片脱蜡, 梯度酒精水化, 使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性过氧化物酶, 微波修复抗原, 血清封闭, 加一抗(Podoplanin, 工作浓度为1:200), 加生物素化二抗, 加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, DAB显色, 显微镜下监控, 蒸馏水终止反应。加双染增强剂, 再次微波修复抗原, 血清封闭, 加第2种一抗(Ki-67, 工作浓度为1:100), 加生物素化二抗, 加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, AEC显色, 显微镜下监控, 自来水终止反应, 苏木素复染, 使用水溶性封片剂封片。以结肠癌切片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。Podoplanin染色阳性表达于微淋巴管, 以阳性着色的单个内皮细胞或内皮细胞簇计为1个阳性微淋巴管。参照Weidner<sup>[1]</sup>报道方法进行微淋巴管密度(LMVD)计数。在低倍镜下先选取胃癌癌周、癌内以及相应正常胃组织阳性染色微淋巴管最密集区即“热点”(hot spot), 然后在200倍视野下计数LMVD, 每例计数3个视野, 并求均值。微淋巴管被染为棕黄色, 而具有增殖活性的微淋巴管内皮细胞核及胃癌细胞核呈鲜红色。参考Wulff *et al*<sup>[2]</sup>报道的方法, 计数微淋巴管内皮细胞Ki-67指数。

**统计学处理** 所有实验数据均用mean $\pm$ SD表示, 经过SPSS10.0统计软件分析处理, 统计方法采用方差齐性检验, 两样本均数 $t$ 检验, 配对 $t$ 检验, 单因素方差分析,  $q$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,  $P<0.01$ 为差异有高度统计学意义。



表 1 胃组织内LMVD和LMV内皮细胞Ki-67指数比较 (mean ± SD)

组织	n	LMVD	内皮细胞 Ki-67指数
正常胃组织	12	6.93 ± 1.32	0
胃癌癌周	56	11.89 ± 3.95 <sup>ad</sup>	0.04 ± 0.02
胃癌癌内	56	5.83 ± 3.26	0 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 癌内.

## 2 结果

**2.1 胃组织中微淋巴管的特点** 正常胃组织Podoplanin阳性染色微淋巴管在黏膜固有层、黏膜下层、肌层及浆膜层均可见到, 在黏膜下层数目最多, 且多呈扩张状, 壁薄, 形态大小不一. 其LMVD为 $6.93 \pm 1.32$ . 胃癌组织中也可见到明确的Podoplanin阳性染色微淋巴管, 微淋巴管内未见红细胞, 少数微淋巴管内可见淋巴细胞(图1A). 有淋巴结转移的胃癌中可在微淋巴管内发现癌栓, 甚至在部分淋巴结无转移的胃癌微淋巴管内也发现癌栓(图1B). 在胃癌组织中, 癌周及癌内均有微淋巴管分布, 但其形态及分布有明显的异质性, 表现为: (1)分布的差异. 癌周微淋巴管数目多, 其LMVD为 $11.89 \pm 3.95$ , 而癌内微淋巴管数目少, 其LMVD为 $5.83 \pm 3.26$ , 两者差异具有极显著统计学意义( $P < 0.01$ ); (2)形态的差异: 癌周微淋巴管多扩张, 而癌内微淋巴管多为闭锁的条索状, 或呈狭长的裂隙状. 癌周、癌内LMVD与正常胃组织中相比, 差别分别具有和不具有显著性( $P < 0.05$ ,  $P > 0.05$ , 表1).

**2.2 胃组织微淋巴管内皮细胞增殖活性** Podoplanin和Ki-67双标染色显示, 胃癌淋巴管内皮细胞核呈不同程度的Ki-67表达, 而相应正常组织淋巴管内皮细胞无Ki-67表达. 56例胃癌癌周及癌内淋巴管内皮细胞Ki-67指数有极显著性差异( $P < 0.01$ ), 癌周与正常组织淋巴管内皮细胞Ki-67指数亦有极显著性差异( $P < 0.01$ , 表1).

**2.3 LMVD及微淋巴管内皮细胞Ki-67指数与临床病理特征间的关系** 胃癌癌周LMVD与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及淋巴管受累有关. 不同分化程度腺癌的癌周LMVD差别具有显著性, 高、中、低分化腺癌之间两两比较差别均有统计学意义( $P < 0.05$ ). 有淋巴结转移组癌周LMVD明显高于淋巴结无转移组癌周LMVD( $P < 0.01$ ). 淋巴管受累者(即淋巴管内出现癌栓或癌细胞团)癌周LMVD也显著高于淋巴管未

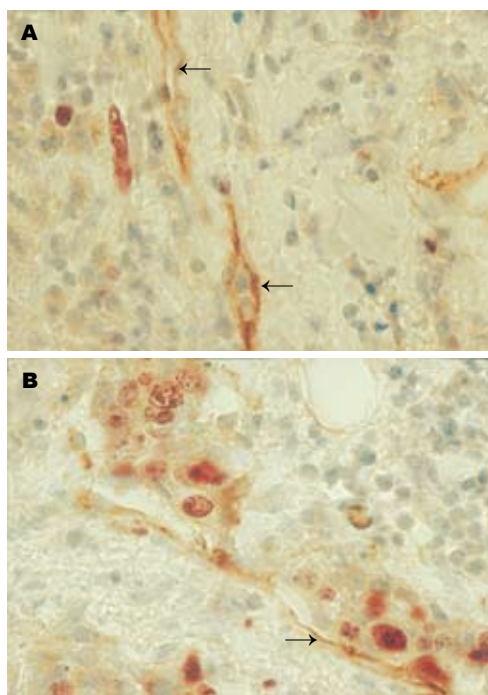


图 1 淋巴管的形态特点(Histastain<sup>TM</sup>-DS双染, ×400). A: 癌周边区; B: 淋巴管无转移的胃癌新生淋巴管内癌栓形成.

受累者( $P < 0.01$ ). 胃癌癌周LMVD与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、浸润深度、临床分期及病情进展情况均无关(均 $P > 0.05$ ). 胃癌癌周微淋巴管内皮细胞Ki-67指数仅与淋巴管受累有关, 在淋巴管受累组Ki-67指数明显高于未受累组( $P < 0.01$ ), 而与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、分化程度、临床分期、肿瘤浸润深度及淋巴结转移均无关(均 $P > 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

近年, 随着血管内皮生长因子C和D(VEGF-C和-D)的克隆成功及淋巴管内皮细胞特异性标记物(如Podoplanin, LYVE-1)的相继发现, 为肿瘤淋巴管生成研究提供了较为可靠的手段<sup>[3-5]</sup>, 淋巴管生成与肿瘤关系的研究报道也随之增多. 但是“肿瘤内是否存在淋巴管? 即使存在, 这些淋巴管究竟是残留还是新生?”等问题一直存在争议<sup>[6-8]</sup>. 由于Podoplanin是目前最为理想的淋巴管标志物<sup>[9-11]</sup>, 仅标记小的、由单层内皮衬托的微淋巴管<sup>[12-13]</sup>, 阳性表达主要在淋巴管内皮细胞的腔面<sup>[14]</sup>. 因此, 我们应用免疫组化双标法在胃癌中进行了相关探讨.

许多研究提示多种恶性肿瘤组织中具有新生淋巴管<sup>[15-17]</sup>. 我们的结果显示胃癌组织内也具有新生淋巴管, 且微淋巴管在分布及形态上均具有异质性. 其中癌周微淋巴管最丰富并且多

## ■创新盘点

本文采用免疫组织化学双重标记染色法, 应用Podoplanin标记微淋巴管, 用Ki-67检测微淋巴管内皮细胞的增殖活性, 对胃癌不同区域淋巴管生成的形态、数量及增殖状态进行系统研究, 并主要探讨与胃癌淋巴管受累及淋巴结转移的关系, 以期揭示出不同部位、不同状态的淋巴管在转移中的不同作用, 丰富了肿瘤淋巴管研究理论体系并对临床抗淋巴管生成治疗肿瘤、改善患者预后具有指导意义.

### ■应用要点

本研究的结果显示胃癌组织中新生淋巴管的分布特点不一致,主要存在于癌周,癌周微淋巴管密度与肿瘤的分化程度、淋巴结转移以及淋巴管受累相关,而癌周微淋巴管内皮细胞增殖指数也与淋巴管受累相关。因此,检测癌周微淋巴管密度及癌周微淋巴管内皮细胞增殖指数是预测胃癌淋巴管受累和淋巴结转移的重要参考指标,为临床抑制淋巴管生成预防淋巴道转移提供了理论依据。

表 2 胃癌癌周LMVD、淋巴管内皮细胞Ki-67指数与临床病理特征之间的关系

	<i>n</i>	LMVD	内皮细胞 Ki-67指数
年龄			
>58岁	21	10.90 ± 3.98	0.04 ± 0.02
<58岁	35	12.47 ± 3.99	0.04 ± 0.03
性别			
男	31	12.24 ± 4.75	0.04 ± 0.03
女	25	11.42 ± 2.74	0.04 ± 0.01
分化程度			
高	8	6.5 ± 0.71	0.02 ± 0.01
中	20	10.81 ± 1.96 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01
低	28	13.73 ± 4.18	0.05 ± 0.03
PTNM分期			
I + II	35	11.37 ± 3.15	0.04 ± 0.03
III + IV	21	12.79 ± 5.21	0.04 ± 0.01
浸润深度			
黏膜及黏膜下	6	7.84 ± 2.6	0.02 ± 0.01
肌层	18	11.33 ± 2.48	0.03 ± 0.02
浆膜及浆膜外	32	12.94 ± 4.43	0.05 ± 0.03
进展			
早期胃癌	6	7.84 ± 2.6	0.02 ± 0.01
中晚期胃癌	50	10.43 ± 3.85	0.03 ± 0.02
淋巴结转移			
有	27	12.83 ± 4.53 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.01
无	29	8.05 ± 3.37	0.04 ± 0.03
淋巴管受累			
有	35	15.46 ± 5.13 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.04 <sup>b</sup>
无	21	10.94 ± 3.14	0.03 ± 0.02
肿瘤直径			
≥4 cm	24	12.56 ± 2.66	0.05 ± 0.03
<4 cm	32	11.59 ± 4.49	0.04 ± 0.02

<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01.

扩张,而癌内微淋巴管较稀疏,且多呈闭锁状或呈狭长裂隙状。进一步检测这些微淋巴管内皮细胞核的增殖活性,发现胃癌组织中癌周微淋巴管内皮细胞Ki-67表达较癌内显著增强,较正常胃组织亦显著增强。胃癌癌周微淋巴管内皮细胞Ki-67表达增强支持胃癌中存在新生淋巴管,且以癌周区生成为显著。

“癌是通过原有的淋巴管还是通过新生的淋巴管进行转移?”尚存争议<sup>[18-19]</sup>。肿瘤淋巴管生成是指在肿瘤原位形成新的毛细淋巴管<sup>[20-21]</sup>。由于肿瘤新生淋巴管结构特殊<sup>[22-23]</sup>,使得肿瘤细胞便于进入淋巴管道形成转移。这主要与分布在肿瘤组织周边的功能性淋巴管有关<sup>[24-25]</sup>。我们的研究结果表明在胃癌癌内新生的淋巴管较

稀疏,而在癌周存在新生淋巴管,并且其数量及其内皮细胞增殖活性均与淋巴管受累有关,这说明癌细胞易于侵入癌周新生的淋巴管形成癌栓,从而为其转移打下基础。结果亦显示微淋巴管数目与淋巴结转移有关,而淋巴管内皮细胞Ki-67指数与淋巴结转移无关,但与淋巴管受累有关,这是由于肿瘤新生淋巴管虽然是淋巴道转移所必需的条件之一,但是仅有淋巴管生成尚不足以导致淋巴结转移,He *et al*<sup>[26]</sup>发现高表达VEGF-C的人肺癌N15细胞可诱导癌周淋巴管生成,但并不增加局部淋巴结转移。另外一个原因可能是即使淋巴结已有肿瘤转移,但常规病理HE切片并未发现所导致,尤其是当淋巴结发生微转移时<sup>[27]</sup>。

有研究发现LMVD的水平增高与多种肿瘤细胞的分化程度、PTNM分期及淋巴结转移有关<sup>[28-30]</sup>。我们的结果显示胃癌癌周微淋巴管密度与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及淋巴管受累相关。肿瘤的分化程度越低,其癌周微淋巴管密度越高。提示分化程度越低的肿瘤细胞可以产生越多的促淋巴管生成因子,从而导致癌周微淋巴管密度升高。癌周微淋巴管越丰富,与肿瘤细胞接触的机会就越多,形成淋巴管道转移的机会就越多一些<sup>[31]</sup>。通过本次研究,我们认为胃癌存在新生淋巴管,且多分布于癌周,并且他是促进胃癌发生淋巴道转移的主要通道;胃癌癌周微淋巴管密度这一指标对评价胃癌的分化程度、淋巴结转移及淋巴管受累是一有价值的指标。随着研究微淋巴管生成的新技术、新方法的出现<sup>[32-33]</sup>,相信人们可以在将来针对性地抑制胃癌癌周微淋巴管的产生,从而减少胃癌淋巴结转移的机率。

### 4 参考文献

- Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 302-313
- Wulff C, Dickson SE, Duncan WC, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod* 2001; 16: 2515-2524
- 黄漾, 张国锋. 结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 207-211
- Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1092-1100
- Cardones AR, Leitner WW, Fang L, Murakami



- T, Kapoor V, Udey MC, Hwang ST. Genetic immunization with LYVE-1 cDNA yields function-blocking antibodies against native protein. *Microvasc Res* 2006; 71: 32-39
- 6 Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7344-7353
- 7 Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehrotra S, Badve S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1449-1455
- 8 胡承杰, 韩德民, 于振坤, 李颖, 范尔钟, 韩一丁, 张盛忠. 喉鳞癌瘤内微血管及微淋巴管形态计量研究及临床意义. 耳鼻咽喉-头颈外科 2003; 10: 43-45
- 9 阎晓初, 于冬梅, 柳凤轩. 肿瘤淋巴管生成与肿瘤转移研究进展. 中华病理学杂志 2005; 34: 370-372
- 10 Cimpean AM, Raica M, Izvernariu DA, Tatucu D. Lymphatic vessels identified with podoplanin. Comparison of immunostaining with three different detection systems. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48: 139-143
- 11 Chilosi M, Doglioni C, Dei Tos AP. New diagnostic markers: podoplanin-d2-40. *Pathologica* 2005; 97: 158-159
- 12 Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, Nomiya T, Miyagawa S, Ohhashi T, Nakayama J. Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Lett* 2007; 246: 167-172
- 13 Nisato RE, Harrison JA, Buser R, Orci L, Rinsch C, Montesano R, Dupraz P, Pepper MS. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *Am J Pathol* 2004; 165: 11-24
- 14 Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Tech* 2003; 60: 171-180
- 15 Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1315-1320
- 16 Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, Orlando A, Bates DO. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 693-700
- 17 牟江洪, 阎晓初, 李增鹏, 王东, 段光杰, 向德兵, 肖华亮, 张沁宏. 结直肠癌淋巴管生成的特点及其临床病理意义. 中华病理学杂志 2005; 34: 348-352
- 18 Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Kakudo K. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 77-82
- 19 Hinojar-Gutierrez A, Fernandez-Contreras ME, Gonzalez-Gonzalez R, Fernandez-Luque MJ, Hinojar-Arzadun A, Quintanilla M, Gamallo C. Intratumoral lymphatic vessels and VEGF-C expression are predictive factors of lymph node relapse in T1-T4 N0 laryngopharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 248-257
- 20 李建军, 梁后杰. 肿瘤淋巴管生成与抗淋巴管生成治疗研究进展. 中国肺癌杂志 2005; 8: 70-73
- 21 Van der Auwera I, Colpaert C, Van Marck E, Vermeulen P, Dirix L. Lymphangiogenesis in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1055-1056; author reply 1056-1057
- 22 Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 677-694
- 23 Blacker HA, Tsopelas C, Orgeig S, Daniels CB, Chatterton BE. How regenerating lymphatics function: lessons from lizard tails. *Anat Rec (Hoboken)* 2007; 290: 108-114
- 24 Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886
- 25 Padera TP, Boucher Y, Jain RK. Correspondence re: S. Maula et al., intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.*, 63: 1920-1926, 2003. *Cancer Res* 2003; 63: 8555-8556; author reply 8558
- 26 He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 819-825
- 27 Matsumoto M, Natsugoe S, Okumura H, Arima H, Yanagita S, Uchikado Y, Yokomakura N, Setoyama T, Ishigami S, Takao S, Aikou T. Overexpression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymph node micrometastasis in submucosal esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 1016-1022
- 28 Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 2351-2355
- 29 彭正银, 肖同浩, 陈寿松. 非小细胞肺癌周微淋巴管密度的检测及其临床意义. 实用医技杂志 2005; 12: 9-11
- 30 谢志坚, 杨晓峰, 范俊, 张银凯, 吴求亮, 谷志远. 口腔鳞癌周淋巴管生成与颈淋巴结微转移. 中华口腔医学杂志 2004; 39: 221-223
- 31 Jia YT, Li ZX, He YT, Liang W, Yang HC, Ma HJ. Expression of vascular endothelial growth factor-C and the relationship between lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3261-3263
- 32 李锐, 高善玲. 消化道恶性肿瘤淋巴管生成的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 894-899
- 33 Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5018-5022

# 同行评价

本文探讨了胃癌中微淋巴管的生成特点及与临床病理特征之间的关系, 立题有一定的创新性, 论文数据较可靠, 结果较可信, 有一定的理论意义和临床指导价值。

编辑 何燕 电编 何基才

# 北京地区乙肝病毒S基因序列多态性及其分布

王继荣, 周莉, 赵洪斌, 季芬, 丁惠国, 曾长青

## ■背景资料

S基因编码HBV表面抗原,也是病毒基因组中突变率最高的区域,其变异对于乙型肝炎的准确诊断和抗病毒疗效有重要影响。对于HBV这种高突变率的病毒进行深入全面的序列分析有赖于多种生物信息学方法的建立和应用。本文着重S基因的多态性分析,旨在阐明病毒S基因的突变特点、分布特征及其与临床表型的关系。

王继荣, 赵洪斌, 季芬, 中国科学院北京基因组研究所 北京市 101300; 中国科学院研究生院 北京市 100049  
曾长青, 中国科学院北京基因组研究所 北京市 101300  
周莉, 丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科 北京市 100069  
王继荣, 2005年内蒙古大学生命科学学院毕业, 2005至今中国科学院研究生院硕士研究生, 主要从事乙型肝炎病毒基因组突变及其临床关系研究。  
中国科学院知识创新工程重大项目, No. KSCX2-SW-207  
北京市教育委员会基金项目, No. KM20070025024  
通讯作者: 曾长青, 101300, 北京市北京顺义空港工业区B区6号楼, 中国科学院北京基因组研究所。czeng@genomics.org.cn  
电话: 010-80481146 传真: 010-80498676  
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-08-12

## Sequence polymorphism in the surface gene of hepatitis B virus and its distribution in the Beijing area

Ji-Rong Wang, Li Zhou, Hong-Bin Zhao, Fen Ji, Hui-Guo Ding, Chang-Qing Zeng

Ji-Rong Wang, Hong-Bin Zhao, Fen Ji, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China; Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China  
Chang-Qing Zeng, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China  
Li Zhou, Hui-Guo Ding, Department of Digestive Diseases, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China  
Supported by: the Knowledge Innovation Program (KIP), Important Project of the Chinese Academy of Sciences, No. KSCX2-SW-207 and the Foundation of Beijing Municipal Education Commission, No. KM20070025024  
Correspondence to: Chang-Qing Zeng, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing Airport Industrial Zone B-6, Shunyi, Beijing 101300, China. czeng@genomics.org.cn  
Received: 2007-07-12 Revised: 2007-08-12

## Abstract

**AIM:** To investigate the sequence polymorphism of the surface (S) gene of hepatitis B virus (HBV), to study the distribution of viral genotypes/serum subtypes circulating in the Beijing area, and to search for possible correlations between viral genotypes/serum subtypes and clinical conditions.

**METHODS:** HBV DNA samples from 69 patients from the Beijing area were isolated and purified.

The viral S gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then directly sequenced. Genotypes and serum subtypes were determined by sequence alignment and comparison with the standards with MEGA3.1. Nucleotide polymorphisms and amino acid changes of the S gene were analyzed using DnaSP software.

**RESULTS:** In the 69 patients, HBV from 14 samples was identified as genotype B (20.3%), and that of the remaining 55 as genotype C (79.7%). Adrq<sup>+</sup> and adw2 of HBV were the predominant subtypes (75.4% and 20.3%, respectively). Further, 1 sample was determined as adrq<sup>-</sup> and 2 were detected as a previously unreported subtype. Mutation type showed significant differences in hydrophilic and hydrophobic regions of the S gene ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ , respectively, in genotypes C and B). Compared to genotype B, higher sequence polymorphism was observed in genotype C. Nucleotide variation ( $\pi$  value) was not equally distributed in the S gene, and  $\pi$  in the "a" determinant was lower than that in other regions. Clinical symptoms were significantly associated with genotypes B and C, but not with serum subtypes ( $P < 0.05$  and  $P = 0.381$ , respectively).

**CONCLUSION:** There is higher sequence variation of the surface gene in genotype C compared with genotype B. Mutations in the S gene are not randomly distributed. The two hydrophilic regions appear more conserved, while mutation frequency in the hydrophobic region is higher.

**Key Words:** Hepatitis B Virus; S Gene; Polymorphism; Genotype; Serum subtype; Polymerase chain reaction

Wang JR, Zhou L, Zhao HB, Ji F, Ding HG, Zeng CQ. Sequence polymorphism in the surface gene of hepatitis B virus and its distribution in the Beijing area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2496-2502

## 摘要

**目的:** 探讨HBV的S基因序列多态性、基因型/血清型在北京地区的分布特征以及基因型/血

清型与临床症状的可能相关性。

**方法:** 对69例样品进行S区聚合酶链反应扩增测序, 通过标准序列使用MEGA3.1和DnaSP软件分析核苷酸差异度, 比较基因型、血清亚型的核酸及蛋白质差异。

**结果:** 在69例北京地区样品中检测出C基因型55例(79.7%), B基因型14例(20.3%); adr<sup>q</sup><sup>+</sup>和adw2分别为52和14例, 2例血清亚型未见报道。S基因核苷酸差异度分布不均匀, 在C型中较高。非同义突变类型多分布在疏水区中, 亲水区多为同义突变。临床症状在B, C基因型中有显著性差异。

**结论:** S基因的序列差异在C型中高于B型; DNA序列突变在S基因中呈非随机分布, 疏水区突变率高而两个亲水区比较保守。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; S基因; 多态性; 基因型; 血清型; 聚合酶链反应

王继荣, 周莉, 赵洪斌, 季芬, 丁惠国, 曾长青. 北京地区乙肝病毒S基因序列多态性及其分布. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2496-2502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2496.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是已知的突变率最高的DNA病毒, 了解HBV的多态性对乙型肝炎的诊断和治疗以及基础研究具有十分重要的意义, 对其变异及其与临床关系的研究一直是国内外关注的热点。病毒的高突变率和核苷酸多态性形成HBV的不同基因型, 以全基因序列差异 $\geq 8\%$ 或S基因序列差异 $\geq 4\%$ 划分, 共有A-H的8个基因型<sup>[1-4]</sup>, 各在不同的地理区域性呈优势分布。HBV基因型与乙型肝炎病毒复制及致病性、宿主免疫应答和临床表现、治疗与预后等都有一定的相关性<sup>[5-6]</sup>。此外, HBV分类还包括血清型分析。外膜主蛋白上的一些残基(如aa139-147, aa122和aa160)决定HBV的血清亚型, 目前有ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, ayr, adr<sup>q</sup><sup>+</sup>和adr<sup>q</sup><sup>-</sup>共9种类型<sup>[7]</sup>, 在不同的临床表型中有不同分布。

编码HBV表面蛋白的S基因(surface)位于HBV基因组的核苷酸(nt)第155-833, 编码226个氨基酸残基的外膜主蛋白即乙肝表面抗原蛋白HBsAg。这一蛋白不但是引起机体产生保护性抗体的主要成分和乙肝疫苗的主要成份, 也是

诊断HBV感染的主要依据之一。S基因是HBV基因组中突变率最高的区域, 病毒这一区域在体内产生的变异对于乙型肝炎的准确诊断和抗病毒的疗效产生严重影响, 因而从DNA水平研究其突变的性质、特点、规律和功能具有重要意义和迫切性。我们采用PCR产物直接测序方法, 对HBV的S基因的678 bp片段进行大样品量测序和多态性分析, 同时应用生物信息学方法分析北京地区HBV的基因型/血清型分布及其与临床表型的关系。我们发现对于S基因来说, C型基因型的序列差异高于B型, 并且基因疏水区突变率明显高于亲水区。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 北京佑安医院住院患者69例, 患者均为HBsAg阳性, 男50例, 女19例; 年龄7-77岁; 临床诊断无症状携带者4例; 慢性肝炎37例; 慢性重型肝炎4例; 代偿期肝硬化2例; 失代偿期肝硬化18例; 肝癌4例。诊断均符合2005年中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会联合制定的《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准<sup>[8]</sup>。所有血清置-20℃保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒DNA的提取及扩增, 纯化** 采用QIAamp UltraSens™ Virus kit(Qiagen公司)提取病毒DNA。对病毒S基因进行PCR扩增, 引物: 5'-CTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCC-3' (nt67-90), 5'-AGTTGGCGAGAAAGTGAAAGCCTG-3' (nt1084-1107), 扩增条件95℃ 150 s, 94℃ 1 min, 60℃ 90 s, 72℃ 3 min共35循环, 72℃ 10 min。PCR扩增产物经含有EB的15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定产物, 并加入GIAquick纯化柱进行纯化。纯化产物用于测序反应。

**1.2.2 S基因测序及序列拼接和生物信息学分析** 使用ABI 3730进行测序及DNASTar软件包的SeqMan进行拼接处理。生物信息学分析: (1)首先从DNA数据库中(GenBank)获取已知基因型(A-H)的HBV病毒参考株的核苷酸序列; (2)将获取的病毒序列以Bioedit软件建立数据库, 以便进行单机序列比对; (3)将我们测序得到的序列和上述数据库中的序列用Bioedit软件包中的Local Blast程序进行比对; (4)将相应的片段用Clustal W程序联配, 同时肉眼观察并予以校正; (5)使用MEGA3.1程序的Kimura双参数法, 应用NJ(Neighbor-Joining)法建立系统进化树(bootstrap 1000次)及分析基因型; (6)用DnaSP软件分

## ■研发前沿

HBV研究主要在于分析病毒的突变规律、与药物耐受和免疫逃逸的相关性、及其与临床治疗的指导评估和病程转归的关系, 以期产生进行精确临床诊断和指导个体化治疗的基础数据。在方法学上, 基因组学研究的各种先进思路和算法的引入和应用正在为HBV突变分析提供重要的技术和手段。

## ■相关报道

田拥军 *et al* 报道定点突变S基因氨基酸并构建载体转染肝细胞, 发现主要亲水区II中的4个氨基酸(P120T, C121S, K122I和T123N)对维持HBsAg的空间构象和抗原性具有重要作用; CHAO-WEI HSU *et al* 发现在核苷类似物药物治疗患者血清HBsAg消失是由于S基因点突变造成。

## ■创新盘点

本文用直接测序的方法精密鉴定了HBV的基因型,采用多种生物信息学方法从S基因的整体核苷酸差异度水平深入分析了病毒S基因特点,并将病毒的基因型和突变特点与临床表型进行了关联分析,对于乙型肝炎的分子病理学的诊断提供了基础数据,并有助于我国特有HBV序列数据库的建立。

表 1 不同地区基因型和血清型的分布

地区	基因型	基因型百分比	血清亚型	血清亚型百分比
北京(本研究)	B	20.3	adw2	17.4
			new	2.9
	C	79.7	adrq <sup>+</sup>	75.4
			adw2	2.9
中国(4个省) <sup>[9]</sup>	B	29.3	adrq <sup>-</sup>	1.4
			adw2 <sup>p</sup>	29.3
	C	67.9	adr <sup>p</sup>	67.9
			adw2 <sup>p</sup>	2.9
哈尔滨 <sup>[10]</sup>	B	12.2	adw2 <sup>p</sup>	12.2
	C	87.8	adr <sup>p</sup>	87.8
廉江 <sup>[10]</sup>	B	26.1	adw2 <sup>p</sup>	26.1
	C	73.2	adr <sup>p</sup>	73.2

<sup>p</sup> 优势血清型。

析核苷酸差异及蛋白质差异。

1.2.3 聚合酶链反应-限制性酶长度多态性(PCR-RFLP)分析 应用ABI7000 Real-time PCR检测仪进行基因型分析,并与S基因直接测序结果对比,HBV基因分型试剂盒购自杭州博赛基因诊断技术有限公司。采用Magnius和Norder的方法<sup>[7]</sup>进行血清亚型分析。核苷酸差异度为群体中针对基因组中特定区域的任意两个随机选取的单体型间每个位点的平均核苷酸差异数,用 $\pi$ 表示<sup>[11-12]</sup>。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行Fisher精确检验及 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

2.1 HBV基因型与血清型在北京地区的分布 将测定的全部69例乙肝患者的病毒S基因序列与NCBI中的8种已知基因型的参考序列进行比较,确定样品DNA的基因型并进行系统进化分析(图1),共有C基因型55例(79.7%),B基因型14例(20.3%),未发现其他基因型。且北京地区基因型分布处于中国大陆两个南北城市黑龙江哈尔滨市和广东廉江市中间(表1)。这一结果符合我国北方多流行C型,在南方多流行B型的特点。

采用Magnius和Norder的方法进行血清亚型分析,测得adrq<sup>+</sup> 52例(75.4%),adw2 14例(20.3%),血清亚型adrq<sup>-</sup> 1例(1.4%)。用同样方法确定血清亚型w1-w4的S基因的编码蛋白质第127个氨基酸分别是脯氨酸(Pro, w1和w2)、苏氨酸(Thr, w3)或亮氨酸(Leu, w4),但第6和55两个样本中

表 2 3种类型突变在S基因不同区域中的分布(n)

基因型	第一亲水区		第二亲水区		疏水区	
	B型	C型	B型	C型	B型	C型
错义突变	6	32	2	21	44	128
无义突变	0	2	0	2	0	3
同义突变	6	65	88	41	30	366
总数	12	99	90	64	74	497

此位点是丝氨酸(Ser),因而不能由此确定其血清亚型,表明可能是对亚型w的补充或是一种新的血清亚型,在此用new来标示。52例adrq<sup>+</sup>血清亚型样本全部为C基因型,与adr血清亚型只存在C型中完全符合;14例adw2血清亚型样本中有12例B基因型,2例C基因型;adrq<sup>+</sup>和adw2血清亚型分别与C, B基因型的相关性显著( $P < 0.05$ , Fisher精确检验)。

2.2 S基因的序列差异 对乙肝病毒S基因的核苷酸差异度进行分析(图2),发现S基因核苷酸序列中 $\pi$ 值分布在B, C基因型中很不均匀。除nt60-120, nt340-390和nt580-680区序列外,大部分区域C型 $\pi$ 值高于B型,即S基因C型序列差异高于B型。对于单个基因型来说, B型中第一亲水区和第二亲水区后半部分内的 $\pi$ 值低于其他区域; C型中第一亲水区前半部分和第二亲水区后半部分内 $\pi$ 值低于其他区。核苷酸差异度 $\pi = \sum_{i,j} A_i B_j P_{ij}$ , 其 $A_i$ 和 $B_j$ 分别为DNA序列的第 $i$ 种和第 $j$ 种类型的频率,而 $P_{ij}$ 是序列的第 $i$ 种和第 $j$ 种类型间不同核苷酸的比值。

2.3 S基因疏水区突变率明显高于亲水区 将所有样品C和B基因型的S基因序列与NCBI数据库中的参考序列M12906(C/adrq<sup>+</sup>)和D00329 (B/adw2)分别进行比较,发现B型中非同义突变(错义和无义突变)在S基因第一亲水区、第二亲水区和疏水区中的总数分别是6, 2和44个, C型中分别是34, 23和131个(表2)。B基因型中突变类型在第一亲水区和疏水区中无显著性差异( $P = 0.538$ ,  $\chi^2$ 检验),但第二亲水区和疏水区中有显著性差异( $P < 0.001$ , Fisher精确检验),在第二亲水区中的同义突变多于疏水区中的同义突变,而突变类型在两个亲水区和疏水区中有显著性差异( $P < 0.001$ ,  $\chi^2$ 检验)。在C基因型突变类型第一亲水区和疏水区、第二亲水区和疏水区中的差别分布无显著性意义( $P = 0.105$ 和 $P = 0.106$ ,  $\chi^2$ 检验),而两个亲水区和疏水区中有显著性差异( $P < 0.035$ ,  $\chi^2$ 检验)。因此S基因大部分突变分布在

图 1 HBV基因分型.



## ■应用要点

HBV的S基因突变具有非随机性, 其疏水区突变率明显高于亲水区. 同时C型基因型的S基因序列差异高于B型, 这一结果对于乙型肝炎诊断、治疗及其研发乙肝疫苗具有应用价值.

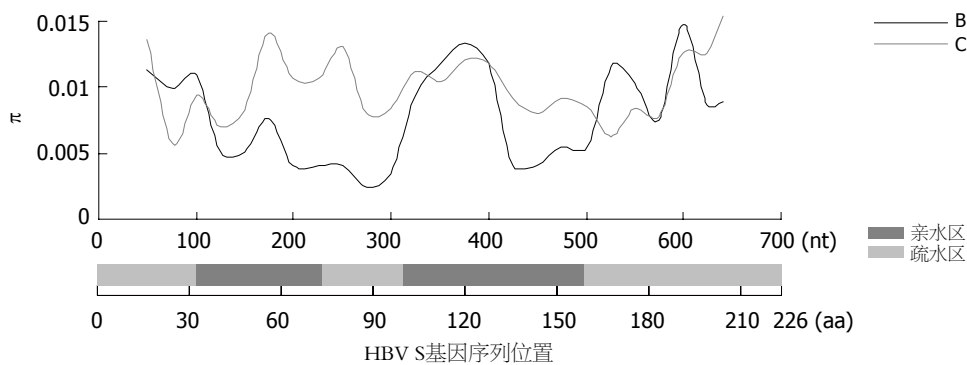


图 2 HBV S基因核苷酸差异度的比较分析. Nt: 核苷酸位置; aa: 氨基酸位置.

疏水区中, 亲水区很少发生突变, 且亲水区突变 大部分为同义突变. 同义突变、无义突变和错



### ■名词解释

核苷酸差异度: 群体中针对基因组中特定区域的任意2个随机选取的单体型间每个位点的平均核苷酸差异数称为核苷酸差异度, 用 $\pi$ 表示。

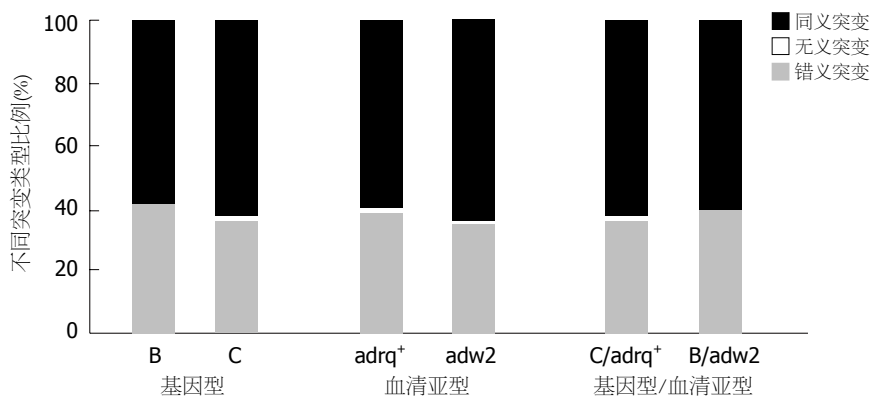


图3 HBV基因型/血清亚型中不同突变类型的比例。

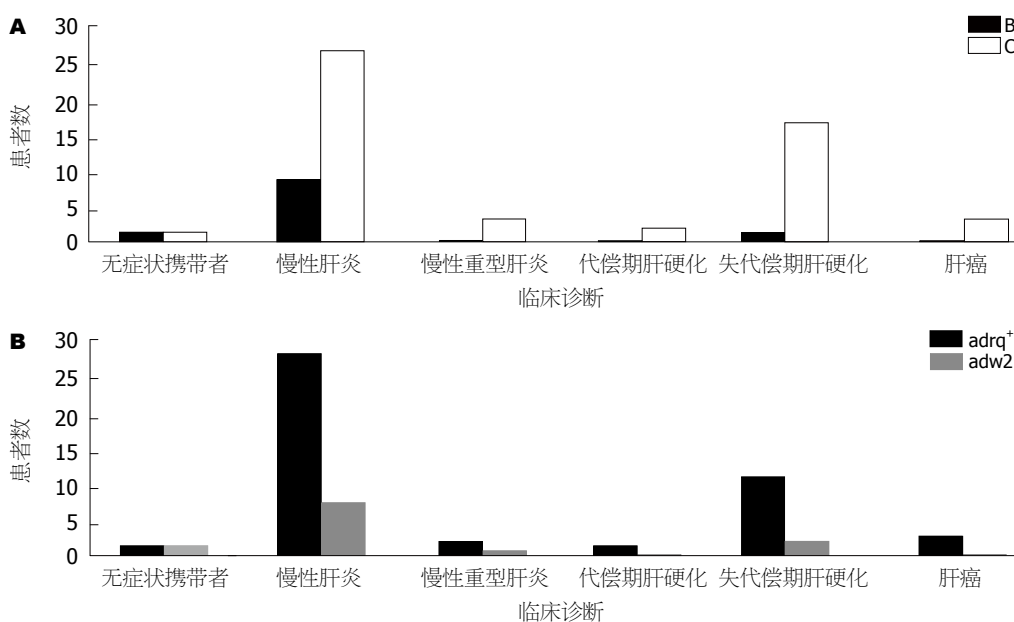


图4 不同诊断患者的基因型和血清亚型的分布。A: 基因型; B: 血清亚型。

义突变在不同基因型和血清亚型中分布(图3)所示, 无义突变只在C基因型中发现而未在B基因型见到。无义突变在基因型B和C型中分布无显著性差异( $P = 0.337$ , Fisher精确检验)。同义突变和非同义突变在B, C基因型, adrq<sup>+</sup>, adw2血清亚型和C/adrq<sup>+</sup>, B/adw2型中的分布的差别无显著性意义( $P = 0.554, 0.234, 0.782; \chi^2$ 检验)。

**2.4 HBV基因型、血清型与临床关系** B基因型中分别有2例无症状携带者、10例慢性肝炎、2例失代偿期肝硬化; C基因型分别中有2例无症状携带者、27例慢性肝炎、4例慢性重型肝炎、2例代偿期肝硬化、16例失代偿期肝硬化和4例肝癌(图4A)。按照肝病的进展, 将肝脏病变和临床症状较重的病例包括慢性重型肝炎、代偿期肝硬化, 失代偿期肝硬化和肝癌患者归为1组, 其余归为另1组。对比2组患者基因型发现症状较重的肝病在C基因型患者中出现频率

高( $P < 0.05$ , Fisher精确检验)。adrq<sup>+</sup>血清亚型在无症状携带者、慢性肝炎、慢性重型肝炎、代偿期肝硬化、失代偿期肝硬化、肝癌中分别占50.0%, 75.7%, 75.0%, 100%, 72.2%和100%, 而adw2血清亚型分别为50.0%, 21.6%, 25.0%, 0%, 16.7%和0%(图4B), 1例adrq<sup>+</sup>血清亚型为失代偿期肝硬化患者, 2例new血清亚型为慢性肝炎和失代偿期肝硬化患者。adrq<sup>+</sup>和adw2血清亚型在症状较轻患者和症状较重患者中分布的差别无显著性意义( $P = 0.381$ , Fisher精确检验)。

### 3 讨论

HBV基因型具有呈地理区域性分布的特点<sup>[13-15]</sup>, 我国以C, B基因型为主, 在北方流行多为C型, 南方多流行B型, 呈B型由北向南逐渐增多, 而C型逐渐减少的趋势<sup>[9]</sup>。我们采用S基因序列测序直接分型, 确定北京地区HBV以C基因型约占80%,



其余为B基因型. 表1综合了本实验和文献报道结果, 显示北京地区HBV基因型分布处于两个南北城市中间(黑龙江哈尔滨市和广东廉江市), 与文献报道相符<sup>[9-10,16-17]</sup>. 我们的研究中患者临床症状在B, C基因型中有显著性差异( $P<0.05$ ), 和B型相比C型与症状较重的肝炎相关, 结果与国内外文献[17-18]报道一致, 其机制有待进一步研究.

已有结果表明, 中国北方地区HBV血清型以adr为主, 南方则以adw2为主<sup>[19]</sup>, 本研究中发现北京地区adrq<sup>+</sup>和adw2各占75.4%和20.3%. 我们还在2例样品中发现了一种无法用Magnius和Norder的方法确定的血清亚型, 由S基因nt379CCT突变为TCT而使S蛋白第127的Pro变为Ser造成. 这2例为B基因型的慢性肝炎和失代偿期肝硬化患者. 这一亚型是新的血清亚型或对其他亚型的补充及其与患者临床症状的关系有待进一步研究. HBV的血清型除了流行病学意义外, 在乙肝患者不同诊断中的分布不一样, 如慢性肝病以adr亚型比率最高<sup>[20]</sup>. 本研究中血清亚型在不同临床患者中的分布与他人结果基本一致, 且与临床症状无相关性.

乙肝病毒S基因编码病毒外膜主要表面蛋白, 在HBV感染与传播中起重要作用. S蛋白有2个亲水区, 分别为aa32-76和aa100-160, 是HBV主要的表面抗原表位. 许多研究表明S基因多态性与HBV抗原决定簇、免疫原性和免疫逃避等有关<sup>[21-23]</sup>. 本研究中发现S基因有很多核苷酸突变位点, 但其分布在S基因中并非随机. B和C基因型中的亲水区特别是第二亲水区后半部分内的 $\pi$ 值均低于其他区域, 而这一部分为编码a决定簇. 同时, 不但疏水区中的突变率明显高于亲水区, 且亲水区中的突变多为同义突变, 这些均提示病毒S基因的功能区域相对保守. S基因 $\pi$ 值分布不均匀, 即本研究表明北京地区C型S基因的多态性高于B型, 而有研究表明B型HBV多态性高于C型<sup>[24]</sup>, 这可能是样本抽样数量不同造成的结果.

我们的结果显示B基因型在第二亲水区中的同义突变较多, 很可能是由于我们样品中的14个B型序列nt354, nt428和nt432 3个位点的核苷酸全部不同于参考序列D00329而造成. 而参考序列D00329是NCBI报道的日本患者血清HBV的序列, 鉴于日本B型HBV以Bj亚型为主, 而中国地区B型HBV主要流行Ba亚型<sup>[24]</sup>, 因此这3个位点可能反映中国地区Ba亚型HBV的特异

相关位点.

HBV基因分型的方法有全基因序列测定<sup>[25]</sup>, S基因序列测定、聚合酶链反应-限制性酶长度多态性分析(PCR-RFLP)<sup>[26]</sup>、基因型特异性引物PCR<sup>[27]</sup>等很多种方法. 近年来, 基因型分型多采用对S区进行分析, 主要为PCR-RFLP及基因型特异性引物PCR方法. 本研究比较了直接S基因测序后与参考株比较的基因分型方法和PCR-RFLP基因分型方法, 并着重比较了RFLP中常用的限制性内切酶Bsr I 和Sty I 的特异性酶切位点. B基因型病毒株在S基因nt174处有Bsr I 的酶切位点. 识别序列为C▼CAGT可被分解成为126和459 bp 2个片段, 依此可准确鉴定B型; C基因型病毒株在S基因nt301位有Sty I 的酶切位点, 识别序列为C▼CAAGG, 应分解为332和253 bp 2个片段. 我们的结果发现基因型为B的14株病毒S基因有Bsr I 并且无Sty I 酶切位点, 55例C型无Bsr I 酶切位点; 而基因型为C的55例患者中48株病毒有Sty I 位点, 其余7株(12.7%)此处有突变而破坏了内切酶识别, 从而使PCR-RFLP基因分型实验失败或分型不准确. 这些表明由于HBV的高突变率, 仅依赖个别位点进行基因分型并不可靠, PCR-RFLP基因分型方法存在一定局限性.

**致谢:** 感谢庄辉院士和王福生博士的讨论指导, 感谢李志杰对于课题立项的帮助.

#### 4 参考文献

- 1 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- 2 Norder H, Courouge AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 3 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 4 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- 5 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 6 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*

#### ■同行评价

本文研究了北京地区HBV核苷酸多态性和突变, 并与国内其他地区的研究进行比较, 对结果进行了针对性的讨论. 所采用的技术先进, 内容新颖, 科学性强, 讨论较充分全面, 有较重要的参考价值.

- 2000; 118: 554-559
- 7 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
- 8 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 9 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 娄国强, 马廷贤. 我国8城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. 中华微生物学和免疫学杂志 1998; 18: 88-91
- 10 Xu J, Wang QX, Fan CL, Jiang D, Li RB, Cong X, Fei R, Chen HS, Wei L, Wang Y. Comparison of hepatitis B virus serotype and genotype among HBsAg positive hepatitis B patients in a northern and a southern city of China. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2003; 17: 327-329
- 11 Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; 19: 2496-2497
- 12 Nei M, Miller JC. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 1990; 125: 873-879
- 13 Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002; 76: 6131-6137
- 14 Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol* 2004; 41: 139-146
- 15 Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutrelaigne J, Yuan HJ, Wong DK, Sum SM, Lai CL. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* 2004; 41: 119-125
- 16 Xia G, Nainan OV, Jia Z. Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2001; 22: 348-351
- 17 Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47
- 18 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Miyagi Y. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002; 67: 484-489
- 19 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 41-55
- 20 赵艳芳, 闫永平, 张磊, 王安辉, 苏海霞, 门可, 张景霞, 徐德忠. Adr亚型乙型肝炎病毒转染细胞模型的构建. 中国公共卫生 2006; 22: 1066-1068
- 21 He JW, Lu Q, Zhu QR, Duan SC, Wen YM. Mutations in the 'a' determinant of hepatitis B surface antigen among Chinese infants receiving active postexposure hepatitis B immunization. *Vaccine* 1998; 16: 170-173
- 22 Mele A, Tancredi F, Romano L, Giuseppone A, Colucci M, Sangiuolo A, Lecce R, Adamo B, Tosti ME, Taliani G, Zanetti AR. Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers in Italy. *J Infect Dis* 2001; 184: 905-908
- 23 Chen WN, Oon CJ. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants in Singapore adults and vaccinated children with high anti-hepatitis B virus antibody levels but negative for HBsAg. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2793-2794
- 24 Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309
- 25 游晶, 庄林, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 921-928
- 26 Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL. A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3132-3136
- 27 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292

编辑 程剑侠 电编 张敏

# HIF-1 $\alpha$ 及耐药蛋白在胰腺癌中的表达及相关性分析

孙晶, 曹俊, 江弢, 张放, 黄陈, 裘正军

孙晶, 曹俊, 江弢, 张放, 黄陈, 裘正军, 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海市 200080  
孙晶, 上海交通大学附属第一人民医院普外科住院医师, 主要从事消化道肿瘤分子生物学研究。  
上海市卫生局科技发展基金项目, No. 024012  
通讯作者: 裘正军, 200080, 上海市海宁路100号, 上海交通大学附属第一人民医院普外科. qiuwryb@online.sh.cn  
电话: 021-63240090-3092  
收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2007-08-06

## Expression and correlation of Hypoxia inducible Factor 1 $\alpha$ and drug-resistance-correlated proteins in human pancreatic carcinoma

Jing Sun, Jun Cao, Tao Jiang, Fang Zhang, Chen Huang, Zheng-Jun Qiu

Jing Sun, Jun Cao, Tao Jiang, Fang Zhang, Chen Huang, Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, The First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China  
Supported by: the Scientific Development Foundation of Shanghai Health Bureau, No. 024012  
Correspondence to: Dr. Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, The First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 100 Haining Road, Shanghai 200080, China. qiuwryb@online.sh.cn  
Received: 2007-04-16 Revised: 2007-08-06

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of Hypoxia inducible Factor 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) and the drug-resistance-correlated indexes P-glycoprotein (P-Gp), Bcl-X<sub>L</sub> and Bax, and the relationship between HIF-1 $\alpha$  and resistance to chemotherapy in human pancreatic carcinoma.

**METHODS:** Protein expression of HIF-1 $\alpha$ , P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax in pancreatic tissues from 34 radically resected specimens of pancreatic carcinoma was detected by immunohistochemical staining.

**RESULTS:** The protein expression rates of HIF-1 $\alpha$ , P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax in pancreatic carcinoma were 26/34 (76.5%), 28/34 (82.4%), 30/34 (88.2%) and 26/34 (76.5%), respectively. There were positive correlations between the positivity rates of HIF-1 $\alpha$  and P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax ( $r = 0.471$ ,  $P =$

0.005;  $r = 0.443$ ,  $P = 0.009$ ;  $r = 0.510$ ,  $P = 0.002$ ).

**CONCLUSION:** HIF-1 $\alpha$ , P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax were over-expressed in human pancreatic carcinoma tissues. A positive correlation was determined between the expression rates of HIF-1 $\alpha$  and P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax. HIF-1 $\alpha$  may have a significant role in resistance to chemotherapy in pancreatic carcinoma via up-regulation of the expression of P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax.

**Key Words:** Pancreatic carcinoma; Hypoxia inducible Factor 1 $\alpha$ ; Chemotherapy resistance; Multidrug resistance gene; Apoptosis

Sun J, Cao J, Jiang T, Zhang F, Huang C, Qiu ZJ. Expression and correlation of Hypoxia inducible Factor 1 $\alpha$  and drug-resistance-correlated proteins in human pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2503-2506

### 摘要

**目的:** 探讨HIF-1 $\alpha$ 及耐药相关指标P糖蛋白(P-Gp), 凋亡相关Bcl-2家族成员Bcl-X<sub>L</sub>及Bax在人胰腺癌组织中表达的相关性。

**方法:** 免疫组化法检测手术切除的胰腺癌组织34例中HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax蛋白表达。

**结果:** 34例胰腺癌标本中有26例(76.5%)HIF-1 $\alpha$ , 28例(82.4%)P-Gp, 30例(88.2%)Bcl-X<sub>L</sub>, 26例(76.5%)Bax表达阳性。HIF-1 $\alpha$ 和P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax蛋白表达呈正相关( $r = 0.471$ ,  $P = 0.005$ ;  $r = 0.443$ ,  $P = 0.009$ ;  $r = 0.510$ ,  $P = 0.002$ )。

**结论:** 在胰腺癌组织中HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax蛋白存在高表达; HIF-1 $\alpha$ 与P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax的蛋白表达呈正相关, 提示HIF-1 $\alpha$ 可能通过上调耐药相关蛋白P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>及Bax蛋白表达在胰腺癌耐药机制中起重要作用。

**关键词:** 胰腺癌; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 化疗耐药; 多药耐药基因; 凋亡

孙晶, 曹俊, 江弢, 张放, 黄陈, 裘正军. HIF-1 $\alpha$ 及耐药蛋白在胰腺癌中的表达及相关性分析. *世界华人消化杂志* 2007;15(23):2503-2506  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2503.asp>

### ■背景资料

胰腺癌是1种恶性程度极高的消化道肿瘤, 在上海, 其发病率近20 a内增加近4倍, 上升至第9位, 并呈逐年上升趋势. 在美国胰腺癌的发病率同样上升至第4位, 每年约有37 170例胰腺癌新发病例, 而同期死于胰腺癌的患者约有33 370例。

## ■ 相关报道

对于实体肿瘤微环境缺氧与耐药相关机制的研究在国内外都有相关报道,国内以上海交通大学附属第一人民医院普外科及华中科技大学同济医学院的研究报道较多,可供广大读者参考。

## 0 引言

胰腺癌的恶性程度高<sup>[1]</sup>,早期诊断困难<sup>[2-3]</sup>,发病率呈逐年上升趋势<sup>[4-7]</sup>,手术切除率低<sup>[8-9]</sup>,化疗效果差,即使是二氟胞苷(吉西它滨, gemcitabine),其有效率也仅为12%<sup>[10-11]</sup>。近年来胰腺癌化疗耐药机制已经成为研究热点,影响肿瘤化疗耐药因素较多,其中缺氧微环境在肿瘤化疗中的作用越来越受到研究者的重视,实体瘤存在不同程度的缺氧,缺氧可诱导核转录因子-1(缺氧诱导因子-1, hypoxia-inducible factor -1, HIF-1)表达增高<sup>[12-13]</sup>,从而上调下游靶基因的表达式,其中也有多药耐药基因1(multidrug resistance gene1, *mdr1*)编码的膜蛋白P糖蛋白(P-glycoprotein, P-Gp)以及凋亡相关Bcl-2家族成员Bcl-X<sub>L</sub>和Bax<sup>[14]</sup>。我们应用免疫组化方法检测了人胰腺癌组织中HIF-1 $\alpha$ 及耐药相关蛋白的表达式,旨在探讨这些蛋白在胰腺癌中的表达式情况,及HIF-1 $\alpha$ 与耐药相关蛋白的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1998-01/2006-02手术切除后病理证实为胰腺导管腺癌患者34例,男22例,女12例,年龄35-76(平均59.7 $\pm$ 10.8)岁。TMN(UICC, 2002) I期3例, II期16例, III期9例, IV期6例。高分化18例,中分化14例,低分化2例。胰头癌30例,胰体尾部癌4例。所有标本经甲醛固定,石蜡包埋切片2  $\mu$ m,进行免疫组化染色。兔抗人HIF-1 $\alpha$  mAb(sc-10790)、鼠抗人P-Gp mAb(sc-13131)、鼠抗人Bcl-X<sub>L</sub> mAb(sc-8392)、兔抗人Bax mAb(sc-526)购自美国Santa Cruz生物技术有限公司,二抗(D-3004)购自上海长岛生物技术有限公司。

1.2 方法 采用二步法免疫组化染色(EnVision System)。常规石蜡包埋的组织连续切片;二甲苯脱蜡,梯度乙醇逐级水化;30mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶;微波抗原修复;羊血清封闭非特异性抗原,加入一抗HIF-1 $\alpha$ (1:100), P-Gp(1:100), Bcl-X<sub>L</sub>(1:200)和Bax(1:200), 4 $^{\circ}$ C 30min;加入EnVision二抗室温下孵育30 min;加入DAB显色,光镜控制显色程度;苏木素复染,中性树胶封片。以公司提供阳性对照片为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。参考文献<sup>[15-18]</sup>判断HIF-1 $\alpha$ , P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub>和Bax结果。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行分析,计数资料用 $\chi^2$ 检验或四格表精确概率检验及Spearman等级相关检验作统计分析,  $P < 0.05$ 有统

表 1 胰腺癌HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax在细胞中表达的关系

HIF-1 $\alpha$	P-Gp		Bcl-X <sub>L</sub>		Bax	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
(+)	24 <sup>b1</sup>	2	25 <sup>b2</sup>	1	23 <sup>b3</sup>	3
(-)	4	4	5	3	3	5
合计	28	6	30	4	26	8

<sup>b1</sup> $P = 0.005$  ( $r = 0.471$ ), <sup>b2</sup> $P = 0.009$  ( $r = 0.443$ ), <sup>b3</sup> $P = 0.002$  ( $r = 0.510$ )。

计学意义。

## 2 结果

2.1 胰腺癌组织HIF-1 $\alpha$ 及P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax的表达式 34例胰腺癌组织中HIF-1 $\alpha$ 表达式阳性26例(76.5%), P-Gp表达式阳性28例(82.4%), Bcl-X<sub>L</sub>表达式阳性30例(88.2%), Bax表达式阳性26例(76.5%)。HIF-1 $\alpha$ 阳性的细胞在胰腺癌组织中呈散在、局灶性分布,尤其在肿瘤组织内的腺管结构中及坏死组织周围表达式较高,染色颗粒主要位于胰腺癌细胞的胞核内; P-Gp阳性的细胞在胰腺癌组织中呈散在、局灶或弥漫性分布,染色颗粒主要位于胰腺癌细胞的胞膜上与胞质内; Bcl-X<sub>L</sub>、Bax阳性的细胞在胰腺癌组织中呈弥漫性分布,染色颗粒主要位于胰腺癌细胞的胞质内(图1)。

2.2 HIF-1 $\alpha$ 与P-Gp, Bcl-X<sub>L</sub>, Bax表达的关系 HIF-1 $\alpha$ 阳性26例中有24例P-Gp表达式阳性, HIF-1 $\alpha$ 阴性8例中有4例P-Gp阳性, HIF-1 $\alpha$ 和P-Gp蛋白表达式呈正相关( $r = 0.471$ ,  $P = 0.005$ , 表1)。HIF-1 $\alpha$ 和Bcl-X<sub>L</sub>, Bax蛋白表达式呈正相关(表1)。

## 3 讨论

实体肿瘤存在不同程度的低氧状态<sup>[19]</sup>,目前已有研究表明肿瘤低氧微环境可降低化疗的敏感性<sup>[20-22]</sup>,进一步的实验研究表明低氧可诱导多种肿瘤细胞株对抗癌药物的耐药<sup>[23]</sup>。Buchler *et al*<sup>[24]</sup>检测了胰腺癌组织中的氧分压,发现胰腺癌组织存在低氧微环境。有研究发现,胰腺癌组织中存在HIF-1 $\alpha$ 高表达式,并与肿瘤大小、临床病理分期和淋巴结转移有关<sup>[25]</sup>。本研究进一步证实了胰腺癌组织中存在HIF-1 $\alpha$ 的高表达式。低氧微环境导致肿瘤对化疗药物耐药的机制仍不清楚,近年的研究表明低氧微环境可诱导耐受低氧诱导凋亡细胞克隆<sup>[26]</sup>,并且HIF-1 $\alpha$ 在这一过



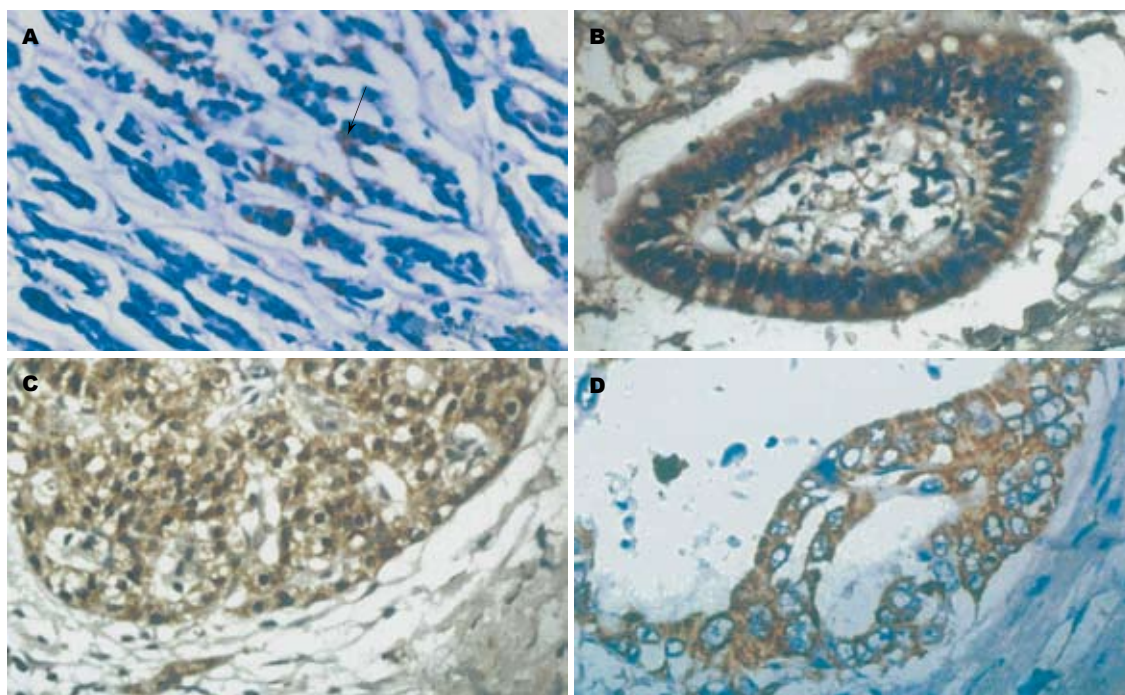


图1 胰腺癌组织中HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax蛋白的表达(EnVision  $\times 400$ )。A: HIF-1 $\alpha$ ; B: P-Gp; C: Bcl-X<sub>L</sub>; D: Bax。

程中起重要作用, HIF-1 $\alpha$ 可上调抗凋亡基因表达, Acs *et al*<sup>[27]</sup>认为缺氧能诱导Bcl-X<sub>L</sub>过表达抑制凋亡。Ozawa *et al*<sup>[28]</sup>则发现缺氧条件下, HIF-1的激活能引起Bax蛋白的表达增加从而启动Bax介导的细胞凋亡。本研究从临床病理组织中发现并证实胰腺癌组织中存在Bcl-X<sub>L</sub>和Bax的高表达, 并且HIF-1 $\alpha$ 高表达与Bcl-X<sub>L</sub>和Bax表达呈正相关, 提示低氧微环境下HIF-1 $\alpha$ 可能通过上调Bcl-X<sub>L</sub>和Bax的表达使胰腺癌细胞耐受凋亡, 可能是胰腺癌细胞对化疗耐药的机制之一。

低氧微环境也可能通过调控MDR1/P-Gp表达而产生耐药, Waternberg *et al*<sup>[29]</sup>在体外研究中发现低氧微环境可上调P-Gp表达, 并且需要HIF-1 $\alpha$ 的参与。进一步用反寡核苷酸阻断HIF-1 $\alpha$ 表达可导致MDR1 mRNA和P-Gp的上调<sup>[30]</sup>, 而且低氧微环境诱导HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp表达上调, JNK激酶传导信号起重要作用<sup>[31]</sup>。本研究发现胰腺癌组织中存在P-Gp高表达, 并且与HIF-1 $\alpha$ 表达呈正相关, 提示MDR1可能是HIF-1 $\alpha$ 的靶基因之一。

本研究从免疫组化上发现胰腺癌组织中存在HIF-1 $\alpha$ 、P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>和Bax的高表达, 并且P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>和Bax的表达与HIF-1 $\alpha$ 呈正相关, HIF-1 $\alpha$ 可能通过上调P-Gp、Bcl-X<sub>L</sub>和Bax, 在胰腺癌耐药机制中起重要作用, 其确切机制还有待于进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- Boeck S, Hinke A, Wilkowski R, Heinemann V. Importance of performance status for treatment outcome in advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 224-227
- Boujaoude J. Role of endoscopic ultrasound in diagnosis and therapy of pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3662-3666
- Iglesias-Garcia J, Dominguez-Munoz E, Lozano-Leon A, Abdulkader I, Larino-Noia J, Antunez J, Forteza J. Impact of endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy for diagnosis of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 289-293
- Chen KX, Wang PP, Zhang SW, Li LD, Lu FZ, Hao XS. Regional variations in mortality rates of pancreatic cancer in China: results from 1990-1992 national mortality survey. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2557-2560
- Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1819-1823
- 陈可欣, 张思维, 李连弟. 中国胰腺癌死亡情况报告. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 520-522
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- Nakao A, Fujii T, Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S, Kodera Y, Inoue S, Takeda S. Oncological problems in pancreatic cancer surgery. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4466-4472
- Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 2005; 128: 1626-1641
- Xie DR, Liang HL, Wang Y, Guo SS, Yang Q. Meta-analysis on inoperable pancreatic cancer: a comparison between gemcitabine-based combination therapy and gemcitabine alone. *World*

#### ■创新盘点

本文以胰腺癌临床病理标本为研究对象, 应用免疫组化的方法研究胰腺癌组织中缺氧及耐药相关基因蛋白水平的表达, 为微环境缺氧在胰腺癌治疗领域中的应用提供临床依据。

#### ■应用要点

本文为靶向微环境缺氧治疗胰腺癌化疗耐药提供了初步的临床理论依据。虽然靶向微环境缺氧的治疗真正应用于临床可能还需要经过漫长的临床试验过程, 但是它为胰腺癌的治疗提供了新的思路。



## ■同行评价

本文通过免疫组化方法分析胰腺癌组织中HIF及相关耐药蛋白的表达,发现胰腺癌组织中存在HIF, Bcl-X<sub>L</sub>和Bax的高表达,选题明确,有一定针对性,可为临床胰腺癌化疗耐药研究提供新靶点,有较好学术价值。

- J Gastroenterol* 2006; 12: 6973-6981
- 11 Storniolo AM, Enas NH, Brown CA, Voi M, Rothenberg ML, Schilsky R. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1261-1268
- 12 Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragones J, Vara A, Landazuri MO, del Peso L. Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J Biol Chem* 2002; 277: 13508-13517
- 13 Caro J. Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt Med Biol* 2001; 2: 145-154
- 14 Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005; 205: 275-292
- 15 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 16 Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusens LF, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991; 51: 2720-2726
- 17 Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Skrzydlewska E, Sulkowska M. Connexin 26 correlates with Bcl-xL and Bax proteins expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1544-1548
- 18 Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshiha T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Kato M, Shimada Y, Imamura M. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology* 1999; 56: 73-82
- 19 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307
- 20 Durand RE. The influence of microenvironmental factors during cancer therapy. *In Vivo* 1994; 8: 691-702
- 21 Raghunand N, Gillies RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 2000; 3: 39-47
- 22 Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. *Am J Pathol* 2003; 163: 663-671
- 23 Volm M, Koomagi R, Mattern J. Interrelationships between microvessel density, expression of VEGF and resistance to doxorubicin of non-small lung cell carcinoma. *Anticancer Res* 1996; 16: 213-217
- 24 Buchler P, Reber HA, Buchler M, Shrinkante S, Buchler MW, Friess H, Semenza GL, Hines OJ. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26: 56-64
- 25 Sun HC, Qiu ZJ, Liu J, Sun J, Jiang T, Huang KJ, Yao M, Huang C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis. *Int J Oncol* 2007; 30: 1359-1367
- 26 Sanna K, Rofstad EK. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro. *Int J Cancer* 1994; 58: 258-262
- 27 Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ. Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004; 214: 243-251
- 28 Ozawa T, Hu JL, Hu LJ, Kong EL, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF. Functionality of hypoxia-induced BAX expression in a human glioblastoma xenograft model. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 449-455
- 29 Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, Sauer H. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 2003; 17: 503-505
- 30 Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; 62: 3387-3394
- 31 Comerford KM, Cummins EP, Taylor CT. c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res* 2004; 64: 9057-9061

编辑 何燕 电编 郭海丽

# 内质网应激与肝细胞凋亡

吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛

吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032

国家自然科学基金资助项目, No. 30572380

通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科, 上海中医药大学脾胃病研究所. jiliver@vip.sina.com

电话: 021-64286261 传真: 021-64286261

收稿日期: 2007-06-16 修回日期: 2007-08-10

## Endoplasmic reticulum stress and hepatic apoptosis

Tao Wu, Guang Ji, Pei-Yong Zheng, Tao Liu

Tao Wu, Guang Ji, Pei-Yong Zheng, Tao Liu, Department of Gastroenterology, Research Institute of Spleen and Stomach Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572380

Correspondence to: Guang Ji, Department of Gastroenterology, Research Institute of Spleen and Stomach Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2007-06-16 Revised: 2007-08-10

## Abstract

Endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle of eukaryotic cells. There are many reasons for the accumulation of misfolded and unfolded proteins in the ER, which affect the balance of  $Ca^{2+}$ . Such phenomena are called ERS. Apoptosis, programmed cell death, is an active method of cell death controlled by the extracellular microenvironment and intracellular gene regulation. It is an important mechanism by which the body removes no-longer-needed cells and heterocysts, thus ensuring normal development and maintaining the normal physiological processes of the organism. Hepatic apoptosis can cause liver injury and disease, and is considered to be mainly mediated by two signaling pathways: the death acceptor and the mitochondrial pathways of cell death. However, recent research has demonstrated that ERS also mediates hepatic apoptosis. The mechanism of hepatic apoptosis mediated by ERS is discussed.

Key Words: Endoplasmic reticulum stress; Hepatic

apoptosis; Unfolded protein response

Wu T, Ji G, Zheng PY, Liu T. Endoplasmic reticulum stress and hepatic apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2507-2515

## 摘要

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是一种重要的真核细胞器, 由于各种原因引起的内质网中出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 $Ca^{2+}$ 平衡紊乱的状态, 称为内质网应激(ER stress, ERS). 细胞凋亡(apoptosis), 又称为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是受细胞外微环境和细胞内基因调控的一种细胞主动性死亡方式, 他是机体用来去除衰老、有害、无用及异型细胞的一种重要机制, 是确保机体正常发育、维持机体正常生理过程所必须的. 肝细胞凋亡是造成肝脏损伤和肝脏疾病最基本的中心环节. 既往研究认为肝细胞凋亡主要通过两条信号通路介导, 即死亡受体通路和线粒体依赖性的细胞凋亡通路. 但近来发现ERS亦介导肝细胞发生凋亡, 本文主要讨论ERS途径所致肝细胞凋亡的机制.

关键词: 内质网应激; 肝细胞凋亡; 未折叠蛋白反应

吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛. 内质网应激与肝细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2507-2515

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2507.asp>

## 0 引言

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是一种重要的真核细胞器, 由于各种原因引起的ER中出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 $Ca^{2+}$ 平衡紊乱的状态, 称为ER应激(ER Stress, ERS). ERS可由多种原因引起, 这些刺激引起从ER到胞质和胞核的信号传导, 最终导致对细胞存活的适应或凋亡. 越来越多的研究证实, 许多疾病的发病机制都与ERS引起的凋亡有关, 例如糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森氏病等神经变性疾病、病毒性疾病、癌症、外伤性脑损伤、扑热息痛引起的肾小管损伤等<sup>[1-2]</sup>. 在肝脏疾病方面,

## ■背景资料

肝细胞凋亡是造成肝脏损伤和肝脏疾病最基本的中心环节. 既往研究认为肝细胞凋亡主要通过死亡受体通路和线粒体依赖性的细胞凋亡通路介导. 但近来发现ERS亦介导肝细胞发生凋亡. 越来越多的研究证实, 许多疾病的发病机制都与ERS引起的凋亡有关, 因此了解ERS引起的肝细胞凋亡至关重要.

## ■ 研发前沿

目前对于ERS介导肝细胞凋亡的研究热点主要集中在ERS的跨膜蛋白、反应蛋白、伴侣蛋白和肝细胞凋亡相关调控基因及诱导分子方面,研究重点在于ERS具体是如何介导肝细胞凋亡,这也是亟待进一步研究和揭示的问题。

非酒精性脂肪肝、胆汁淤积和酒精性肝病,乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染等的发病机制均与ERS引起的损伤有关<sup>[3-6]</sup>。因此了解ERS引起的肝细胞凋亡至关重要,可为临床上防治各种肝脏疾病提供新的思路和方法。本文就从ERS和肝细胞凋亡两大方面对ERS介导肝细胞凋亡作一综述。

## 1 ERS的诱发因素

ER含有细胞色素P450(cytochrome P450)、3-羟-3-甲基辅酶A(HMGCoA)还原酶等多种酶系统,在维持细胞内Ca<sup>2+</sup>内环境稳定及膜蛋白合成、修饰和折叠等方面发挥关键性作用,是细胞合成、加工蛋白质和贮存Ca<sup>2+</sup>的主要场所,同时也是细胞内其他膜性细胞器的重要来源,在内膜系统中占有中心地位,对应激极为敏感<sup>[7-9]</sup>。细胞应激涉及线粒体、ER、胞核等细胞器的应激,他们既相对独立,又相互作用。现在备受关注的ERS是线粒体应激、胞核应激的共同通路,ERS反应是应激时发生在细胞中的最初反应<sup>[2]</sup>。ERS对决定应激细胞的结局如抵抗、适应、损伤或凋亡有重要作用,近年来有关其信号通路与应用的研究非常活跃<sup>[10-11]</sup>。

凡影响ER功能的因素都能够引起ERS,包括有下列各种因素:(1)细胞营养物质缺乏,包括葡萄糖饥饿和氨基酸饥饿;(2)影响蛋白质翻译后修饰的因素,如还原物质二巯基苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol)、同型半胱氨酸(homocystine)、糖基化抑制剂衣霉素(tunicamycin)、葡萄糖胺(glucosamine)、2-脱氧葡萄糖(2-deoxyglucose)等;(3)影响ER钙离子平衡的药物,如ERCa<sup>2+</sup>-ATP酶抑制剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、钙离子载体(calcium ionophore)A23187、钙离子螯合剂乙二醇四乙酸酯(ethylene glycol tetraacetate, EGTA)、抗生素罗奴霉素(lonomycin)、ERCa<sup>2+</sup>强烈释放剂等;(4)突变基因表达的结构异常蛋白在ER堆积;(5)其他一些有害因素如紫外线、缺氧、氧化应激、病毒、毒性物质(如重金属)等。上述因素作用的共同机制是引起ER摄取/释放Ca<sup>2+</sup>障碍或蛋白质加工/运输障碍<sup>[12-13]</sup>。

## 2 ERS反应途径

迄今为止,对于ERS至少已发现了4种功能上相互独立的反应途径<sup>[14-15]</sup>。

2.1 蛋白质生物合成异常 蛋白质的不正确折叠引发的ERS反应称未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),在哺乳动物细胞中由3种ER感应蛋白介导,即1型ER转膜蛋白激酶(type-1 ER transmembrane protein kinase, IRE1)、双链RNA依赖的蛋白激酶样ER激酶(PKR like ER kinase, PERK)和活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)3种跨膜蛋白质<sup>[16]</sup>。UPR是指ERS时,从ER到细胞核的一系列信号传导通路,主要特征是以葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein78, GRP78)/免疫球蛋白结合蛋白(immunoglobulin binding protein, Bip)、钙网蛋白(calreticulin)及GRP170等为代表的ER伴侣蛋白表达水平的上调。真核细胞有3种不同的机制处理UPR: ER伴侣蛋白基因转录的上调;蛋白质翻译减少;非折叠蛋白由ER移入胞质并被降解。

2.2 基因活化编码 参与ER蛋白质的折叠、转运、分泌、降解的基因在ERS时诱导表达,其中包括ERS反应的标志性蛋白GRP78/Bip。GRP78/Bip是热休克蛋白家族热休克蛋白70(heat shock protein70, HSP70)的成员之一,主要参与ER中蛋白质的重新折叠和装配。

2.3 ER相关降解(ER-associated degradation, ERAD) ER中不能再折叠的错误折叠蛋白可以通过ER质量控制系统检测,从ER逆向转运至胞质,被26 S蛋白酶体降解。

2.4 细胞凋亡 当严重的或长时间的ERS损伤了ER的功能时,发生细胞凋亡,以去除受损伤的细胞。由ERS诱发的凋亡有3种途径: CHOP(CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白, CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein)/GADD153(growth arrest/DNA damage-inducible protein153)基因的激活转录; JNK(C-Jun氨基酸末端激酶, C-Jun N-terminal kinase)的激活通路; ER特有的Caspase-12的激活。CHOP/GADD153是转录因子家族C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein, CCAAT/增强子结合蛋白)成员之一,在正常生理状态下基本检测不到,但在ERS时,被显著诱导表达,参与调节下游凋亡相关基因的表达。ER介导细胞凋亡至少包括2种机制,即UPR和Ca<sup>2+</sup>起始信号(calcium signaling)。2种机制之间存在串扰,如钙网蛋白是ER腔的主要钙离子结合伴侣蛋白,可调节Ca<sup>2+</sup>水平,他同时也是UPR诱导的糖蛋白结合伴侣蛋白,其过表达可导致对凋亡的敏感性增加<sup>[17]</sup>。

在应激早期, ER合成蛋白能力短暂地减弱,

这有助于减少蛋白进入ER腔内而防止ER过度负荷;随后,编码ER蛋白翻译、折叠、输出、降解的基因被激活,从而促进ER对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的处理,而有利于维持细胞正常功能;最后,若ERS过度或过强则引起细胞凋亡或死亡等变化。因此,ERS既是细胞抵抗应激的生理反应,又是应激造成细胞损伤的重要机制。一定程度的ERS免于损伤;若应激过强,保护机制不能与损伤相抗衡,则诱导细胞发生凋亡<sup>[11]</sup>。

### 3 ERS的跨膜蛋白、调控因子和伴侣蛋白

**3.1 跨膜蛋白** 正常情况下,细胞ER膜上存在IRE1, PERK和ATF6 3种跨膜蛋白质,他们的配体结合域位于ER腔面,效应域位于ER胞质面<sup>[18]</sup>。此3种感应蛋白在未发生应激时都以无活性的状态与ER分子伴侣GRP78/Bip结合<sup>[19-20]</sup>。ERS时,未折叠蛋白的积聚使GRP78/Bip与3种感应蛋白分离,引起他们的激活。游离的IRE1, PERK分别通过各自细胞质内结构域的二聚化和自身磷酸化而受到激活;解离后的ATF6则转入高尔基体被蛋白酶水解成活性转录因子,继而诱导ERS下游信息的传递与相关基因的表达<sup>[21]</sup>。

活化的IRE1仅能募集胞质接合蛋白TRAF-2,通过激活胞内的JNK信号转导通路,再作用于Procaspase-12,促进其聚合和活化,有研究表明ERS引起凋亡时胞质内的天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶-7(cysteine aspartyl protease-7, Caspase-7)转移致ER表面激活Caspase-12。活化的Caspase-12在无需细胞色素C参与的情况下激活Caspase-9和Caspase-3引起凋亡。PERK自身聚合、自我磷酸化激活,将真核细胞翻译起始因子2 $\alpha$ (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )的Ser51磷酸化,使之不能结合葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GTP),阻止了起始蛋氨酸-RNA与核糖体的结合,无法进行翻译起始。这种保护性机制很快阻止了新生蛋白向ER腔的转运,抑制了ER的负荷过重<sup>[12]</sup>。另外,PERK活化后能选择性诱导CHOP表达,同时胞内蛋白的整体合成下调,不利于细胞存活。目前认为伴侣蛋白BIP的上升能够阻碍细胞发生凋亡,但CHOP表达上调同时使细胞作好凋亡的准备,当不利因素持续存在,ERS过于强烈时,细胞就发生凋亡<sup>[22-23]</sup>。活化的ATF6能够促进转录因子CHOP基因的表达。CHOP能够下调B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(B-cell lymphoma/leukemia-2

protein, Bcl-2)的表达,CHOP表达升高是ERS的标志<sup>[17]</sup>。

**3.2 调控因子** 正常情况下,ER内Ca<sup>2+</sup>浓度为0.1-1 mmol/L。一般情况下,ER的Ca<sup>2+</sup>浓度主要依靠3种受体通道调节:向ER内吸收Ca<sup>2+</sup>的钙泵,起释放Ca<sup>2+</sup>作用的莱恩素受体(ryanodine receptor, RyR)和三磷酸肌醇受体(IP3 receptor, IP3R)通道。ER腔内的Ca<sup>2+</sup>主要发挥2种作用:一是释入胞质作为第二信使;二是在ER腔内调节蛋白酶活性。由于调节Ca<sup>2+</sup>吸收和释放的膜蛋白来自ER腔,因此大量Ca<sup>2+</sup>释入胞质会产生严重而广泛的影响,如会破坏ER与高尔基体之间以及胞核与胞质之间的膜转运等。另一方面,由于ER的功能是生成和加工分泌性蛋白质,而这一功能又是依靠多种Ca<sup>2+</sup>依赖性蛋白酶的调节而实现的,因此当这些蛋白酶由于Ca<sup>2+</sup>从ER腔大量释出而失活后会导致蛋白质未折叠加工或错误折叠并在ER腔内积聚,最终导致对ER的刺激<sup>[24-26]</sup>。Matsuzawa *et al*<sup>[27-28]</sup>的研究则发现,凋亡信号调节激酶1(apoptosis signature kinase1, ASK1)是氧化应激和ERS诱导细胞凋亡所必需的。

**3.3 伴侣蛋白** ER腔内有大量可溶性的驻留的分子伴侣和折叠酶。其中GRP78/Bip, GRP94, HSP40分别属于经典的分子伴侣家族HSP70, HSP90和HSP40。GRP78协助新生蛋白质正确结构的折叠,ERS时其表达显著增加, Lee *et al*<sup>[29]</sup>认为可以做为ERS的标志蛋白。GRP94是GRP家族的主要成员,为UPR的标志性靶基因之一<sup>[30]</sup>。此外还有肽-脯氨酰顺反异构酶(peptide prolylcis transisomerase, PPT)及ER所特有的:(1)凝集素分子伴侣:钙联接蛋白(calnexin)和钙网蛋白;(2)蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)<sup>[31]</sup>。

**3.4 Caspase-12** Caspase-12作为ER膜上的促凋亡分子,是ERS介导的细胞凋亡特异性启动蛋白酶,其活化是凋亡的中心环节<sup>[32]</sup>。Caspase-12是较理想的抗凋亡治疗靶标<sup>[23]</sup>。能使Caspase-12的激活机制大致可归纳为3种:(1)胞质内的游离Ca<sup>2+</sup>升高,活化了钙激活蛋白酶,其活化后从胞质移位于ER表面进而激活Caspase-12;(2)ERS也会使Caspase-7从胞质转位于ER表面,裂解Caspase-12大小亚基之间的连接区域,进而激活Caspase-12;(3)有关Caspase-12活化的其他机制还包括肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor associated factor-2, TNF-RAF-2)<sup>[9]</sup>。Nakagawa *et al*<sup>[33]</sup>研究发现Caspase-12

#### ■相关报道

目前,已有研究发现熊去氧胆酸通过抑制细胞内Ca<sup>2+</sup>释放,能阻抑ERS介导的肝细胞凋亡,并能减轻ERS反应蛋白GRP78/Bip表达,抑制ERS途径启动的Caspase-12活化,从而阻断肝细胞凋亡,这一抗凋亡新机制的发现为各种ERS介导肝脏疾病的治疗提供了新的思路。

## ■创新盘点

本文较为系统全面的综述了ERS的诱发因素、反应途径、跨膜蛋白、调控因子和伴侣蛋白,肝细胞凋亡的特点及其在肝损伤中的意义、肝细胞凋亡的途径、调控基因及诱导分子以及ERS介导肝细胞凋亡的最新研究进展。

不是分布在胞质中,而是位于ER腔内,并在ER内活化蛋白水解酶,是ER特有的Caspase. 用ER-高尔基体蛋白转运抑制剂布雷菲德菌素A(Brefeldin A), Tunicamycin(N端糖基化抑制剂)、Thapsigargin(ER膜上钙泵)处理细胞,诱导ERS反应,细胞出现凋亡,并发现Caspase-12活化及多聚核糖聚合酶活化;而Caspase-12基因缺陷细胞经上述药物诱导ERS反应时,细胞凋亡受抑,而经死亡受体和线粒体介导的凋亡途径不受影响. Mouw *et al*<sup>[34]</sup>亦发现,敲除Caspase-12基因的细胞虽然仍对其他各种凋亡诱导因素敏感,但对ERS诱导的凋亡可产生耐受. 证明Caspase-12是ERS激活的,而非死亡受体或线粒体所介导的凋亡传导信号激活的. 这种凋亡信号传导途径最终会导致Caspase-3活化,提示ERS最后被传到了线粒体. 线粒体有可能在这种死亡途径中起综合和放大的作用<sup>[9]</sup>.

## 4 肝细胞凋亡的特点及其在肝损伤中的意义

细胞凋亡(apoptosis)的概念首先由英国学者Kerr *et al*于1972年提出,又称为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),是受细胞外微环境和细胞内基因调控的一种细胞主动性死亡方式<sup>[35]</sup>. 细胞凋亡过低或过高都可导致疾病的发生. 细胞凋亡是ATP供应下以基因介导的DNA非随意断裂,胞质和胞核固缩为主要标志的细胞主动性死亡方式<sup>[36]</sup>. 凋亡是涉及细胞外信号(FasI)、细胞膜受体(如Fas, TNF- $\alpha$ R)、Caspase蛋白酶家族、Bcl-2蛋白家族、线粒体释放细胞色素C和ERS等多种因素,最后由Caspase介导的蛋白酶级联反应过程. 细胞凋亡的诱导因素有: (1)物理性因素,如放射线、紫外线和高温; (2)化学性因素,如抗癌药物、氧自由基和一氧化氮等; (3)微生物因素,如人免疫缺陷病毒、EB病毒等; (4)缺乏细胞生长必需因子,如干细胞生长因子、促肝细胞生长素和激素等; (5)免疫因素,抗原和免疫应答中产生的细胞因子,如Fas/FasL, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ .

肝细胞凋亡主要表现为: 细胞皱缩变小, 细胞膜仍保持完整性, 胞质浓缩, ER扩张呈泡状并与细胞膜融合. 核染色质固缩并呈边缘化, 核DNA被核酸酶降解为规则的DNA片段, 电泳呈特殊的梯状区带(ladder). 凋亡后期, 细胞膜内陷将细胞自行分割为多个具有完整膜结构, 内含各种细胞成分的凋亡小体(apoptotic bodies), 并很快被邻近的吞噬细胞所吞噬, 不引起炎症反

应<sup>[37-39]</sup>. 而肝细胞坏死多是肝细胞受各种致病因素作用所致, 表现为细胞肿胀, 细胞膜破裂, 进而形成嗜酸性小体或溶解, DNA降解不充分, 电泳呈弥散型. 后期胞质内的内容及炎症因子溢出, 引起局部严重的炎症反应, 并累及其他细胞<sup>[40]</sup>.

尽管肝细胞是一种相对静止的细胞, 但在动物的整个生命活动中, 肝脏的生理活动与细胞凋亡密切相关, 衰老、限食以及各种病理因素都可诱导或抑制肝细胞凋亡<sup>[41]</sup>. 肝细胞凋亡是调节肝组织正常细胞更新、增殖以及再生的重要机制. 多种因素可以诱导肝细胞凋亡, 例如物理因素(如射线, 高温)、缺血缺氧(如缺血再灌注、运动)、毒素药物或病毒感染等. 肝细胞凋亡是一柄双刃剑, 他是肝细胞对抗感染肿瘤及防止肝细胞自身免疫反应的自卫措施, 同时肝细胞凋亡抑制因子可以抑制肝细胞的过度凋亡, 以防肝细胞过度死亡而导致肝衰竭. 因此肝细胞凋亡除发生在肝发育时和成人肝细胞更新之外, 同时也是造成肝脏损伤和肝脏疾病最基本的中心环节. 肝纤维化、病毒性肝炎、移植排斥性肝炎、自身免疫性肝炎等多种肝病都表现为大量肝细胞凋亡, 影响肝脏功能, 加速病情恶化. 肝细胞凋亡与肝炎尤其是暴发性肝衰竭关系密切, 是其发病的关键环节. 肝细胞凋亡是病毒性肝炎的一种重要病理变化, 肝小叶内的点状坏死及碎屑样坏死其实质主要是肝细胞凋亡. 体外试验发现低浓度乙醇可诱导大鼠原代肝细胞凋亡, 提示肝细胞凋亡可能是酒精性肝病肝细胞损伤的重要机制之一<sup>[42-46]</sup>. 了解肝细胞凋亡的发生途径对于临床上防治各种肝脏疾病提供新的治疗思路和方法.

## 5 肝细胞凋亡的途径

凋亡是程序性细胞死亡, 目前已知的3条凋亡途径包括死亡受体途径、线粒体途径及ERS凋亡途径. 死亡受体途径的发生是由FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL各自与相应细胞膜上受体特异结合后, 募集胞质内Caspase-8或Caspase-10, 并激活下游Caspase-3, 引起细胞凋亡. 而线粒体途径则涉及线粒体跨膜电位消失, 膜通透性改变, 细胞色素C释放, 活化Caspase-9. 在dATP存在时, 引起下游Caspase-3, -6, -7的活化, 介导细胞凋亡. ERS涉及非折叠蛋白反应以及ER内钙失衡, 使Caspase-12活化, 诱导GRP78/Bip, GRP94, GADD34, GADD45A, CHOP等分子伴侣产生增加, 继而激





## ■名词解释

内质网应激: 内质网(ER)是一种重要的真核细胞器, 由于各种原因引起的ER中出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及Ca<sup>2+</sup>平衡紊乱的状态, 称为ER应激(ER Stress, ERS).

鼠肝细胞产生凋亡. TGF- $\beta$ R是目前已知参与肝细胞凋亡的其中一个受体, 他通过丝氨酸或苏氨酸激酶的级联反应而诱导肝细胞凋亡, 凋亡的肝细胞分泌TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 作用于星状细胞, 使之成为激活的肌纤维细胞, 肌纤维细胞又分泌TGF- $\beta$ , 进一步导致肝细胞的凋亡<sup>[56]</sup>.

6.2.5 TNF- $\alpha$  TNF- $\alpha$ 是肝脏的一个主要炎症因子和效应分子, 他与肝细胞凋亡的关系甚为密切. 肝组织中单核巨噬细胞是产生和释放TNF- $\alpha$ 的主要细胞<sup>[57]</sup>. 因此TNF- $\alpha$ 在肝脏中的含量较其他组织多, 诱导产生的氧自由基以及多基因的激活共同导致的肝细胞凋亡在肝损害的发生、发展过程中有十分重要的作用. TNF- $\alpha$ 诱导肝细胞损伤的机制可能有: (1)TNF- $\alpha$ 与TNFR1的胞外区结合后, 引起TNFR1的三聚, 三聚的TNF-R1通过其聚集的胞内死亡结构域招募下游的信号传导蛋白如TRADD, FADD, TRAF和RIP等组装成庞大的TNF-R1信号复合体, 再激活下游的各条信号传导通路, 最后激活NF- $\kappa$ B、JNK激酶, 诱导细胞凋亡; (2)细胞中ASK1与其抑制性蛋白Trx结合, 当细胞受到TNF- $\alpha$ 刺激后, 可通过某中未知的机制产生活性氧自由基, 活性氧自由基引起Trx从ASK1上脱落, ASK1最终可激活JNK和p38激酶诱导细胞凋亡; (3)TNF- $\alpha$ 能介导脂类介质或其他肽类介质产生, 诱导自由基的产生及脂质过氧化, 活化中性粒细胞和单核巨噬细胞以及对内皮细胞的作用<sup>[58]</sup>. 谭春雨 *et al*<sup>[59]</sup>研究显示, 在大鼠二甲基亚硝胺(DMN)诱导的肝纤维化模型中肝细胞凋亡数量明显增多. 其原因可能与模型组活化HSC增多、血窦内皮细胞受损以及枯否细胞增多等有关, 因为活化后的HSC、受损的内皮细胞等分泌TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ 等细胞刺激因子的能力明显增强, 而枯否细胞也可以分泌这些细胞因子, 这些细胞因子被证实有促进肝细胞凋亡的作用. 且模型大鼠肝脏严重的微循环障碍引起的肝细胞营养不良和代谢紊乱也可能是诱发肝细胞病理性凋亡的因素.

6.2.6 穿孔素和颗粒酶B CTL释放的穿孔素和颗粒酶B也是介导肝细胞凋亡的重要因素<sup>[38]</sup>.

6.2.7 内毒素(endotoxin, ET) ET产生病理损害主要是通过TNF- $\alpha$ 介导, 其自身与肝细胞混合培养也可直接致肝细胞凋亡. 梁秀彬 *et al*<sup>[60]</sup>研究表明, 内毒素可诱导体外培养大鼠肝细胞凋亡.

6.2.8 胆红素 胆红素可直接介导肝细胞凋亡, 且与浓度呈正相关<sup>[55]</sup>. 梗阻性黄疸时肝细胞损害机制可能是由于胆酸盐促进肝实质的细胞凋亡

所致.

## 7 ERS介导肝细胞凋亡研究进展

DNA损伤和细胞膜死亡受体聚集长期以来被认为是诱导MPT和Caspase直接活化的细胞凋亡始动点<sup>[16]</sup>. 越来越多的证据表明, ER、溶酶体和高尔基体等其他细胞器也是损伤感知或凋亡信号整合的主要位点<sup>[33]</sup>. ERS既是细胞抵抗应激的重要机制, 也是应激损伤细胞的重要机制. 一定程度的ERS能激活细胞保护机制, 例如增加分子伴侣表达, 诱导未折叠蛋白反应, 表现为蛋白质合成暂停, 随着应激反应蛋白基因表达的增加, 可进一步改善细胞生理状态, 起到细胞保护作用; 相反, 当应激原强度超过细胞自身处理能力时, 保护机制不能与损伤抗衡, ERS可通过Caspase-12启动特有的ER性细胞凋亡途径, 这种凋亡途径是不同于受体介导或经线粒体介导的一种新的细胞凋亡途径, 称为ER相关性死亡(ER associated death, ERAD)途径<sup>[61]</sup>.

ER既含有促进凋亡的因子如Caspase-12, CHOP/GADD153, 也含有抑制因子如Bax Inhibitor I, GRP78, GRP150. ERS过强时, 促凋亡机制占主导, 能够独立地诱导细胞凋亡, 其主要机制包括: (1)激活Caspase-12: Caspase家族成员Caspase-8, 9, 3, 7等是死亡受体、线粒体损伤通路致细胞凋亡的重要介质, 位于ER胞质面的Caspase-12则是ERS致凋亡的特异性介质, 仅与ER的凋亡通路有关. ERS下, 胞质Caspase-7转位至ER表面, 酶切Caspase-12从而激活了后者. GRP78可抑制Caspase-12所致凋亡, 因为GRP78被UPR诱导表达并重新分布, 在胞质中形成亚群并充当ER膜蛋白, 可与Caspase-7和Caspase-12形成复合物, 阻止Caspase-12激活并阻止其从ER释放; (2)诱导CHOP表达: CHOP属于C/EBP转录因子家族, 常与该家族的其他成员形成二聚体, 其基因含有ERSE, 可被ER应激诱导表达继而促进凋亡, 机制包括下调Bcl-2表达、耗竭谷胱甘肽、促进反应氧族产生等; (3)激活线粒体介导的凋亡通路: 酪氨酸激酶C-Abl是ER激活线粒体凋亡通路的信号分子. C-Abl不仅存在于胞核和胞质中, 还有20%以上存在于ER中. ERS可使ER的C-Abl转位至线粒体, 继而促进线粒体释放促凋亡因子细胞色素C, 线粒体与ER中的Bcl-2则抑制其释放<sup>[62]</sup>; (4)其他机制: 例如活化的跨膜蛋白激酶在肿瘤坏死因子相关因子2(tumor necrosis factor associated factor2, TRAF2)协助下激活

JNK, 后者是与细胞增殖、分化以及应激诱导凋亡等多种过程相关的信号转导蛋白, 在一定条件下诱导凋亡<sup>[8]</sup>.

多种肝脏疾病的发生与ERS介导的细胞凋亡有关<sup>[63]</sup>. Caspase-12是ERS介导凋亡途径的关键蛋白酶. 正常情况下Caspase-12以procaspase-12蛋白酶原的形式存在, ERS时, 在天冬氨酸残基的羧基端水解肽链去除原域, 成为有活性的Caspase-12蛋白酶, 他通过依次激活Caspase-9, -3引起细胞凋亡. Masud *et al*<sup>[64]</sup>研究证实了Caspase-9, -3在ERS介导的细胞凋亡内在性途径中起了关键的作用. 当肝细胞发生凋亡时, procaspase-12蛋白量明显减少<sup>[23]</sup>. 有研究发现, ERS介导Caspase-12活化参与了炎症性急性肝功能衰竭肝细胞凋亡的过程, 也是急性肝功能衰竭肝细胞发生坏死的一种新机制和新模式. 在酒精性肝病的患者, 肝细胞凋亡和坏死是并存的. 乙醇可通过激活肝微粒体细胞色素P450、影响甲基转移和影响蛋氨酸的代谢, 从而促进未折叠蛋白反应和ER超负荷反应通路, 促进ERS的发生, 引起细胞凋亡及影响脂类代谢. 近来国外报道, 在乙醇饲养的酒精性肝损伤动物模型中发现, ERS应答基因GRP78、GRP94、CHOP、胆固醇调节元件结合蛋白(sterol response element binding proteins, SREBPs)表达增加<sup>[65]</sup>. 谷氨酰胺能够降低阻塞性黄疸肝细胞凋亡, 增加Bcl-2蛋白表达, 降低Bax蛋白表达<sup>[66]</sup>. 韦新 *et al*<sup>[67]</sup>研究发现牛磺酸具有抑制细胞因子TGF- $\beta$ 的表达. 研究还表明: 牛磺酸具有抑制肝细胞凋亡的作用, 机制可能与增强Bcl-2表达及抑制Bax, TGF- $\beta$ 的表达有关<sup>[49]</sup>. 茵陈术附汤通过促进Bcl-2表达和抑制Bax表达阻断阴黄证大鼠肝细胞凋亡, 可能是其治疗阴黄证的机制之一<sup>[68]</sup>. 近年来的研究发现, 将Bcl-2转基因表达于重型肝炎模型小鼠的肝细胞, 可保护小鼠肝脏功能. 将Bcl-2转基因表达于FasL和TNF- $\alpha$ 诱导的小鼠肝细胞, 可以保护肝细胞的凋亡<sup>[69]</sup>. Xie *et al*<sup>[70]</sup>研究发现熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)通过抑制细胞内Ca<sup>2+</sup>释放, 能阻抑ERS介导的肝细胞凋亡, 并能显著降低由TG引起的胞质内Ca<sup>2+</sup>水平升高, 减轻ERS反应蛋白GRP78/Bip表达, 并抑制ERS途径启动的Caspase-12活化, 从而阻断肝细胞凋亡. 这一抗凋亡新机制的发现为各种ERS介导肝脏疾病的治疗提供了新的思路.

## 8 结语

近年来研究表明, 肝细胞的异常凋亡(增强或减弱)同许多疾病的形成密切相关, 包括肿瘤、自身免疫性疾病和病毒感染等. 在各种急慢性肝损伤中也可观察到异常的细胞凋亡现象. 目前已证明病毒感染、毒性物质、酒精和辐射等均可诱发肝细胞凋亡, 因此针对肝细胞异常凋亡的治疗措施可为各种肝病治疗提供新对策. 阻断肝细胞凋亡信号传导及促凋亡基因表达或上调抗凋亡基因的表达均可防止肝细胞凋亡. 目前有关肝细胞凋亡的研究进展很快, 肝细胞凋亡的机制得到进一步揭示, 在ERS介导肝细胞凋亡方面, 可以通过抑制细胞内Ca<sup>2+</sup>释放, 降低胞质内Ca<sup>2+</sup>水平, 抑制ERS跨膜蛋白(IRE1, PERK和ATF6)的激活, 减轻ERS反应蛋白GRP78/Bip表达和降低伴侣蛋白(GRP94, GADD34, GADD45A, CHOP等)的表达, 并抑制ERS途径启动的Caspase-12活化, 从而阻断肝细胞凋亡途径来治疗肝细胞凋亡引起的各种肝脏疾病, 并为我们的科学实验研究和临床上各种肝脏疾病, 如肝癌、肝移植排斥反应、药物性肝炎、自身免疫性肝病、酒精性肝病等引起的肝损伤的防治提供了新的思路, 探索了新的途径.

## 9 参考文献

- 1 姜山, 谢青. 内质网应激与细胞凋亡. 国外医学·流行病学传染病学分册 2004; 31: 330-333
- 2 姜利霞. 内质网应激与心血管疾病. 中国分子心脏病学杂志 2005; 5: 496-499
- 3 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 4 Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 1999; 6: 842-854
- 5 Pavio N, Romano PR, Graczyk TM, Feinstein SM, Taylor DR. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK. *J Virol* 2003; 77: 3578-3585
- 6 Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002; 76: 7453-7459
- 7 林丽, 唐朝枢, 袁文俊. 内质网应激. 生理科学进展 2003; 34: 333-335
- 8 郭伟, 张木勋. 内质网应激与肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病. 医师进修杂志 2005; 28: 56-58
- 9 赵泽燕. 内质网应激与未成熟脑组织缺氧缺血性脑损伤. 中华医学写作杂志 2005; 12: 1236-1239
- 10 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20:

## ■同行评价

本文对内质网应激与肝细胞凋亡进行了全面的综述, 有一定的可读性, 能较好地反映我国甚至国际上该领域的基础研究水平, 是一篇较好的文章.

- 283-288
- 11 俞雅萍, 晏春根. 糖尿病发病与内质网应激. 中国临床康复 2005; 9: 139-141
- 12 祝筱梅, 刘秀华. 内质网应激与缺血再灌注损伤及其防护. 国际病理科学与临床杂志 2006; 26: 177-181
- 13 方欢, 申宗侯. 内质网应激. 医学分子生物学杂志 2004; 1: 36-39
- 14 Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 1213-1217
- 15 冯献启. 内质网应激反应性凋亡途径研究进展. 国外医学肿瘤学分册 2004; 31: 726-730
- 16 Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BZF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1716-1729
- 17 Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E255-263
- 18 Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* 2004; 15: 767-776
- 19 Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 349-355
- 20 DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 127-141
- 21 卓德祥, 唐朝枢, 李载权. 内质网应激反应基因表达调控的多样性. 医学分子生物学杂志 2006; 3: 32-35
- 22 Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874
- 23 Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294
- 24 刘春岭, 黄如训. 脑缺血时的内质网应激反应与细胞凋亡. 国外医学脑血管疾病分册 2004; 12: 536-539
- 25 张忠彬, 夏昭林. 内质网应激与疾病. 国外医学卫生学分册 2003; 30: 141-145
- 26 董毅龙. 内质网应激与糖尿病. 国外医学生理、病理科学与临床分册 2004; 24: 508-510
- 27 Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Takeda K, Ichijo H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 415-425
- 28 Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002; 16: 1345-1355
- 29 Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-381
- 30 王大鹏, 李波, 方文刚, 陈誉华, 宋今丹. 内质网应激条件下血管内皮细胞生长因子在人脑微血管内皮细胞中的表达. 细胞生物学杂志 2005; 27: 191-195
- 31 李姣, 申宗侯. 内质网驻留的分子伴侣与内质网应激的细胞内信号传导途径. 中国药物与临床 2005; 5: 245-249
- 32 刘芳, 邹萍, 陈敏, 张敏, 吴耀辉, 肖娟. Caspase-12短发夹状RNA在内质网应激性凋亡中的作用. 中华实验外科杂志 2005; 22: 1568-1570
- 33 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103
- 34 Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 2003; 14: 183-186
- 35 杨欣荣, 陈钟. 肝细胞移植中肝细胞凋亡的研究进展. 国外医学外科学分册 2005; 32: 408-441
- 36 包维民, 郭永章, 李立, 唐映梅. 大鼠肝移植缺血再灌注损伤对肝细胞凋亡、胀亡及再生的影响. 昆明医学院学报 2005; 1: 9-12
- 37 李善妮, 瞿树林, 汤长发. 肝细胞凋亡与自身免疫的关系及影响因素. 中国免疫学杂志 2006; 22: 93-96
- 38 顾长海. 肝细胞凋亡发生机理和检测技术简评. 中国检验医学与临床 2000; 1: 29-30
- 39 孙凯, 刘志苏, 孙权. 线粒体在缺血预处理肝细胞凋亡中的作用. 陕西医学杂志 2003; 32: 967-970
- 40 程丽彩, 何玉秀. 运动与肝细胞凋亡研究进展. 中国运动医学杂志 2006; 25: 623-626
- 41 刘立跃, 傅童生. 肝细胞凋亡的基因调控. 实验动物科学与管理 2005; 22: 33-36
- 42 谢青, 李光明. 熊去氧胆酸抗肝细胞凋亡分子机制研究进展. 世界临床药物 2004; 25: 679-682
- 43 张定凤. 肝细胞凋亡和病毒性肝炎. 中华肝脏病杂志 1996; 4: 182-186
- 44 周伟. RNA干扰在肝病研究中的进展. 国外医学消化系疾病分册 2004; 24: 296-298
- 45 臧国庆, 周霞秋, 俞红, 谢青, 王斌, 赵国明, 郭清, 向月琴, 廖丹. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导肝细胞凋亡在暴发性肝衰竭中的作用. 中华消化杂志 2000; 20: 163-166
- 46 吕游. 肝脏疾病中肝细胞凋亡的研究进展. 中国基层医药 2005; 12: 1444-1446
- 47 刘芸野, 谢青. 活性氧与内质网应激介导肝细胞凋亡研究进展. 肝脏 2006; 11: 281-283
- 48 王震侠, 张瑞明, 欧阳晓晖, 蔡继峰. 大鼠肝脏缺血不同时间再灌注时肝细胞凋亡的动态变化及凋亡相关基因Bcl-2的表达. 肝胆胰外科杂志 2004; 16: 250-252
- 49 韦新, 梁健, 毛德文, 张锡流, 陈国忠, 盛庆寿. 牛磺酸对大鼠肝细胞凋亡的作用. 广西医学 2004; 26: 945-946
- 50 Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619
- 51 Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106
- 52 曲宝戈, 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康. 肝纤维化大鼠肝细胞凋亡和增生的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 990-993
- 53 谈景旺. 细胞凋亡与肝细胞损伤. 国外医学生理、病理科学与临床分册 1998; 18: 76-78
- 54 Kennedy JA, Lewis H, Clements WD, Kirk SJ, Campbell G, Halliday MI, Rowlands BJ. Kupffer cell blockade, tumour necrosis factor secretion and survival following endotoxin challenge in

- experimental biliary obstruction. *Br J Surg* 1999; 86: 1410-1414
- 55 Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE. Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *J Am Coll Surg* 2000; 190: 423-431
- 56 张中乐, 刘金彪, 权松霞. 肝脏缺血再灌注损伤和肝细胞凋亡. 河南科技大学学报(医学版) 2003; 21: 77
- 57 李晶媛, 李树臣, 杨维良. TNF- $\alpha$ 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望. 世界华人消化杂志 2007; 15: 606-611
- 58 吴红红, 李保华, 迪丽努尔·吐尔洪, 王红梅, 张建龙. 脓毒症模型大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和肝细胞凋亡的关系. 新疆医科大学学报 2005; 28: 131-133
- 59 谭春雨, 谭善忠, 蒋健, 徐列明. 扶正化瘀方对DMN肝纤维化模型鼠肝细胞凋亡的影响. 上海中医药杂志 2005; 39: 47-49
- 60 梁秀彬, 乔中东, 尹镭, 赵嘉惠, 韩德五. 内毒素体外诱导大鼠肝细胞凋亡. 中华肝脏病杂志 1999; 7: 72-73
- 61 Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002; 7: 335-345
- 62 Ito Y, Pandey P, Mishra N, Kumar S, Narula N, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6233-6242
- 63 Waris G, Tardif KD, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1425-1430
- 64 Masud A, Mohapatra A, Lakhani SA, Ferrandino A, Hakem R, Flavell RA. Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 14132-14139
- 65 Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 921-932
- 66 程雷, 谭广, 王举, 石爱平, 谭毓铨, 王忠裕. 谷氨酰胺对阻塞性黄疸大鼠肝细胞凋亡和相关基因Bcl-2及Bax表达的影响. 吉林大学学报(医学版) 2005; 31: 675-677
- 67 韦新, 梁健, 张锡流, 毛德文, 韦明. 牛磺酸对肝纤维化大鼠转化生长因子 $\beta_1$ 和肿瘤坏死因子的影响. 广西医学 2003; 25: 2099-2101
- 68 张建军, 何敢想, 张赤志. 茵陈术附汤对阴黄证大鼠肝细胞凋亡及Bcl-2和Bax表达的影响. 中西医结合学报 2003; 1: 116-118
- 69 陈辉. 脓毒症与肝细胞凋亡. 《国外医学》麻醉学与复苏分册 2001; 22: 225-227
- 70 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592-601

编辑 何燕 电编 张敏

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

## • 消息 •

### 第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

**本刊讯** 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流, 由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23在哈尔滨召开. 大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示, 并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿). 欢迎消化届同仁积极投稿及参与, 参会代表授予国家继续教育 I 类学分.

#### 1 投稿要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论), 电脑打印(WORD格式), 网上投稿. 截稿时间: 2007-10-31.

#### 2 联系方式

150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 联系人: 朱春兰, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn



# 肝星状细胞中的TGFβ信号转导通路

李丽, 王宝恩

## ■背景资料

肝星状细胞(HSC)活化是肝纤维化形成的中心环节, 转化生长因子β(TGFβ)启动了肝星状细胞的活化, TGFβ信号在HSC内主要通过ALK5/smad2/3途径在HSC内传递, 而近年来的研究表明, ALK1/smad1/5途径及非smad信号也起非常重要的作用. 有必要对HSC中复杂的TGFβ信号进行研究, 为有效抗TGFβ治疗肝纤维化提供新的思路.

李丽, 王宝恩, 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: 李丽, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心. lili519\_72@126.com

电话: 010-63138028

收稿日期: 2007-04-19 修回日期: 2007-08-10

## Transforming growth factor β signaling in hepatic stellate cells

Li Li, Bao-En Wang

Li Li, Bao-En Wang, Liver Disease Center, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Li Li, Liver Disease Center, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China. lili519\_72@126.com

Received: 2007-04-19 Revised: 2007-08-10

## Abstract

The activation of hepatic stellate cells (HSCs) plays a central role in liver fibrogenesis. Transforming growth factor β (TGFβ) initiates the activation of HSCs. In HSCs, TGFβ signaling is mainly transduced through the ALK5/smad2/3 pathway. However, recent evidence has shown that the ALK1/smad1/5 pathway and non-Smad signaling also play important roles in the activation of HSCs. For determining an effective anti-TGFβ strategy for liver fibrosis, it is necessary to investigate the complex signaling of TGFβ in HSCs.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Transforming growth factor β; Signal transduction pathway

Li L, Wang BE. Transforming growth factor β signaling in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2516-2520

## 摘要

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化是肝纤维化形成的中心环节, 转化生长因子β(transforming growth factor β, TGFβ)启动了肝星状细胞的活化, TGFβ信号在HSC内主

要通过ALK5/smad2/3途径在HSC内传递, 而近年来的研究表明, ALK1/smad1/5途径及非smad信号也起非常重要的作用. 有必要对HSC中复杂的TGFβ信号进行研究, 为有效抗TGFβ治疗肝纤维化提供依据.

**关键词:** 肝星状细胞; 转化生长因子β; 信号转导通路

李丽, 王宝恩. 肝星状细胞中的TGFβ信号转导通路. *世界华人消化杂志* 2007;15(23):2516-2520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2516.asp>

## 0 引言

HSC活化并分泌大量细胞外基质, 是肝纤维化形成的中心环节. TGFβ因启动、促进HSC活化而在肝纤维化形成过程中起重要作用. HSC中TGFβ信号主要通过ALK5/smad2/3途径传递, 而近年来的研究表明, ALK1/smad1/5途径及非smad信号也起非常重要的作用<sup>[1-2]</sup>.

## 1 HSC内Smad依赖的TGFβ信号通路

TGFβ超家族包括多种信号蛋白, 如TGFβ单体、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、活化素(activin)等<sup>[3-4]</sup>, TGFβ通过其受体发挥作用<sup>[5-6]</sup>. TGFβ受体分3型: TβR I, TβR II, TβR III. 前两者为丝氨酸/苏氨酸受体, 配体与TβR II-TβR I结合形成异源性三聚体, TβR II激酶使TβR I磷酸化, 并激活TβR I激酶, 使特异性受体调节性Smads(regulation-smads, R-smads)磷酸化, 磷酸化的R-smads与通用Smads(common-partner-SMAD, CO-Smads)形成复合物转入核内参与靶基因的转录调节<sup>[7]</sup>.

TβR I 根据其激酶的不同又分为ALK1, ALK3, ALK5. TGFβ超家族信号可因配体及结合的受体不同分为两支<sup>[8-9]</sup>: 一支为TGFβ分支, 主要由TGFβ、活化素活化TβR I /ALK5受体, 激活Smad2, Smad3传导信号; 另一支为BMP分支, 主要由BMP、生长分化因子活化TβR I /ALK1受体, 激活Smad1, Smad5, Smad8向下游传递

信号. 在多数细胞类型, TGF $\beta$ 信号通过ALK5/Smad2/3传递. 既往认为ALK1特异性表达于内皮细胞, 最近的研究表明, HSC表面也有ALK1表达, 并通过第二支信号通路传递信号.

1.1 HSC内TGF $\beta$ /ALK5/Smad2/3途径及靶基因表达 TGF $\beta$ 可促进原代培养的HSC中Smad2的磷酸化、活化的HSC中Smad3磷酸化. 研究表明, Smad信号通路对TGF $\beta$ 介导的多种纤维性胶原基因的激活起关键作用, 包括COL1A1, COL1A2, COL3A1<sup>[10]</sup>等基因. 另有60多种ECM相关基因被认为是TGF $\beta$ 下游的即刻早期基因<sup>[11]</sup>, 如TIMP-1, PAI-1, b5整合素基因(INTB5)等.

Smad复合物进入细胞核内可直接与靶基因的启动子区反应元件相结合, 介导靶基因的上调<sup>[12]</sup>. Smad蛋白还可与其他转录因子相互作用, 促进或抑制基因的转录. Smad3与TFE3和Sp1相互作用, 分别活化PAI-1及COL1A2基因启动子<sup>[13-14]</sup>. 而Smad与AP-1的相互作用可加强<sup>[15-16]</sup>或减弱<sup>[17]</sup>基因的转录活性, 最终转录效应不仅取决于AP-1和/或Smad特异的cis元件, 还取决于两者的相对位置. 如果Smad特异序列远离功能性AP-1位点, 如PAI-1启动子, 则Smad靶基因转录活性增强, 且无需形成Smad/Jun二聚体. 相反, 如靶基因启动子的Smad特异反应元件内包含AP-1位点, Jun则通过结合、阻断Smad3的转录活化域, 直接抑制Smad功能<sup>[18]</sup>.

Smad还可通过与转录共刺激因子(如Ski相互作用蛋白或p300/CBP)相互作用而干扰其他转录因子的功能. Smad-p300/CBP相互作用对TGF $\beta$ 介导的胶原基因的转录激活是关键事件<sup>[19]</sup>. 干扰素- $\gamma$ 通过Jak-1诱导Stat1a, 后者与Smad3竞争p300/CBP, 从而抑制COL1A2基因的转录活性而发挥抗纤维化活性<sup>[20]</sup>.

TGF $\beta$ 除了调节细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的基因表达, 尚可影响与ECM代谢密切相关的间质性胶原酶(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)及其抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的表达. Smad3, Smad4(而不是Smad1)的过度表达可与p300/CBP竞争, 从而阻断IL-1介导的MMP-1的转录激活<sup>[21]</sup>. TGF $\beta$ 促进TIMP-1、同时抑制MMP-1的表达, 两者都存在启动子附近AP1位点, 是TGF $\beta$ 发挥作用的关键, 但作用机制不尽相同. MMP-1启动子AP-1位点上游存在TGF $\beta$ 抑制元件<sup>[22]</sup>, Smad3可直接与AP-1位点相互作用介导TGF $\beta$ 对MMP-1基因表达的抑制. 而包含Smad的

复合物并不与TIMP-1的AP-1位点作用, Smad的过度表达未能促进TGF $\beta$ 对TIMP-1表达的诱导, TGF $\beta$ 作用于Smad2, Smad3或Smad4敲除的细胞系仍然可以诱导TIMP-1的表达, c-Fos, JunD, c-Jun则对TGF $\beta$ 诱导TIMP-1表达非常重要<sup>[23]</sup>.

Smad3在纤维化形成中具有重要作用, 其证据来自靶向敲除Smad3的小鼠的应用, 与野生鼠相比, Smad3敲除小鼠肝内I型胶原mRNA表达及羟脯氨酸含量明显减少<sup>[24]</sup>. 因此, 靶向Smad3的成为重要的抗纤维化治疗方向.

1.2 TGF $\beta$ /ALK1/Smad1途径 ALK1及下游通路被认为仅在内皮细胞中表达, 在内皮细胞中, TGF $\beta$ /ALK1通过Smad依赖方式上调分化抑制蛋白1(inhibitor of differentiation 1, Id1), 促进细胞的增殖和迁移. Wiercinska *et al*<sup>[25]</sup>在最近的研究中发现, HSC也可通过T $\beta$ R I /ALK1/Smad1通路传递信号. 为筛选与纤维化形成有关的TGF $\beta$ 靶基因, 他们分析了HSC中Smad7依赖的基因表达谱, 发现Smad7的表达可强烈抑制Id1的表达, Id1过度表达又通过抑制Smad7及 $\alpha$ -SMA纤维形成而促进HSC的活化, 反之, Id1敲除使 $\alpha$ -SMA纤维形成减少, 从而抑制HSC的活化, 因此认为Id1是致纤维化的一个重要因子. 进一步的研究发现, HSC表面也存在ALK1的表达, TGF $\beta$ 信号对Id1表达的影响是通过T $\beta$ R I /ALK1/Smad1通路传递, 而非T $\beta$ R I /ALK5/Smad2/3通路, 抑制Smad2/3活化可以抑制ECM基因的上调, 然而对 $\alpha$ -SMA表达没有作用. 对ALK5的抑制不能阻止Smad1的磷酸化, 因此, Smad1的磷酸化似乎对于 $\alpha$ -SMA的聚合不可或缺. BMP是ALK1受体的天然配体, 有研究表明, BMP-2, BMP-4作用于HSC, 促进 $\alpha$ -SMA的表达明显上升, 对于HSC的转化促进作用较TGF $\beta$ 1更强<sup>[26]</sup>, 有力的支持了ALK1信号通路在HSC的表达. 体内实验也表明, 纤维化的肝组织内Id1表达明显增多, 同时磷酸化的Smad1增多. 在HSC活化过程中, Smad1表达的增加和磷酸化以往曾有报道<sup>[27]</sup>, 提示TGF $\beta$ /ALK1/Smad1依赖途径在肝纤维化的发生中可能起重要作用.

1.3 HSC中2种信号表达的意义 在内皮细胞中, 上述信号分别介导2种不同的效应, ALK1/Smad1/5的活化导致内皮细胞迁移和增殖, ALK5/Smad2/Smad3信号作用则相反<sup>[28-29]</sup>. 内皮细胞的最终活化状态依赖于2种信号的平衡. 同样, HSC和活化的HSC(MFB)接受TGF $\beta$ 刺激后也表现出不同的细胞内反应<sup>[30]</sup>, 主要表现在以

#### ■ 相关报道

既往研究对TGF $\beta$ 信号传导通路中ALK5/smad2/3途径在肝纤维化的形成中的意义及Smad蛋白对基因转录的调控机制已有了较为深入的了解, 但对HSC中ALK1/smad1/5途径的研究及报道较少, 此途径在内皮细胞的研究中较多, 最近有学者开始对此途径在HSC中的传递进行了探索性的研究(参见参考文献[25-26, 47]), 并发现其在肝纤维化的形成中具有重要作用.

## ■应用要点

TGF $\beta$ 可能通过多种信号转导途径促进肝纤维化的进展,对信号转导途径的深入研究可为有效抗TGF $\beta$ 治疗肝纤维化提供新的思路。

下几方面。

1.3.1 细胞生长受抑制情况不同 研究表明新分离静止的HSC在TGF $\beta$ 1作用后其增殖受到抑制,而活化的HSC则表现为增殖、收缩能力显著加强<sup>[31-32]</sup>。但均出现多种细胞外基质成分显著上调<sup>[33]</sup>。

1.3.2 TGF $\beta$ 受体表达情况 静止的HSC不表达T $\beta$ R I及T $\beta$ R II受体,或表达极微弱。培养活化后,受体mRNA及蛋白表达明显上升,但受体与配体亲和力明显下降,同时Smad4复合物与DNA的亲和力下降<sup>[34]</sup>。

1.3.3 TGF $\beta$ 下游信号传导情况 原代HSC接受内源性或外源性TGF $\beta$ 刺激后,最主要的细胞内信号蛋白改变在于Smad2, Smad3的磷酸化和抑制性Smad7的表达。静止的HSC极少见到Smad2磷酸化,活化后HSC中Smad2则出现明显磷酸化,且随着Smad2的高度磷酸化,Smad7表达显著升高<sup>[35]</sup>。而慢性肝损伤过程中,HSC呈现持续活化( $\alpha$ -SMA持续表达),Smad2磷酸化组成性表达,但Smad7表达持续在一较低水平。

静止的HSC受到TGF $\beta$ 处理,可出现Smad2和Smad3的磷酸化和核转位。活化的HSC接受TGF $\beta$ 处理后,没有出现磷酸化Smad2, Smad3的显著增加,提示MFB失去了对TGF $\beta$ 的敏感性<sup>[36]</sup>。

由于目前对HSC中ALK1/Smad1/5途径研究较少,上述不同是否与此有关尚需进一步证实,但为下一步研究提供了重要方向。

1.4 辅助性TGF $\beta$ 受体对不同信号途径的调节作用 TGF $\beta$ III型受体包括 $\beta$ 聚糖和endoglin,在TGF $\beta$ 信号转导中起间接作用。二者结构相似,都是跨膜受体,细胞内结构域较短,缺少酶作用基序,但包含许多丝氨酸、苏氨酸残基。 $\beta$ 聚糖的重要作用是促进TGF $\beta$ 2与T $\beta$ R II的结合。辅助受体endoglin仅与结合在T $\beta$ R II上的配体相结合,由于T $\beta$ R II与TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3比TGF $\beta$ 2具有更高的亲和力, endoglin与此二者作用更有效<sup>[37-38]</sup>。近年研究认为, endoglin在调节TGF $\beta$ /ALK1和TGF $\beta$ /ALK5信号通路过程中起重要作用。

Endoglin的胞外段与胞内段均可与T $\beta$ R II和ALK5相互作用,其胞内域富含丝氨酸、苏氨酸残基,可为ALK5及T $\beta$ R II磷酸化<sup>[39]</sup>。外源性表达endoglin能下调TGF $\beta$ 诱导的单核细胞及成肌细胞生长抑制<sup>[40]</sup>,还可抑制TGF $\beta$ 诱导的成肌细胞外基质的合成<sup>[41]</sup>。应用反义寡核苷酸或endoglin中和抗体作用于内皮细胞,可以加强TGF $\beta$ 对内皮细胞迁移、生长的抑制作用<sup>[42-43]</sup>,

而这些作用是由ALK5介导的<sup>[44]</sup>,因此,可以认为endoglin是TGF $\beta$ /ALK5信号通路的负性调节因子。与此相一致,外源性表达endoglin可以抑制Smad3的转录活性<sup>[45]</sup>。

由于ALK1或endoglin的变异均可导致遗传性出血性毛细血管扩张症,因此可能两者具有共同的信号通路。最近的研究认为, endoglin是ALK1磷酸化的底物, TGF $\beta$ /ALK1信号需要endoglin。并且, endoglin表达水平决定了内皮细胞的生长能力。缺乏endoglin的情况下, ALK1信号减弱同时ALK5信号增强,内皮细胞生长受抑。Endoglin可能作为TGF $\beta$ /ALK1和TGF $\beta$ /ALK5之间平衡的一个调节因子。目前的研究结果支持这样的模型: endoglin刺激TGF $\beta$ /ALK1信号同时间接抑制TGF $\beta$ /ALK5信号,从而促进血管生成相的活化<sup>[46]</sup>。

HSC中存在2种TGF $\beta$ 信号通路,其调控机制尚不清楚。最近研究表明HSC表面同样存在endoglin的表达<sup>[47]</sup>,且在转化的HSC中, endoglin的表达水平增高。是否endoglin通过与内皮细胞类似的调节方式调节肝HSC的致纤维化反应仍需进一步研究。

## 2 TGF $\beta$ 的非Smad通路

除了TGF $\beta$ /Smad通路, TGF $\beta$ 还可活化其他的信号级联反应<sup>[48]</sup>。TGF $\beta$ 能活化Erk, JNK及p38 MAPK激酶通路,并可能独立于Smad而发挥作用<sup>[49]</sup>,如活化NF- $\kappa$ B导致生物学效应。Erk, JNK途经的激活还可导致并调节Smad的磷酸化<sup>[50]</sup>,将MAPK与Smad信号联系起来。TGF $\beta$ 诱导的Ras/Erk MAPK信号能诱导TGF $\beta$ 1的表达,从而扩大TGF $\beta$ 的反应<sup>[51]</sup>。TGF $\beta$ 依赖的p38MAPK途径可以上调HSC细胞外基质的表达<sup>[52]</sup>,如I型胶原和凝血酶敏感素-2(TSP-2)。

TGF $\beta$ 诱导MAPK通路活化,也可能直接影响Smad相互作用转录因子,如JNK底物c-Jun或p38MAPK底物活化转录因子2(activating transcription factor 2, ATF-2),从而将Smad通路与MAPK通路联系起来<sup>[5]</sup>。两条通路既相互促进,又相互拮抗。TGF $\beta$ 活化Smad和MAPK通路的双重能力对TGF $\beta$ 诱导的上皮细胞向间质细胞的转化起重要作用<sup>[53]</sup>; c-Jun可通过Smad共抑制因子相互作用抑制Smad2的信号通路,这种作用是通过JNK信号调节,而Smad7可加强和维持JNK的活化<sup>[54]</sup>,因此, Smad与MAPK通路之间活化平衡可能最终决定细胞对TGF $\beta$ 信号的反应。

由于TGF $\beta$ 在肝纤维化进展中的重要作用, 抗TGF $\beta$ 治疗方兴未艾. 然而, TGF $\beta$ 在体内作用广泛, 需要更深入了解其复杂的信号传导通路及相互之间的关系, 为寻找有效治疗肝纤维化的方法提供理论依据.

### 3 参考文献

- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004; 16: 291-299
- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 1993; 8: 1-9
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999; 13: 2105-2124
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998; 95: 737-740
- Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-3584
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001; 187: 265-276
- Lai CF, Feng X, Nishimura R, Teitelbaum SL, Avioli LV, Ross FP, Cheng SL. Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 36400-36406
- Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; 276: 17058-17062
- Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 2001; 20: 3332-3340
- Inagaki Y, Nemoto T, Nakao A, Dijke Pt, Kobayashi K, Takehara K, Greenwel P. Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific alpha 2(I) collagen gene transcription. *J Biol Chem* 2001; 276: 16573-16579
- Zhang W, Ou J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 39237-39245
- Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 1998; 394: 909-913
- Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang XF. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4844-4849
- Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 30226-30231
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 211-215
- Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Varga J. Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* 2000; 19: 3546-3555
- Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Chen Sj, Varga J. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 2001; 276: 11041-11048
- Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* 2001; 276: 38502-38510
- White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259-268
- Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 2003; 278: 10304-10313
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3056-3062
- Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM, Thorikay M, ten Dijke P, Mertens PR, Breitkopf K, Dooley S. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006; 43: 1032-1041
- Shen H, Huang GJ, Gong YW. Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 784-787
- Shen H, Huang G, Hadi M, Choy P, Zhang M, Minuk GY, Chen Y, Gong Y. Transforming growth factor-beta1 downregulation of Smad1 gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G539-546
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002; 193: 299-318
- Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 1996; 383: 441-443
- Mucsi I, Skorecki KL, Goldberg HJ. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects

### ■同行评价

本文就肝星状细胞中的TGF $\beta$ 信号转导通路进行了文献回顾, 选题较新颖, 行文流畅, 从一个侧面详细概述了肝星状细胞与TGF $\beta$ 的关系, 有一定的学术价值.

- of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 16567-16572
- 31 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 32 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003; 278: 11721-11728
- 33 Knittel T, Janneck T, Muller L, Fellmer P, Ramadori G. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology* 1996; 24: 352-360
- 34 Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 554-562
- 35 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
- 36 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10
- 37 Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999; 274: 584-594
- 38 Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998; 273: 33011-33019
- 39 Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002; 277: 29197-29209
- 40 Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 1996; 133: 1109-1121
- 41 Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S, Duwell A, Eleno N, Bernabeu C, Pandiella A, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Barbero A. Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 301-310
- 42 Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14: 55-64
- 43 She X, Matsuno F, Harada N, Tsai H, Seon BK. Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells. *Int J Cancer* 2004; 108: 251-257
- 44 Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 2002; 21: 1743-1753
- 45 Guo B, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* 2004; 24: 1337-1345
- 46 Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 2004; 23: 4018-4028
- 47 Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 3078-3087
- 48 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- 49 Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; 274: 37413-37420
- 50 Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 41361-41368
- 51 Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol* 2000; 142: 125-131
- 52 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 53 Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 2002; 115: 3193-3206
- 54 Pessah M, Marais J, Prunier C, Ferrand N, Lallemand F, Mauviel A, Atfi A. c-Jun associates with the oncoprotein Ski and suppresses Smad2 transcriptional activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 29094-29100

编辑 程剑侠 电编 张敏



# 过氧化物酶增殖物激活受体 $\delta$ 研究进展

于丹, 马红

于丹, 马红, 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: 马红, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心. mahongmd@yahoo.com.cn

电话: 010-63138727

收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-08-08

## Advances in the study of peroxisome proliferator-activated receptors $\delta$

Dan Yu, Hong Ma

Dan Yu, Hong Ma, Liver Research Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Hong Ma, Liver Research Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. mahongmd@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-11 Revised: 2007-08-08

## Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a group of well-studied nuclear receptor isoforms. PPARs are intimately connected to cellular metabolism (carbohydrate, lipid and protein) and cell differentiation. PPARs are ligand-activated transcription factors, as well as being a group of nuclear receptor isoforms. Since PPARs were first reported in the 1990s, their biological functions in cellular metabolism, differentiation and disease relative effects have been thoroughly investigated. PPARs have three subtypes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  and PPAR $\gamma$ . The biological function and relationship to disease of PPAR $\delta$  have become the focus of research, with the discovery of a special selective agonist of PPAR $\delta$ . PPAR $\delta$  is one of the main factors that regulate adipocyte differentiation and energy dissipation. Furthermore, PPAR $\delta$  also participates in the development of several diseases. PPAR $\delta$  agonists are expected to become effective drugs for treating metabolic syndrome.

**Key Words:** Peroxisome proliferator-activated receptors

Yu D, Ma H. Advances in the study of peroxisome proliferator-activated receptors  $\delta$ . Shijie Huaren Xiaohua

Zazhi 2007; 15(23): 2521-2525

## 摘要

过氧化物酶增殖物激活受体(PPARs)是配体激活转录因子, 属于核受体超家族. 自1990年PPARs被发现以来, 其在物质代谢、组织细胞分化与疾病的相关性等方面的功能作用逐渐得到认识和重视. PPARs有3种亚型, 分别为PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$ 和PPAR $\gamma$ . 随着PPAR $\delta$ 特异选择性激动剂的发现, PPAR $\delta$ 的生物学功能及其与各种疾病的关系渐渐成为研究热点. 目前已经发现PPAR $\delta$ 主要控制脂肪组织和骨骼肌细胞的脂类代谢和能量平衡, 并参与许多疾病的发生和发展过程. 并且PPAR $\delta$ 作为治疗靶点, 他的合成激动剂有望开发成为治疗代谢综合症的有效药物.

**关键词:** 过氧化物酶增殖物激活受体

于丹, 马红. 过氧化物酶增殖物激活受体 $\delta$ 研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2521-2525

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2521.asp>

## 0 引言

过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是1990年发现的, 随着对PPARs研究的深入, 其在物质代谢、组织细胞分化、与疾病的相关性等方面的功能作用逐渐得到认识和重视<sup>[1-3]</sup>. PPARs是配体激活转录因子, 属于核受体超家族, 其分布具有高度的组织选择性, PPAR $\alpha$ 在肝脏、肾脏、骨骼、心肌和肾上腺组织中高表达; PPAR $\delta/\beta$ 几乎在所有的哺乳动物组织中表达; PPAR $\gamma$ 则在脂肪组织、巨噬细胞、血管平滑肌中表达<sup>[4]</sup>. PPARs与维甲酸受体(retinoid X receptor, RXR)结合形成异二聚体, 再与PPAR反应元件(PPRE)结合, 发挥调节脂质代谢和能量平衡的生物学功能<sup>[5-6]</sup>. PPAR $\alpha$ 能与其天然配体白三烯B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)以及具有降血脂作用的贝特类药物(fibrates)结合, 增强肝脏和心脏的脂肪酸摄取与氧化<sup>[7-8]</sup>; 前列腺素D<sub>2</sub>(prostaglandin D<sub>2</sub>)代谢产物15d-PGJ<sub>2</sub>, 是第

## ■背景资料

过氧化物酶增殖物激活受体(PPARs)是一类由配体激活的核转录因子. 为核受体超家族中的成员, 有PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$ 和PPAR $\gamma$  3种亚型. PPARs对机体糖脂代谢以及能量平衡具有调节作用.

## ■相关报道

多数学者认为PPAR $\delta$ 通过上调能量消耗相关基因的表达,抑制肥胖和高脂血症的发生;一些学者发现肿瘤细胞PPAR $\delta$ 的表达增加,并且与细胞的恶性程度相关,认为PPAR $\delta$ 与肿瘤的发生有关。

一个发现的内源型PPAR $\gamma$ 配体<sup>[9]</sup>,噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)是PPAR $\gamma$ 的特异选择性合成配体,两种配体均可以增加PPAR $\gamma$ 调节的转录激活。目前PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 人工合成配体fibrates类降脂药物和TZDs类降糖药物均已应用于临床。2003年葛兰素史克发现了PPAR $\delta$ 的特异选择性激动剂GW501516,从而对他的生物学功能的研究才引起人们关注<sup>[10]</sup>。

## 1 PPAR $\delta$ 的研究现状

**1.1 PPAR $\delta$ 的组织分布及其配体** 1992年, Schmidt *et al*<sup>[11]</sup>首先在人骨肉瘤细胞库中发现PPAR $\delta$ / $\beta$ 。PPAR $\delta$ 广泛分布于多种组织细胞的核内<sup>[12]</sup>。前列腺素I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)和饱和脂肪酸是PPAR $\delta$ 的配体,但这些配体同时也可激活PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 。天然的低密度脂蛋白颗粒可能是PPAR $\delta$ 的内源性配体,脂蛋白脂肪酶水解极低密度脂蛋白(VLDL)产生的甘油三酯是巨噬细胞中PPAR $\delta$ 最有效的激活剂<sup>[13]</sup>。GW501516是最早发现的PPAR $\delta$ 高亲和力合成配体,他与PPAR $\delta$ 的结合力较PPAR的其他亚型高1000倍以上。在和受体结合后PPAR $\delta$ 表达上调,而鼠禁食过夜后,肝脏和肾脏的PPAR $\delta$ 的mRNA表达水平下降达80%<sup>[14]</sup>。

PPAR $\delta$ 有6个功能结构域分别为:氨基端A/B区为不依赖配体的细胞、组织特异性的转录激活功能区;C区为DNA结合区(DBD),主要参与DNA的顺序识别;羧基端E/F区是配体结合区(LBD),并可与RXR形成异二聚体,形成配体依赖性转录激活/抑制功能区;D区作为铰链区连接DBD和LBD<sup>[15]</sup>。PPAR $\delta$ 与其天然或合成配基结合后,活化的PPAR $\delta$ 与RXR形成异二聚体,然后识别并与靶基因启动子上游的PPRE结合,调节靶基因下游的基因转录、翻译及生物学效应。但是关于其合成配体发挥生物学活性的通路也存在不同说法, Kramer *et al*<sup>[16]</sup>认为PPAR $\delta$ 激动剂GW501516可以通过依赖和不依赖于PPAR $\delta$ 和AMPK这两种途径来改善人骨骼肌细胞的糖脂代谢。Choi *et al*<sup>[17]</sup>通过体内和体外的试验均证实,PPAR $\delta$ 激动剂L-165041能够增加大鼠内脏脂肪内脏素和脂联素的基因表达,同时降低抵抗素的表达;这说明PPAR $\delta$ 激动剂还能够通过调节脂肪因子的表达的途径调节机体的糖和脂肪代谢。

**1.2 PPAR $\delta$ 与脂肪细胞分化** PPARs是调节脂肪细胞分化的转录因子之一。Bastie *et al*<sup>[18-19]</sup>发现,在表达PPAR $\delta$ 的成纤维细胞(3T3C2)中,脂肪酸能够激活细胞的PPAR $\delta$ ,引起编码脂肪酸转运体、

脂质结合蛋白以及PPAR $\gamma$ 的基因转录活性增强,从而促进脂肪细胞的最终分化;在前脂肪细胞系(Ob1771或3T3-F442A)中,PPAR $\delta$ 还能够使细胞分化能力和对脂肪酸的敏感性均明显增强,但对脂肪酸决定的脂肪细胞最终分化只是中度地促进。总之,体外试验表明,内源性PPAR $\delta$ 与脂肪酸具有协同作用,增加PPAR $\gamma$ 的表达;促进脂肪细胞分化。

**1.3 PPAR $\delta$ 与脂质代谢** 自发现PPARs家族以来,其调节糖、脂代谢的功能一直倍受关注。Wang *et al*<sup>[20]</sup>研究发现,脂肪组织PPAR $\delta$ 活化后能够促进脂肪酸氧化以及能量消耗相关基因的表达,抑制高脂饮食引起的肥胖和高脂血症;活化的PPAR $\delta$ 还能抑制Lepr(db/db)鼠棕色脂肪组织和肝中的脂肪蓄积,以GW501516刺激骨骼肌细胞,得出相同结论<sup>[21]</sup>。Holst *et al*<sup>[22]</sup>发现小鼠禁食24 h后,腓肠肌PPAR $\delta$ 的表达上调,PPAR $\delta$ 激动剂GW1514能诱导C2C12肌细胞中与脂肪酸摄取和代谢相关的基因表达。PPAR $\delta$ 活化后能升高褐色脂肪组织中解偶联蛋白UCP1,UCP2,UCP3表达水平,促进白色脂肪组织中UCP1升高。PPAR $\delta$ 活化后,可能通过促进脂肪酸的 $\beta$ 氧化和解偶联氧化磷酸化而起到降脂作用。

在体内试验中,PPAR $\delta$ 的激动剂L2165041处理db/db鼠的研究中发现,发现血液中的高密度脂蛋白(HDL)增加,从而有利于胆固醇的逆转运<sup>[23]</sup>,说明PPAR $\delta$ 激动剂还与胆固醇的代谢有关。Akiyama *et al*<sup>[24]</sup>用PPAR $\delta$ 基因敲除小鼠研究了高脂饮食引起的血浆和肝中脂的改变,经过10 wk高脂饮食饲养,基因敲除鼠血浆中的VLDL, TG水平明显升高,肝中VLDL含量增加,而脂蛋白脂酶(LPL)活性降低,肝中脂肪蓄积减少。结果提示,PPAR $\delta$ 也可以通过调节VLDL的产生和LPL介导的VLDL-TG代谢来调整小鼠血浆中的TG水平。此外,PPAR $\delta$ 能够调节组织对环境改变的代谢适应性,PPAR $\delta$ 的激动剂可以使肥胖动物的各项代谢指标正常化,促进骨骼肌和脂肪组织的脂质动员<sup>[25-26]</sup>。

PPAR $\delta$ 对骨骼肌细胞的作用能够扩展到对心脂质代谢领域的研究。Gilde *et al*<sup>[27]</sup>发现PPAR $\alpha$ 和PPAR $\delta$ 对调节心脂质代谢发挥重要作用。PPAR $\delta$ 激动剂GW0742还能够部分恢复从PPAR $\delta$ 敲除大鼠分离的心肌细胞与脂肪酸氧化相关的主要基因的表达。Cheng *et al*<sup>[28]</sup>发现PPAR $\delta$ 敲除小鼠,由于心肌脂肪酸氧化,发生心功能不全,进行性心肌脂肪蓄积,心肌肥厚和充

血性心力衰竭. 在表达PPAR $\delta$ 的小鼠, GW0742能够增高离体心肌细胞脂肪酸氧化相关基因的转录水平; 而PPAR $\delta$ 敲除小鼠没有反应. 这些数据表明PPAR $\delta$ 与PPAR $\alpha$ 均和心脏脂肪酸氧化有关系.

Sprecher *et al*<sup>[29]</sup>首次给人注射了PPAR $\delta$ 激动剂, 发现GW501516能够显著增高健康人的高密度脂蛋白和甘油三酯, 增加血浆脂肪清除率; 并且首次报道在离体试验中, GW501516增加人骨骼肌细胞脂肪的利用以及ATP结合盒转运子(ABCA1)的表达; 这些表明外周脂肪利用和脂化作用是PPAR $\delta$ 改变HDL: TG的潜在机制.

## 2 PPAR $\delta$ 与疾病的关系

**2.1 PPAR $\delta$ 与胰岛素抵抗** GW501516能够诱导骨骼肌细胞丙酮酸脱氢酶的mRNA表达, 继而增加葡萄糖氧化, 糖异生和PGC-1 $\alpha$ 的形成<sup>[30]</sup>; PGC-1 $\alpha$ 与胰岛素敏感性相关, PPAR $\delta$ 能够与其启动子结合, 增强PGC-1 $\alpha$ 转录活性, 从而促进细胞的氧化代谢<sup>[31]</sup>. Dressel *et al*<sup>[21]</sup>也发现PPAR $\delta$ 的活化能升高骨骼肌细胞中编码脂肪酸氧化的酶类基因的表达, 同时能降低高脂饮食和遗传型肥胖鼠血中胰岛素和葡萄糖的水平, 增加糖耐量. 但是PPAR $\delta$ 与胰岛素抵抗关系的说法并没有定论. Brunmair *et al*<sup>[32]</sup>研究发现GW501516诱导的PPAR $\delta$ 活性增强通过控制线粒体酶对作用底物(碳水化合物或脂质)的选择, 减少骨骼肌细胞对葡萄糖的利用. Debard *et al*<sup>[33]</sup>也认为肌细胞短期暴露在PPAR $\delta$ 激动剂环境, 脂肪酸氧化的增高并不足以纠正2型糖尿病患者的胰岛素抵抗.

**2.2 PPAR $\delta$ 与动脉粥样硬化** PPAR $\delta$ 活化通过增加A和B类清道夫受体(SR-A/B)以及脂肪分化相关蛋白(adipophilin), 使人的巨噬细胞脂质蓄积增加. 感染促进血脂异常发展形成粥样斑块. Welch *et al*<sup>[34]</sup>研究发现, PPAR $\gamma$ 激活剂抑制动脉粥样硬化的发生机制是, PPAR $\delta$ 活化和巨噬细胞建立重叠的PPAR $\delta$ 和PPAR $\gamma$ 转活和反式阻抑作用. PPAR $\gamma$ 的活化抑制了脂多糖或干扰素 $\gamma$ (INF- $\gamma$ )的敏感基因, 所以PPAR $\delta$ 活化后能够引起巨噬细胞抗感染作用. 与体外试验结果相反, 野生型小鼠与巨噬细胞PPAR $\delta$ 敲除的小鼠使用或不使用GW501516, 巨噬细胞SR-A, CD<sub>36</sub>的表达均没有变化. 他们还发现, 在LDL受体敲除的小鼠表现出较少的动脉粥样硬化发生, 这表明PPAR $\delta$ 缺失加强了抗炎转录抑制物的释放. PPAR $\delta$ 过表达通过降低抗炎抑制物的释放, 使巨

噬细胞单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)水平增加. PPAR $\delta$ 与动脉粥样硬化的关系还存在很多不同的说法, Li *et al*<sup>[35]</sup>发现另一种PPAR $\delta$ 配体, GW0742, 不能降低LDL受体敲除小鼠的动脉粥样硬化. 在LDL受体敲除小鼠, GW0742对TC, HDL-C和LDL-C仅有轻微影响, 降低VLDL或TG的作用亦不明显<sup>[35-36]</sup>. Aberle *et al*<sup>[37]</sup>则首次发现PPAR $\delta$ 基因+T294C多态性与女性脂质水平和冠心病相关.

**2.3 PPAR $\delta$ 与肿瘤的关系** PPARs在肿瘤细胞系及组织中高表达有利于PP类致癌物质发挥其致癌作用. 研究报道PPAR $\delta$ 信号转导通路在结直肠癌发生、发展过程起重要作用, 其详细调控机制尚不清楚<sup>[38-40]</sup>. PPAR $\delta$ 与肿瘤关系的研究, 以其与结肠癌的关系为研究热点. 在结肠癌的发生上, PPAR $\delta$ 的作用存在争议, Wang *et al*<sup>[41]</sup>发现PPAR $\delta$ 基因敲除能够抑制Apc(Min/+)小鼠小肠腺瘤的生长; 在结肠癌细胞中, PPAR $\delta$ 能上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达, 而VEGF能够通过激活PI3K-Akt信号通路, 直接促进结肠肿瘤上皮细胞存活. 这些结果强调慎重应用PPAR $\delta$ 激动剂治疗具有高度结肠癌危险患者的代谢紊乱, 同时也提示研发PPAR $\delta$ 的抑制剂用于预防和治疗肿瘤的可能<sup>[42-43]</sup>. Takayama *et al*<sup>[44]</sup>检测了PPAR $\delta$ 在结肠直肠癌(CRC)的多阶段致癌的表达, 客观评价了PPAR $\delta$ 与CRC的相关性. 他们研究发现, 在正常黏膜向腺瘤性息肉和CRC转变的过程中, PPAR $\delta$ 的表达增高. 在癌组织中, PPAR $\delta$ 蛋白仅聚集于有恶性形态学改变的肿瘤细胞<sup>[45]</sup>. 研究者认为PPAR $\delta$ 表达与CRC患者细胞恶性形态学的密切关系提示PPAR $\delta$ 可能在肿瘤发生过程中具有重要作用<sup>[46-48]</sup>.

也有一些学者对PPAR $\delta$ 与其他肿瘤的关系做了研究分析. Piqueras *et al*<sup>[49]</sup>发现PPAR $\delta$ 能通过VEGF调节内皮细胞增殖和血管形成的因子. 研究者指出, GW501516治疗脂质代谢紊乱应该谨慎观察患者, 预防发生血管性疾病. Xu *et al*<sup>[50]</sup>发现低剂量GW501516能够促进人的胆管癌细胞增殖, PPAR $\delta$ 诱导人胆管癌细胞的环氧化酶2(COX-2)表达, COX-2衍生的PGE2使PPAR $\delta$ 进一步活化, 这种正反馈在胆管癌细胞生长中发挥重要作用, 可能成为预防和治疗胆管癌的新分子靶点.

总之, 目前对PPAR $\delta$ 生物学作用的研究仍处于初级阶段, 但已证实其对脂肪代谢和脂肪分化具有重要调节作用. PPAR $\delta$ 对胰岛素抵抗, 动

### ■创新盘点

本文就PPAR $\delta$ 研究现状及其与肿瘤、胰岛素抵抗等疾病的关系两方面给予了较全面的阐述, 对当今PPAR $\delta$ 的研究热点和国外学者取得的成果作了较系统的总结, 并对PPAR $\delta$ 发展前景提出看法.

### ■应用要点

PPAR $\delta$ 与体内糖和脂肪代谢,以及肿瘤,动脉粥样硬化等相关,对PPAR $\delta$ 的研究有助于进一步了解其对代谢综合征以及肿瘤发生的调控机制,为PPAR $\delta$ 成为治疗的新靶点提供理论支持。

脉粥样硬化以及CRC的发生、发展的影响仍需进一步研究证实。PPAR $\delta$ 发挥生物学作用的各种下游信号也仍不清楚,与各种脂肪因子如脂联素、瘦素等以及PPARs亚型之间相互影响的关系也不明确,这些都需要进一步研究探讨。

### 3 参考文献

- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 2006; 86: 465-514
- Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 545-554
- Nehlin JO, Mogensen JP, Petterson I, Jeppesen L, Fleckner J, Wulff EM, Sauerberg P. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 448-453
- Braissant O, Fufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137: 354-366
- Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1440-1444
- Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992; 11: 433-439
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7473-7478
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-1498
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999; 400: 378-382
- Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, Sierra ML, LeGrumelec C, Xu HE, Montana VG, Lambert MH, Willson TM, Oliver WR Jr, Sternbach DD. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 1517-1521
- Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1634-1641
- Higashiyama H, Billin AN, Okamoto Y, Kinoshita M, Asano S. Expression profiling of peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR-delta) in mouse tissues using tissue microarray. *Histochem*

*Cell Biol* 2007; 127: 485-494

- Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1268-1273
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001; 142: 4195-4202
- Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 790-798
- Kramer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A. Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007; 282: 19313-19320
- Choi KC, Lee SY, Yoo HJ, Ryu OH, Lee KW, Kim SM, Baik SH, Choi KM. Effect of PPAR-delta agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 62-67
- Bastie C, Holst D, Gaillard D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; 274: 21920-21925
- Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 38768-38773
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170
- Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2477-2493
- Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1633: 43-50
- Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 2000; 473: 333-336
- Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem* 2004; 279: 20874-20881
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 313-317
- Grimaldi PA. Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) in muscle metabolism. A new target for metabolic

- syndrome treatment? *Biochimie* 2005; 87: 5-8
- 27 Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 2003; 92: 518-524
  - 28 Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, Yang Q. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 2004; 10: 1245-1250
  - 29 Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Hassall DG, Ancellin N, Patterson SD, Lobe DC, Johnson TG. Triglyceride: high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 359-365
  - 30 Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15924-15929
  - 31 Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, Giral M. PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 1021-1027
  - 32 Brunmair B, Staniek K, Dorig J, Szocs Z, Stadlbauer K, Marian V, Gras F, Anderwald C, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C. Activation of PPAR-delta in isolated rat skeletal muscle switches fuel preference from glucose to fatty acids. *Diabetologia* 2006; 49: 2713-2722
  - 33 Debard C, Cozzone D, Ricard N, Vouillarmet J, Disse E, Husson B, Laville M, Vidal H. Short-term activation of peroxysome proliferator-activated receptor beta/delta increases fatty acid oxidation but does not restore insulin action in muscle cells from type 2 diabetic patients. *J Mol Med* 2006; 84: 747-752
  - 34 Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6712-6717
  - 35 Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Vallerod AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* 2004; 114: 1564-1576
  - 36 Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, Palmer CN, Patel L. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis* 2005; 181: 29-37
  - 37 Aberle J, Hopfer I, Beil FU, Seedorf U. Association of the T+294C polymorphism in PPAR delta with low HDL cholesterol and coronary heart disease risk in women. *Int J Med Sci* 2006; 3: 108-111
  - 38 Koh WP, Yuan JM, Van Den Berg D, Ingles SA, Yu MC. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma gene polymorphisms and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1797-1802
  - 39 Grau R, Punzon C, Fresno M, Iniguez MA. Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J* 2006; 395: 81-88
  - 40 Yang L, Zhou ZG, Luo HZ, Zhou B, Xia QJ, Tian C. Quantitative analysis of PPARdelta mRNA by real-time RT-PCR in 86 rectal cancer tissues. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 181-185
  - 41 Wang D, Wang H, Guo Y, Ning W, Katkuri S, Wahli W, Desvergne B, Dey SK, DuBois RN. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 19069-19074
  - 42 Marin HE, Peraza MA, Billin AN, Willson TM, Ward JM, Kennett MJ, Gonzalez FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 4394-4401
  - 43 Knutsen HK, Olstorn HB, Paulsen JE, Husoy T, Goverud IL, Loberg EM, Kristiansen K, Alexander J. Increased levels of PPARbeta/delta and cyclin D1 in flat dysplastic ACF and adenomas in Apc(Min/+) mice. *Anticancer Res* 2005; 25: 3781-3789
  - 44 Takayama O, Yamamoto H, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Xu X, Tsujino T, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Expression of PPARdelta in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology. *Br J Cancer* 2006; 95: 889-895
  - 45 马向涛, 余力伟, 张在兴, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. 趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在结直肠癌肝转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1566-1570
  - 46 Linsalata M, Giannini R, Notarnicola M, Cavallini A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expressions are significantly correlated in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 191
  - 47 Kim E, Chen F, Wang CC, Harrison LE. CDK5 is a novel regulatory protein in PPARgamma ligand-induced antiproliferation. *Int J Oncol* 2006; 28: 191-194
  - 48 Siezen CL, Tijhuis MJ, Kram NR, van Soest EM, de Jong DJ, Fodde R, van Kranen HJ, Kampman E. Protective effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas is modified by a polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 43-50
  - 49 Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 63-69
  - 50 Xu L, Han C, Wu T. A novel positive feedback loop between peroxisome proliferator-activated receptor-delta and prostaglandin E2 signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth. *J Biol Chem* 2006; 281: 33982-33996

## 同行评价

本文紧紧围绕PPAR $\delta$ 与代谢综合征的关系进行综述,行文流畅,内容丰富,有一定的可读性和学术价值,是一篇较好的综述。

编辑 程剑侠 电编 张敏



# 复方五味子素B及其成分体外抑制胃癌细胞的增殖

刘晓霓, 张承玉, 李月珍, 金秀东, 郑学芝, 李丽

## ■背景资料

实现中药现代化是中药产业发展的唯一出路, 将中药有效成分合理组方可能是开发发现代化复方中药的有效方法和途径之一。胃癌的发病率和死亡率居恶性肿瘤前位, 开发抗胃癌药物具有重要的社会意义。

刘晓霓, 张承玉, 李月珍, 金秀东, 郑学芝, 李丽, 牡丹江医学院生理教研室 黑龙江省牡丹江市 157011  
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. TD2005-01  
黑龙江省卫生厅课题资助项目, No. 2006-391  
通讯作者: 刘晓霓, 157011, 黑龙江省牡丹江市, 牡丹江医学院生理教研室. liuxiaoni888@yahoo.com.cn  
电话: 0453-6582156-3384  
收稿日期: 2007-03-09 修回日期: 2007-08-06

## Inhibitory effects of the components of Schisandrin compound on gastric cancer cells *in vitro*

Xiao-Ni Liu, Cheng-Yu Zhang, Yue-Zhen Li, Xiu-Dong Jin, Xue-Zhi Zheng, Li Li

Xiao-Ni Liu, Cheng-Yu Zhang, Yue-Zhen Li, Xiu-Dong Jin, Xue-Zhi Zheng, Li Li, Department of Physiology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. TD2005-01; Heilongjiang Health Department Research Fund, No. 2006-391

Correspondence to: Xiao-Ni Liu, Department of Physiology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China. liuxiaoni888@yahoo.com.cn  
Received: 2007-03-09 Revised: 2007-08-06

## Abstract

**AIM:** To screen the constituent parts of Schisandrin compound, and to ascertain the best composition by comparing the inhibitory effects of Schisandrin compound and its ingredients on gastric cancer cells *in vitro*.

**METHODS:** An orthogonal design was used to screen for the best composition of Schisandrin compound. MTT assay was used to examine the inhibitory effects of Schisandrin compound and its ingredients on gastric cancer cells. Data from 10 groups were analyzed: normal control (medium), negative control (2 g/L DMSO), positive control (50 mg/L 5-fluorouracil), low concentration Schisandrin (50 mg/L), high concentration Schisandrin (100 mg/L), low concentration aloe emodin (50 mg/L), high concentration aloe emodin (100 mg/L), low concentration *Astragalus polysaccharides* (50 mg/L), high concentration *Astragalus polysaccharides* (200 mg/L) and

Schisandrin compound.

**RESULTS:** The best combinations of Schisandrin, aloe emodin and *Astragalus polysaccharides* were 100 mg/L, 50 mg/L and 50 mg/L, respectively. Compared with the negative control group, the absorbance of low concentration Schisandrin, high concentration Schisandrin, low concentration aloe emodin, high concentration aloe emodin and Schisandrin compound at 490 nm wavelength was substantially decreased ( $0.296 \pm 0.011$ ,  $0.260 \pm 0.012$ ,  $0.376 \pm 0.017$ ,  $0.334 \pm 0.013$ ,  $0.162 \pm 0.007$  vs  $0.427 \pm 0.018$ ,  $P < 0.05$ ), whereas the inhibitory rate of low concentration Schisandrin (26.26%  $\pm$  4.65%), high concentration Schisandrin (39.11%  $\pm$  5.13%), high concentration aloe emodin (21.78%  $\pm$  3.67%) and Schisandrin compound (52.06%  $\pm$  9.87%) clearly increased.

**CONCLUSION:** Creating effective compounds of traditional Chinese medicines by enhancing the effect of a particularly effective component may be one way to exploit modern traditional Chinese medicinal compounds.

**Key Words:** Schisandrin; Aloe emodin; *Astragalus polysaccharides*; MTT assay; Gastric Cancer

Liu XN, Zhang CY, Li YZ, Jin XD, Zheng XZ, Li L. Inhibitory effects of the components of Schisandrin compound on gastric cancer cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2526-2529

## 摘要

**目的:** 筛选复方五味子素组方最佳配比, 比较复方五味子素B及其成分对胃癌细胞的增殖抑制作用。

**方法:** 采用 $L_4(2^3)$ 正交设计的方法筛选药物的最佳配比。用MTT的方法观察组方及其成分对胃癌细胞的增殖抑制作用。空白对照组加培养液; 阴性对照和阳性对照组分别加DMSO和5-氟尿嘧啶(5-FU)。

**结果:** 高浓度五味子乙素(100 mg/L)、低浓度芦荟大黄素(50 mg/L)、低浓度黄芪多糖(50 mg/L)组方为复方五味子素B的药物最佳配

比. 同阴性对照组( $0.427 \pm 0.018$ )相比, 五味子乙素低浓度( $0.296 \pm 0.011$ )和高浓度组( $0.260 \pm 0.012$ )、芦荟大黄素低浓度( $0.376 \pm 0.017$ )和高浓度组( $0.334 \pm 0.013$ ), 复方五味素B组( $0.162 \pm 0.007$ )在波长490 nm处的吸光度A值均显著性降低( $P < 0.01$ ); 增殖抑制率结果显示, 五味子乙素低浓度( $26.26\% \pm 4.65\%$ )和高浓度组( $39.11\% \pm 5.13\%$ ), 芦荟大黄素高浓度组( $21.78\% \pm 3.67\%$ ), 复方五味素B组( $52.06\% \pm 9.87\%$ )抑制率均明显增高。

**结论:** 合理的中药有效成分组方可能有效提高单纯中药有效成分的作用, 将中药有效成分合理组方可能是开发现代化复方中药的有效方法和途径之一。

**关键词:** 五味子乙素; 芦荟大黄素; 黄芪多糖; MTT法; 胃癌

刘晓霞, 张承玉, 李月珍, 金秀东, 郑学芝, 李丽. 复方五味子素B及其成分体外抑制胃癌细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2526-2529  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2526.asp>

## 0 引言

根据中医基础理论和中药有效成分的药理作用, 将中药的有效成分合理组方是开发现代化复方中药的有效途径之一<sup>[1]</sup>. 研究表明, 五味子乙素具有抗肿瘤的作用, 尤其是在治疗多药物耐药(MDR)肿瘤方面具有一定的应用前景<sup>[2-3]</sup>. 为了能够进一步提高五味子乙素的抗肿瘤药效, 本研究根据五味子、芦荟和黄芪3种中药的药理作用, 将3种中药的有效成分五味子乙素、芦荟大黄素和黄芪多糖合理组成新的有效成分组方-复方五味子素B, 通过观察组方对离体胃癌细胞株增殖抑制作用, 筛选3种成分组方的最佳配比, 并比较组方与单味有效成分对胃癌细胞的增殖抑制作用, 进而为重组现代化有效中药复方提供可能的实验理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 五味子乙素、芦荟大黄素(中国药品生物制品检定所); 黄芪多糖(惠州东方植物保健中心); MTT、胰蛋白酶、胎牛血清、DMSO(Sigma公司)、RPMI1640(Gibco公司); 人胃癌细胞株SGC-7901购自上海生命科学院细胞化学与细胞生物研究所; 培养液为含100 mL/L小牛血清、青霉素 $10^5$  U/L、链霉素 $10^5$  U/L的RPMI 1640; 细胞株在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培

养, 每1-2天更换培养液1次。

### 1.2 方法

**1.2.1 正交设计方法筛选药物最佳配比** 采用L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>)正交设计表<sup>[4]</sup>, 即三因素(五味子乙素、芦荟大黄素、黄芪多糖), 二水平(高浓度100 mg/L, 低浓度50 mg/L), 进行三成分最佳配比筛选. L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>)正交设计表分组见表1。

**1.2.2 MTT法测定细胞存活率** 空白对照组加培养液; 阴性对照组加DMSO(终浓度2 g/L); 阳性对照组加5-氟尿嘧啶(5-FU)(终浓度50 mg/L); 五味子乙素低浓度组(终浓度50 mg/L); 五味子素高浓度组(终浓度100 mg/L); 芦荟大黄素低浓度组(终浓度50 mg/L); 芦荟大黄素高浓度组(终浓度100 mg/L); 黄芪多糖低浓度组(终浓度50 mg/L); 黄芪多糖高浓度组(终浓度200 mg/L). 每组设6个复孔, 重复实验3次. 选择对数生长期胃癌细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化1-2 min后, 磷酸缓冲液洗3次, 调整细胞数为 $5 \times 10^8$ 个/L接种于96孔培养板, 每孔100 μL, 24 h后更换培养液加药, 分组见上, 每组6个复孔, 于24 h后, 每孔分别加入5 g/L的MTT 20 μL, 37℃孵育4 h, 弃上清, 加入150 μL的DMSO, 在平板摇床微振荡10 min后, 用酶标仪在波长490 nm处测每孔吸光度(A), 根据A值判定药物对细胞增殖的影响. 抑制率(IR) =  $[1 - (\text{药物组平均吸光度值} / \text{空白平均对照组吸光度值})] \times 100\%$ 。

## 2 结果

**2.1 正交设计方法筛选药物最佳配比实验结果** 五味子乙素的1(高浓度)水平之和为263.72, 2(低浓度)水平之和为251.72; 芦荟大黄素的1(高浓度)水平之和为254.64, 2(低浓度)水平之和为260.80; 黄芪多糖的1(高浓度)水平之和为256.68, 2(低浓度)水平之和为258.76. 可以看出五味子乙素1, 2水平之和差值最大, 说明五味子乙素对实验结果影响最大, 且高浓度好; 其次为芦荟大黄素, 低浓度好; 影响最小的为黄芪多糖, 低浓度好. 所以通过正交实验设计, 我们以高五味子乙素(100 mg/L)、低芦荟大黄素(50 mg/L)、低黄芪多糖(50 mg/L)的组方为最佳配比-复方五味子素B(表1)。

**2.2 复方五味子素B及其成分体外抗胃癌细胞增殖作用研究结果** 与阴性对照组相比, 五味子乙素低、高浓度组, 芦荟大黄素低、高浓度组和复方五味素B组在波长490 nm处的吸光度A值均显著性降低, 而黄芪多糖低、高浓度组的吸光

### ■ 研发前沿

五味子乙素对某些肿瘤细胞具有一定的细胞毒性, 可有效逆转肿瘤的多药耐药性, 五味子乙素作用于P-糖蛋白, 可完全抑制P-糖蛋白的功能, 因此具有临床应用意义. 五味子乙素可与其他药物配伍进一步提高逆转效果, 因此, 采用化学修饰或与中药有效成分联合应用增强其抗肿瘤作用将是五味子乙素的研究热点。

## ■应用要点

五味子乙素可有效逆转肿瘤的多药耐药性,所以五味子乙素具有很好的临床肿瘤化疗的应用前景,特别是作为肿瘤细胞多药耐药性逆转剂药物的前景。

表 1  $L_4(2^3)$ 正交设计表药物最佳配比筛选

分组	实验组合安排			实验次数及结果(IR%)			
	五味子乙素	芦荟大黄素	黄芪多糖	1	2	3	合计
1	1(高)	1(高)	1(高)	42.12	44.23	43.45	129.80
2	1(高)	2(低)	2(低)	45.24	45.61	43.07	133.92
3	2(低)	1(高)	2(低)	40.32	41.16	43.36	124.84
4	2(低)	2(低)	1(高)	43.44	43.29	40.15	126.88
1水平和( $Z_1$ )	263.72	254.64	256.68	171.12	174.29	170.03	515.44
2水平和( $Z_2$ )	251.72	260.80	258.76				
差值( $Z_1-Z_2$ )	12.00	-6.16	-2.08				

度降低不明显;增殖抑制率结果显示,五味子乙素低、高浓度组,芦荟大黄素高浓度组和复方五味素B组抑制率明显增高,其中复方五味子素B的抑制作用最为明显(表2)。

## 3 讨论

五味子乙素(Schisandrin B)是五味子中重要的木脂素类有效成分。研究表明,体外五味子乙素能明显抑制小鼠腹水型肝癌、小鼠 $S_{180}$ -V癌细胞和人胚肺成纤维细胞的DNA合成<sup>[5]</sup>,能抑制人肝癌SMMC-7721细胞的增殖并诱导其凋亡<sup>[6]</sup>,可以增强阿霉素诱导人肝癌SMMC-7721细胞和人乳腺癌细胞MCF-7凋亡的作用<sup>[7]</sup>。本研究结果也显示,50和100 mg/L五味子乙素对胃癌细胞株SGC-7901的增殖均有明显的抑制作用。大黄的有效成分芦荟大黄素(aloeemodin)具有抗菌消炎功效,体外可抑制金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、枯草杆菌、大肠杆菌等多种细菌,对幽门螺杆菌也有抑制生长作用。此外,动物活体实验证明芦荟大黄素能延长P388白血病小鼠的存活期<sup>[8]</sup>,诱导早幼粒白血病细胞株HL-60,人肝癌细胞系BEL-7402, HCC, Mah/avu, PLC/PRF/5和HepG2及Hep3B等多种肿瘤细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>,能调节胶质瘤细胞PKC同工酶、抑制其增殖进而诱导其凋亡的作用<sup>[11]</sup>。我们以往的实验显示芦荟大黄素在12-48 h内能明显抑制人胃癌SGC-7901细胞的增殖<sup>[12]</sup>。本研究结果发现,100 mg/L芦荟大黄素能明显抑制胃癌细胞株SGC-7901的增殖。黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)是黄芪的主要活性成分之一。黄芪具有多种免疫调节的作用<sup>[13]</sup>。在肿瘤防治方面具有重要的作用。大量研究显示,黄芪多糖不能直接杀死肿瘤细胞,而是能刺激淋巴细胞增殖,提高巨噬细胞吞噬功能,增强NK细胞活力,通过增强宿主免疫反应发挥抗肿瘤作

表 2 复方五味子素B及其成分体外抗胃癌细胞增殖作用研究( $n=6$ )

分组	A	IR(%)
空白对照	0.423 ± 0.021	
阴性对照	0.427 ± 0.018	
阳性对照	0.199 ± 0.008 <sup>b</sup>	53.40 ± 7.69 <sup>b</sup>
五味子乙素		
50 mg/L	0.296 ± 0.011 <sup>b</sup>	26.26 ± 4.65 <sup>ad</sup>
100 mg/L	0.260 ± 0.012 <sup>b</sup>	39.11 ± 5.13 <sup>bc</sup>
芦荟大黄素		
50 mg/L	0.376 ± 0.017 <sup>a</sup>	11.94 ± 1.86
100 mg/L	0.334 ± 0.013 <sup>a</sup>	21.78 ± 3.67 <sup>ad</sup>
黄芪多糖		
50 mg/L	0.398 ± 0.019	6.79 ± 1.23 <sup>d</sup>
200 mg/L	0.411 ± 0.020	3.48 ± 0.65 <sup>d</sup>
复方五味子素B	0.162 ± 0.007 <sup>b</sup>	52.06 ± 9.87 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 阴性对照; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 复方五味子素B。

用<sup>[14]</sup>。但也有体内实验结果表明, im APS对小鼠移植性肿瘤S180和肝癌(Heps)有明显的抑制作用<sup>[15]</sup>。我们体外实验结果显示, APS对胃癌细胞株SGC-7901的增殖没有明显影响。

为了提高单味中药成分的抑癌作用,我们将五味子乙素、芦荟大黄素和黄芪多糖合理组方,并通过正交实验设计的方法筛选出了3种成分的抑制胃癌细胞增殖的最佳配比-复方五味子素B。同时我们还比较了复方五味子素B及其组成成分对胃癌细胞抑制的作用,结果表明复方五味子素B的抑癌作用比单纯使用五味子乙素、芦荟大黄素和黄芪多糖的抑癌作用明显。3种成分抑癌作用之间相互关系以及复方五味子素B抑癌作用机制将在后续研究中进行。

实现中药现代化是中药产业发展走出“瓶颈”的唯一出路。本实验研究结果不仅为重组

## ■名词解释

五味子乙素:是木兰科植物五味子中重要的木脂素类有效成分,联苯环辛烯类物质的衍生物,具有较强效的抗自由基作用。近年来发现五味子乙素具有抗肿瘤的功效,尤其可有效逆转肿瘤的多药耐药性。

抗胃癌高效中药复方提供了实验依据, 而且提示将中药有效成分合理组方可能是开发现代化复方中药的有效方法和途径之一。

#### 4 参考文献

- 1 王停, 张建军, 张德芹, 高学敏, 荆鲁. 中药新药研发思路与方法的探索. 中国中药杂志 2004; 29: 387-388
- 2 Li L, Wang T, Xu ZL, Yu Y, Chen W, Chen F. Effects of schisandrin B on reversing multidrug resistance in human breast cancer cells transfected with mdrl gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1633-1637
- 3 Sun M, Xu X, Lu Q, Pan Q, Hu X. Schisandrin B: a dual inhibitor of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *Cancer Lett* 2007; 246: 300-307
- 4 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 199
- 5 刘力生, 王勤, 郑荣梁, 孙晓菲, 张龙弟. 五味子乙素对小鼠免疫功能、腹水型肝癌细胞DNA合成和存活率的作用. 兰州大学学报(自然科学版) 1990; 26: 55-59
- 6 Wu YF, Cao MF, Gao YP, Chen F, Wang T, Zumbika EP, Qian KX. Down-modulation of heat shock protein 70 and up-modulation of Caspase-3 during schisandrin B-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2944-2948
- 7 Li L, Lu Q, Shen Y, Hu X. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 584-595
- 8 李洋, 陆燕. 芦荟药用的最新研究进展. 中国药物应用与监测 2005; 2: 27-29
- 9 Jing X, Ueki N, Cheng J, Imanishi H, Hada T. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 874-882
- 10 Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002; 71: 1879-1892
- 11 Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1775-1784
- 12 富泽龙, 刘晓霓, 张承玉, 金秀东, 郑学芝. 芦荟大黄素对人胃癌细胞株SGC-7901的增殖抑制作用. 牡丹江医学院学报 2006; 27: 8-11
- 13 Shao P, Zhao LH, Zhi-Chen, Pan JP. Regulation on maturation and function of dendritic cells by Astragalus mongholicus polysaccharides. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1161-1166
- 14 张小梅. 黄芪多糖的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展. 大连大学学报 2003; 24: 101-104
- 15 周淑英, 卢振初, 王侑先, 元寿海, 陈惠英, 刘文虎. 黄芪多糖(APS)抗肿瘤作用的实验研究. 药物生物技术 1995; 2: 22-25

#### ■同行评价

本文研究了复方五味子素B及其成分对胃癌细胞增殖的影响, 研究技术路线合理可靠, 设计严谨, 数据通过统计学处理, 科学性较强, 有一定的参考价值。

编辑 何燕 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 •

### 欢迎订阅 2008 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。

《世界华人消化杂志》2008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。

# SMART技术构建人肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库

丁世华, 杨冬华, 汤绍辉, 叶刚

## ■背景资料

原发性肝癌发病率高, 恶性程度高, 预后差, 传统手术、化疗、放射治疗效果差。肝癌特异性抗体介导的靶向治疗是肝癌治疗的新策略, 本文利用噬菌体抗体库技术成功制备了高亲和力的特异性抗肝癌单抗抗体, 筛选和鉴定与其结合的抗原可为肝癌的免疫治疗提供新的靶点。

丁世华, 杨冬华, 汤绍辉, 叶刚, 暨南大学附属第一医院消化科 广东省广州市 510630

广东省科技攻关项目, No. 2006B19901014

广东省名医工程研究项目, No. 2004-199

通讯作者: 杨冬华, 510630, 广东省广州市暨南大学附属第一医院消化科. thdyang@163.com

收稿日期: 2007-04-04 修回日期: 2007-08-08

## Switch mechanism at 5' end of mRNA template technology used to construct a cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens

Shi-Hua Ding, Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Gang Ye

Shi-Hua Ding, Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Gang Ye, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Ji'nan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Program of Science and Technology in Guangdong Province, No. 2006B19901014 and Famous Doctor Project Research Program of Guangdong Province, No. 2004-199

Correspondence to: Dong-Hua Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Ji'nan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. thdyang@163.com

Received: 2007-04-04 Revised: 2007-08-08

## Abstract

**AIM:** To construct a cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens.

**METHODS:** Total RNA was extracted from hepatocellular carcinoma cells and mRNA was purified. Single- and double-stranded cDNA were synthesized through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and long distance polymerase chain reaction (LD-PCR). cDNA fragments, after removing those smaller than 500 bp, were recombined to a λTriplex2 phage vector. The recombined cDNA was packaged *in vitro* with Gigapack III Gold packing extract. A small portion of package phage was then used to infect *Escherichia coli* XL1-Blue for titration and determination of the percentage of recombinant clones. PCR was used to identify the size of the inserted cDNA.

**RESULTS:** The constructed cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens consisted of  $3.4 \times 10^6$  pfu/mL independent clones with a recombination rate of 98.2%. After amplification, the constructed cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens consisted of  $9.6 \times 10^8$  pfu/mL independent clones with a recombination rate of 97.2%. The lengths of the inserted cDNA fragments ranged from 0.6 to 2 kb, with an average of 1.4 kb.

**CONCLUSION:** A high-quality cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens was successfully constructed. This is an essential step for screening and identifying tumor-specific antigens of hepatocellular carcinoma.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Bacteriophage; Antigen gene; cDNA Library

Ding SH, Yang DH, Tang SH, Ye G. Switch mechanism at 5' end of mRNA template technology used to construct a cDNA phage expression library of hepatocellular carcinoma antigens. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2530-2533

## 摘要

**目的:** 构建肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库。

**方法:** 从肝癌细胞提取总RNA, 纯化mRNA, 用逆转录酶链式反应(RT-PCR)反转录合成cDNA第1链, LD-PCR合成cDNA第2链, 除去<500 bp小片段, 与λTriplex2噬菌体载体连接并体外包装, 转化大肠杆菌*E. coli* XL1-blue, 测定文库的库容和重组率, PCR鉴定插入cDNA片段大小。

**结果:** 构建的肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库, 原始库容为 $3.4 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为98.2%; 文库扩增后库容为 $9.6 \times 10^8$  pfu/mL, 重组率为97.2%。重组子插入cDNA片段大小0.6-2(平均1.4) kb。

**结论:** 成功构建高质量的肝癌抗原基因cDNA

## ■研发前沿

肝癌特异性肿瘤抗原的筛选和鉴定是肝癌研究的热点和难点, 高质量cDNA文库的构建是其前提和关键。



噬菌体表达文库, 为肝癌特异性抗原的筛选和鉴定奠定了基础。

**关键词:** 肝细胞癌; 噬菌体; 抗原基因; cDNA文库

丁世华, 杨冬华, 汤绍辉, 叶刚. SMART技术构建人肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2530-2533  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2530.asp>

## 0 引言

我们利用噬菌体抗体库技术成功制备了3株高亲和力的特异性抗肝癌单链抗体<sup>[1-2]</sup>, 筛选和鉴定这3株单链抗体识别的特异性肝癌抗原, 可以为肝癌的免疫治疗提供新的靶点. 筛选和鉴定特异性肝癌抗原的前提和关键是构建高质量的肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库. 传统的cDNA文库构建方法很难包括5'端全长基因, 所建的文库代表性差, 文库筛选复杂、耗时、工作量大. 以3株人肝癌细胞为材料, 利用SMART(switch mechanism at 5' end of mRNA template)技术构建了高质量的肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库, 为肝癌特异性肿瘤抗原筛选和鉴定提供了研究基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株HepG2、BeL-7402及SMMC-7721为本室保存; TRIzol试剂, RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司; 优等胎牛血清为TBD产品, 购自广州展晨生物技术公司; mRNA分离纯化试剂盒购自Premega公司; Smart<sup>TM</sup> cDNA Library Construction kit购自美国Clontech公司; 噬菌体包装蛋白Gigapack III Gold packing extract kit购自Stratagene公司.

**1.2 方法** 培养肝癌细胞HepG2、BeL-7402及SMMC-7721至旺盛生长期, 倒去培养液后加入TRIzol试剂, 裂解细胞并抽提总RNA, 用紫外分光光度计测定其浓度及纯度. 用Premega的mRNA试剂盒分离纯化mRNA, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察. 取mRNA样品0.5 μg RT-PCR合成第1链, 加SmartIV<sup>TM</sup> oligonucleotide随机引物5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAG-AGTGGCCATTACGGCCGGG-3' 1 μL, CDSIII/3' PCR随机引物5'-ATTCTAG-AGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N<sub>-3</sub>' (N = A、G、C or T; N<sub>-1</sub> = A、G or C) 1 μL, 灭菌去离子水2.55 μL, 总体积5 μL, 72℃温育2 min,

冰浴2 min. 依次加入5×First strand buffer 2.0 μL, 20 mmol/L DTT 1.0 μL, 10 mmol/L dNTP mix 1.0 μL, 逆转录酶Superscript II 1.0 μL, 总体积5.0 μL, 42℃ 1 h, 冰浴终止反应. 用LD-PCR合成第2链, 取第1链2.0 μL, 加入灭菌去离子水80.0 μL, 10×Advantage 2 PCR buffer 10.0 μL, dNTPmix 2.0 μL, 5' PCR引物(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 2.0 μL, CDSIII/3' PCR随机引物2.0 μL, 50×Advantage 2 polymerase mix 2.0 μL, 总体积100 μL. 反应条件: 在95℃ 1 min后, 95℃ 15 s, 68℃ 6 min, 20个循环, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察. 取已被蛋白酶K消化的cDNA 79 μL, 10×Sfi buffer 10 μL, Sfi I酶10 μL, 100×BSA 1 μL, 总体积100 μL, 50℃温育酶切2 h. 加入2 μL 10 g/L的二甲苯青蓝混匀, 短暂离心. 在经Chroma Spin-400柱子分离小于500 bp的小片段后, 用灭菌去离子水7 μL溶解沉淀. 取cDNA 1.0 μL, 500 g/L已去磷酸化的λTriplex 2噬菌体载体1.0 μL, 10×Ligation buffer 0.5 μL, 10 mmol/L ATP 0.5 μL, T4 DNA连接酶0.5 μL, 灭菌去离子水1.5 μL, 总体积5.0 μL, 16℃连接16 h. 加入包装蛋白25 μL, 22℃孵育2 h, 加入1×Lambda dilution buffer 500 μL, 加入氯仿20 μL混匀, 短暂离心. 即已构建成人肝癌抗原cDNA噬菌体表达文库.

**1.2.1 文库的滴度和重组率测定** 取原始文库1 μL, 以1×Lambda dilution buffer作1:5, 1:10, 1:20稀释, 分别取不同倍数的原始文库1 μL加入*E.coli* XL1-blue过夜培养物200 μL中, 37℃孵育15 min, 往混合物中加入3 mL熔化的LB/MgSO<sub>4</sub>软琼脂, 铺在LB/MgSO<sub>4</sub> 90 mm平板上, 37℃孵育15 h. 文库的滴度pfu/mL = (噬斑数×稀释倍数×10<sup>3</sup> mL/L)/铺平板用稀释库的μL数. 用IPTG和X-Gal滴定重组率, 重组率 = 白色噬斑数/(蓝色噬斑数+白色噬斑数)×100%. 文库扩增后加二甲亚砜终浓度至70 g/L, -80℃保存.

**1.2.2 重组噬菌体PCR鉴定** 随机挑取13个白色噬斑分别加入至装有噬菌体稀释液30 μL中, 取噬菌体稀释液5 μL, 在反应体系50 μL中加入载体自带的随机引物各1 μL, 进行PCR扩增, 反应参数: 95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 68℃延伸4 min, 循环35次后, 68℃保温8 min, 10 g/L琼脂糖凝胶鉴定插入片段的大小.

## 2 结果

总RNA的A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>为1.86, 电泳可见28 S, 18 S,

### ■创新盘点

SMART方法构建的克隆含有完整的5'端非翻译区的全长型cDNA, 能够达到高质量cDNA文库的要求, 适合用于肝癌特异性抗原基因的筛选.

### ■应用要点

肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库的成功构建为肝癌特异性肿瘤抗原的筛选和鉴定奠定了基础.

### ■名词解释

SMART技术: 利用Powerscript TMRT反转录酶的反转录、末端转移酶活性和内切酶*sfi* I的特性, 快速、简单地构建全长cDNA文库的方法。

5 S三条带, 28 S和18 S亮度比约为2:1, 符合建库要求(图1A)。电泳结果显示双链cDNA分布在0.5-4 kb之间, 呈长瀑布条带, 符合哺乳动物细胞DNA的分布规律(图1B)。原始文库的库容为 $3.4 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为98.2%; 文库扩增后库容为 $9.6 \times 10^8$  pfu/mL, 重组率为97.2%。随机挑选13个重组噬菌体, 经PCR鉴定, 插入cDNA片段大小0.6-2(平均1.4)kb(图1C)。

### 3 讨论

利用抗体寻找抗原最有效的方法是构建肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库, 继而进行免疫学筛选, 获取特异性的肝癌肿瘤抗原, 而构建高质量的cDNA文库是前提和关键。国内已开展肝癌cDNA文库构建和肝癌相关肿瘤抗原筛选方面的研究<sup>[3-6]</sup>; 但是, 传统的cDNA文库构建方法很难包括5'端全长基因, 所建的文库代表性差, 文库筛选复杂、耗时、工作量大, 很难获得特异性的肝癌肿瘤抗原。SMART方法构建cDNA文库是一种新颖而实用技术, 所构建的克隆为含有完整的5'端非翻译区的全长型cDNA, 而将此技术用于肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库的构建还鲜见于报道。SMART cDNA文库构建技术, 利用一种经修饰的Oligo(dT)(CDSIII/3' PCR primer)引导第一链合成, 并加入SMART IV Oligo在mRNA 5'末端作为短的延伸模板。当逆转录到5'末端时, 逆转录酶的末端转移酶活性在第1链cDNA的3'末端加上一小段脱氧胞苷。这些脱氧胞苷与SMART IV Oligo 3'端含有的寡核苷酸(G)序列配对, 形成延伸模板, 逆转录酶转换模板并将SMART IV Oligo链转录完全。所合成的单链cDNA包含了完整的mRNA 5'末端, 并且附加了SMART IV Oligo的互补链<sup>[7]</sup>。只有那些5'末端含有SMART 锚定序列的单链cDNA才能在随后的LD-PCR过程中进行指数扩增, 不完整的cDNA和无polyA的cDNA因缺乏SMART锚定引物而无法被扩增, 可消除基因组DNA和无polyA的RNA, 并且允许用ng级的总RNA或mRNA构建高库容量、高比例的全长cDNA文库<sup>[8-10]</sup>。新合成的cDNA 5'和3'末端分别含有非均一的*sfi* I限制性酶切位点, 由于*sfi* I限制性酶识别cDNA的5'和3'末端碱基序列并不完全相同, cDNA和 $\lambda$ TripIEx2载体经*sfi* I酶消化后, 可以直接进行克隆连接, 并且消除了接头的自连接, 提高了文库的重组效率。而且*sfi* I的酶切位点在哺乳动物中罕见, cDNA经过*sfi* I酶消化后仍可保持其完整性。

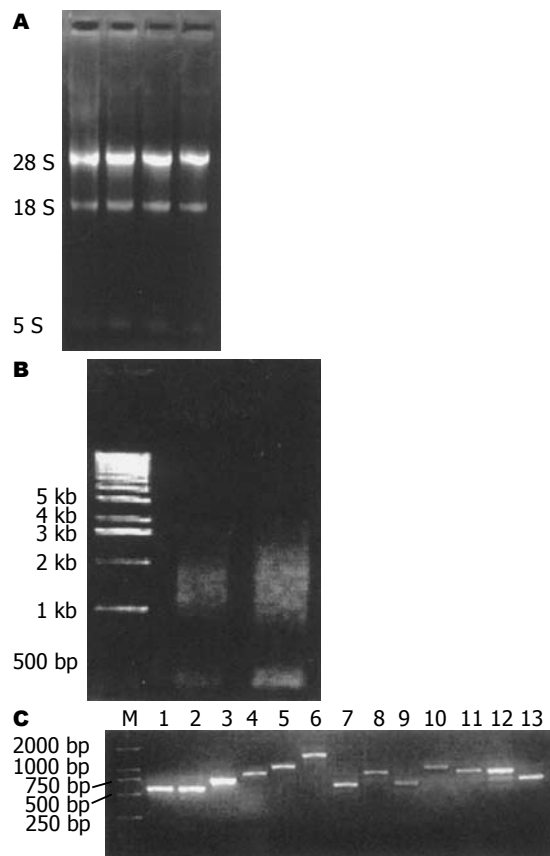


图1 电泳图。A: 总RNA; B: cDNA; C: 插入片段大小PCR鉴定(1-13)。

cDNA文库的质量主要反映在文库的代表性和重组cDNA片段序列完整性两个方面。一个具有完好代表性的cDNA文库理论上应有99%的概率保证文库中包含细胞表达的任何一种mRNA序列信息, 库容量至少应具有 $10^6$ 以上。重组cDNA片段的完整性要求文库中重组cDNA片段为全长的cDNA, 尽可能完整地反映天然基因的结构, 插入子的片段大小平均要在1 kb以上。我们选取3株人肝癌细胞建库, 有着相对单一的转录本库, 比新鲜肿瘤标本更具有代表性; 利用SMART方法构建的克隆含有完整的5'端非翻译区, 能够反映基因的天然结构。我们构建的肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库, 原始库容为 $3.4 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为98.2%; 文库扩增后库容为 $9.6 \times 10^8$  pfu/mL, 重组率为97.2%; 重组子经PCR鉴定, 插入cDNA片段大小从0.6-2(平均1.4)kb; 到达高质量文库的要求, 为肝癌特异性或相关性肿瘤抗原基因的筛选和鉴定奠定了基础。

### 4 参考文献

- 1 周昱, 杨冬华, 汤绍辉, 卢筱华, 黄卫, 李康. 集落挖掘法在抗肝癌噬菌体单抗抗体库筛选中的应用. 中国病

- 理生理杂志 2005; 21: 1246-1248
- 2 Lu XH, Yang DH, Zhou M, Tang SH. Affinity maturation of a single-chain antibody against hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006; 14: 192-195
  - 3 Uemura M, Nouse K, Kobayashi Y, Tanaka H, Nakamura S, Higashi T, Ono T, Nakayama E, Hanafusa T, Shiratori Y. Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2474-2479
  - 4 Shi YY, Wang HC, Yin YH, Sun WS, Li Y, Zhang CQ, Wang Y, Wang S, Chen WF. Identification and analysis of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 929-934
  - 5 Zhong X, Ran YL, Lou JN, Hu D, Yu L, Zhang YS, Zhou Z, Yang ZH. Construction of human liver cancer vascular endothelium cDNA expression library and screening of the endothelium-associated antigen genes. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1402-1408
  - 6 Cui XN, Tang JW, Hou L, Song B, Ban LY. Identification of differentially expressed genes in mouse hepatocarcinoma ascites cell line with low potential of lymphogenous metastasis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6893-6897
  - 7 Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, Wiemann S. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. *BMC Genomics* 2004; 5: 36
  - 8 Fu GK, Stuve LL. Improved method for the construction of full-length enriched cDNA libraries. *Biotechniques* 2003; 34: 954-957
  - 9 Oh JH, Kim YS, Kim NS. An improved method for constructing a full-length enriched cDNA library using small amounts of total RNA as a starting material. *Exp Mol Med* 2003; 35: 586-590
  - 10 Suzuki Y, Sugano S. Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method. *Methods Mol Biol* 2003; 221: 73-91

#### ■同行评价

本文为肝癌特异性抗原的筛选和鉴定成功的构建了高质量的肝癌抗原基因cDNA噬菌体表达文库, 设计科学, 方法先进, 结果明确, 有很强的科学性和可读性。

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 •

### 中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

**本刊讯** 由中华医学会消化内镜学分会主办, 江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04在江西南昌举行. 届时将邀请美国、香港等国家和地区的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会。

#### 1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培训讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座。

#### 2 联系方式

徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科. 电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn.

## 冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌205例

樊青霞, 王瑞, 王瑞林

### ■背景资料

冬凌草作为中草药单药或与其他中西药联合用于抗肿瘤的研究是一大热点。本项目负责人独立与其他研究工作者合作对冬凌草的研究较早, 尤其在冬凌草治疗食管癌、胃底贲门癌和原发性肝癌上的研究较为成熟。目前, 国内外关于冬凌草与化疗联合应用治疗食管癌的研究比较少。本研究为临床应用冬凌草治疗食管癌提供了理论依据。

樊青霞, 王瑞, 王瑞林, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

樊青霞, 博士生导师, 主要从事恶性肿瘤的临床研究。

通讯作者: 王瑞林, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. wangruihello@yahoo.com.cn

电话: 0371-65165762

收稿日期: 2007-02-14 修回日期: 2007-08-07

### Clinical efficacy of treatment by *Rabdosia rubescens* alone or in combination chemotherapy for esophageal cancer

Qing-Xia Fan, Rui Wang, Rui-Lin Wang

Qing-Xia Fan, Rui Wang, Rui-Lin Wang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Rui-Lin Wang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wangruihello@yahoo.com.cn

Received: 2007-02-14 Revised: 2007-08-07

### Abstract

**AIM:** To observe the clinical efficacy of *Rabdosia rubescens* alone or in combination chemotherapy for the treatment of esophageal cancer patients.

**METHODS:** We enrolled 448 patients diagnosed with esophageal cancer by pathology and X-ray; 76 in the early stage were treated with *Rabdosia rubescens* alone; 372 were in the middle to late stage and among these, 167 were treated with *Rabdosia rubescens* alone, while 205 were treated with *Rabdosia rubescens* plus chemotherapy.

**RESULTS:** For early-stage esophageal cancer patients treated with *Rabdosia*, survival rates at 3, 5, 10 and 13 years were significantly higher than those for patients without treatment (98.68% vs 51.52%, 84.02% vs 28.62%, 63.49% vs 11.45%, 50.13% vs 8.59%;  $P < 0.001$ ). For late-stage esophageal cancer, the response rate to *Rabdosia rubescens* plus chemotherapy was significantly higher than that in PYM-BLM based chemotherapy alone (66.82% vs 42.85%,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference regarding side effects be-

tween *Rabdosia rubescens* plus chemotherapy and chemotherapy alone ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** For early-stage esophageal cancer, *Rabdosia rubescens* appears to control disease and prolong survival time. *Rabdosia rubescens* also appears to enhance the effect of chemotherapy against advanced esophageal cancer.

**Key Words:** *Rabdosia rubescens*; Chemotherapy; Esophageal cancer; Clinical efficacy

Fan QX, Wang R, Wang RL. Clinical efficacy of treatment by *Rabdosia rubescens* alone or in combination chemotherapy for esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2534-2537

### 摘要

**目的:** 观察冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌的临床疗效。

**方法:** 448例患者, 均经病理细胞学和X线检查确诊为食管癌。其中早期癌76例, 均采用冬凌草单药治疗。晚期癌372例, 167例采用冬凌草单药治疗, 205例采用冬凌草与化疗合用。

**结果:** 用冬凌草单药治疗早期食管癌患者3, 5, 10, 13 a的生存率明显高于未治疗组(98.68% vs 51.52%, 84.02% vs 28.62%, 63.49% vs 11.45%, 50.13% vs 8.59%;  $P < 0.001$ )。对于晚期食管癌, 冬凌草联合化疗应用, 其总有效率明显高于以PYM(BLM)为基础的单一化疗(66.82% vs 42.85%,  $P < 0.01$ )。冬凌草与化疗合用组与单一化疗对照组相比副作用基本相同, 无明显差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 对于早期食管癌患者, 冬凌草能控制疾病发展延长生存时间; 对于晚期食管癌患者, 冬凌草能增强化疗的作用。

**关键词:** 冬凌草; 化疗; 食管癌; 临床疗效

樊青霞, 王瑞, 王瑞林. 冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌205例. 世界华人消化杂志 2007; 15(23): 2534-2537  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2534.asp>

## 0 引言

冬凌草(*rabdosia rubescens*)又名冰凌草、六月令、山香草等. 系唇形科(*labtea*)香茶菜属(*rabdosia*)植物. 主要产于河南以及河北、山西、陕西、湖北、江苏、安徽、浙江、云南等省, 资源丰富. 冬凌草含有从单萜、倍半萜、到二萜、三萜等一系列萜类物质, 并含有黄酮及有机酸等. 从冬凌草叶中分离出了冬凌草甲素(*Oridonin*), 试验证明具有抗肿瘤作用、抗菌作用、及氧自由基清除作用<sup>[1-2]</sup>. 临床应用证明冬凌草治疗食管癌、胃底贲门癌、原发性肝癌、胰腺癌、前列腺癌及局部灌注治疗复发性膀胱癌等有一定客观疗效. 现仅就冬凌草水剂和片剂单用及与化疗药物合用治疗食管癌的临床疗效报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组共448例, 均经病理细胞学、X线检查确诊为食管癌. 男343例, 女105例, 中位数年龄53(30-77)岁, 其中早期癌76例, 中晚期癌372例. 鳞癌426例, 腺癌11例, 腺鳞癌6例, 未分化癌3例, 发现癌细胞未分类1例, 未发现癌细胞1例. 1975/1977在汤阴县和鹤壁市普查中发现的早期食管癌76例应用冬凌草糖浆和片剂单药治疗. 中晚期食管癌372例中, 167例应用冬凌草单药治疗, 205例冬凌草与化疗合用. 均为不宜或不愿接受手术、放疗或单纯化疗患者.

### 1.2 方法

1.2.1 冬凌草剂型和用药方法 1:1浓度, 片剂每片含生药4 g, 每次30 mL或片剂5-8片, 3次/d, 饭后服用, 2-3 mo 1疗程. 疗程总量10 000 g生药左右. 凡经1-2个疗程治疗病变缩小或稳定者, 停药1 mo后再用第2或第3个疗程. 3-4个疗程后改为维持量治疗, 每次15-20 mL或片剂4片, 3次/d, 用药1 mo间歇1 mo. 早期癌每年2个疗程, 每疗程3 mo, 间歇3 mo, 3-4 a后改为维持治疗. 冬凌草糖浆和片剂可单用1种或同时用2种, 也可2种剂型交替用.

1.2.2 冬凌草与化疗合用的用药方法 冬凌草糖浆30 mL, 3次/d或片剂6片/次, 3次/d, 饭后*po*与化疗同时应用. 化疗: (1)CTX-BLM: CTX, 400 mg iv, 每周1, 3, 5用; BLM, 15 mg im, 每周2, 4, 6用, 7 wk 1疗程. (2)NOP(Nitrocaphane)-PYM: NOP, 20 mg iv, 每周1, 3, 5用; PYM, 8 mg im, 每周2, 4, 6用, 7 wk 1疗程. (3)DDP-VCR-PYM: DDP, 20 mg iv, 第1, 4, 7周第1-5天; VCR, 0.5 mg iv, 第2, 3,

5, 6, 8周, 每周1, 3, 5 09:00; PYM, 8 mg im, 第2, 3, 5, 6, 8周, 每周1, 3, 5 16:00用, 8 wk 1疗程.

1.2.3 近期疗效和治疗后生存时间评定标准 中、晚期食管癌按CR, PR, MR, SD和PD 5级标准评定疗效: 完全缓解(CR): 肿瘤完全消失, 超过1 mo. 部分缓解(PR): 肿瘤最大直径及其最大垂直直径的乘积缩小达50%以上, 无新病灶出现, 持续超过1 mo. 微效(MR): 肿瘤最大直径及其最大垂直直径的乘积缩小25%以上, 但不足50%, 无新病灶出现, 持续超过1 mo. 稳定(SD): 可见肿瘤两径乘积缩小及增大均不超过25%, 无新病灶出现, 超过1 mo. 进展(PD): 肿瘤两径乘积增大25%以上或者有新病灶出现. 治疗后生存期: 自治疗开始至死亡或末次随访的时间.

统计学处理 采用四格表资料的 $\chi^2$ 检验, 以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的检验水准.

## 2 结果

2.1 冬凌草单药治疗早期食管癌76例的结果 早期食管癌76例(治疗组)经过13-15 a的观察随访. 治疗后1, 3, 5, 10, 13和15 a生存率分别为100%, 98.68%, 84.02%, 63.49%, 50.13%和44.56%. 同期普查发现而拒绝接受任何治疗的早期食管癌患者58例(对照组)1, 3, 5, 10和13 a生存率分别为100%, 51.52%, 28.62%, 11.45%和8.59%, 除第1年外, 治疗组生存率均显著的高于对照组( $P < 0.001$ ).

2.2 冬凌草单药治疗中晚期食管癌的疗效和生存时间 冬凌草治疗中晚期食管癌167例, CR, PR, MR, SD和PD分别为1.79%(3/167), 6.58%(11/167), 25.15%(42/167), 32.93%(55/167)和33.53%(56/167), 完全缓解和部分缓解为8.38%(14/167), 总有效率(CR+PR+MR)为33.53%(56/167). 冬凌草单药治疗后1, 3, 5和10 a生存率分别为30.77%, 13.46%, 10.26%和8.89%(表1).

2.3 冬凌草与化疗合用治疗晚期食管癌的疗效和生存时间 疗效: 冬凌草与含PYM(BLM)化疗方案(BLM-CTX, PYM-NOP, PYM-VCR-DDP)合用治疗晚期食管癌205例, 完全和部分缓解率为36.58%(75/205), 总有效率(CR+PR+MR)为66.82%(137/205). 同样化疗方案的单纯化疗组182例的完全缓解和部分缓解率为20.32%(37/182), 总有效率(CR+PR+MR)为42.85%(78/182). 两组相比有显著差异( $P < 0.01$ , 表2). 其中以冬凌草加PYM-NOP差异最明显,

### ■应用要点

本文研究发现冬凌草食管癌早期患者, 晚期患者都有一定的疗效, 对食管癌的治疗有一定的临床意义.



## ■同行评价

本文作者观察冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌的效果,得出冬凌草能控制早期食管癌的发展延长生存时间,能增强晚期食管癌的化疗效果,立题新颖,分析科学,有一定的临床意义和应用价值。

表 1 冬凌草单药治疗中晚期食管癌生存时间表(n)

年(a)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
初期病例数	156	156	156	156	156	136	127	126	96	90
末期病例数	48	19	21	17	16	12	12	12	9	8

表 2 冬凌草与化疗合用组及单纯化疗组治疗晚期食管癌疗效对比表n(%)

分组	n	CR	PR	MR	SD	PD
冬凌草与化疗合用组	205	19(9.26)	56(27.31)	62(30.24)	35(17.07)	33(16.09)
化疗对照组	182	5(2.74)	32(17.58)	41(22.52)	56(30.76)	48(26.37)

$P<0.01$ .

表 3 冬凌草与化疗合用组及化疗对照组治疗晚期食管癌生存时间对比表n(%)

分组	1 a			3 a			5 a		
	初期	末期	生存率	初期	末期	生存率	初期	末期	生存率
冬凌草与化疗合用组	129	52	40.3 <sup>b</sup>	63	7	11.11	55	4	7.27
化疗对照组	125	22	17.6	103	6	5.83	99	4	4.04

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组.

其次为冬凌草加BLM-CTX,再次为冬凌草加PYM-VCR-DDP.冬凌草与化疗合用组治疗后1, 3, 5 a生存率分别为40.3%, 11.11%和7.27%.化疗对照组1, 3, 5 a生存率分别为17.6%, 5.83%和4.04%.两组相比除第1年生存率有显著差异外( $P<0.01$ ), 3, 5 a生存率无明显差异( $P>0.05$ , 表3).

2.4 副作用 据本组观察统计冬凌草水剂和片剂无明显副作用.仅有少数患者有时服药后有轻度的腹部不适、肠鸣、大便稀溏及次数增多等.不经处理可自行消失,用米壳、山楂水煎剂可预防与治疗.4例服药后皮肤瘙痒.随访长期服药患者未发现肝、肾、心脏及骨髓毒性.冬凌草与化疗合用,有化疗引起的副反应.冬凌草与化疗合用组与化疗对照组相比副作用基本相同,无明显差异.

### 3 讨论

实验研究证明冬凌草煎剂无论口服或注射均有抗肿瘤活性,其有效成分冬凌草甲素对人体肝癌细胞株BEL-7401、人体食管癌109细胞、肺癌细胞SPC-A-1、人乳腺癌细胞MDA-MB-231、艾氏腹水癌、淋巴瘤以及白血病等均有明显抗肿瘤作用<sup>[3-5]</sup>和诱导凋亡作用<sup>[6-7]</sup>.动物实

验证明冬凌草蒸馏液对食管癌癌前病变转变为癌有明显的抑制作用.用3H-标记的冬凌草甲素在小鼠食管、肝脏、和胰腺组织中分布较多<sup>[8]</sup>,这与临床上冬凌草治疗食管癌、肝癌和胰腺癌等有一定疗效相一致<sup>[9-10]</sup>.冬凌草治疗早期食管癌76例,经长期随访其3, 5, 10, 13 a生存率非常显著的高于不治疗组( $P<0.001$ ).从确诊到死亡的平均时间为83 mo,与文献报道的食管癌的自然病程平均为43 mo及又有文献报道的早期食管癌从确诊到死亡平均时间53.2 mo<sup>[11]</sup>相比,冬凌草治疗组的生存时间明显延长.除去影响生存时间的各种因素外,事实表明冬凌草对早期癌有控制病变发展、延长生存时间的作用.冬凌草单药治疗中晚期食管癌的缓解率(CR+PR)为8.38%,较已报道<sup>[12]</sup>的治疗食管癌化疗单药的近期疗效均低,但生存时间则较长.文献曾报道,冬凌草甲素与顺铂可协同作用于鼠S180肉瘤细胞<sup>[13]</sup>.本研究冬凌草与含PYM(BLM)的化疗方案合用治疗食管癌的效果明显高于单纯化疗组( $P<0.01$ ),显示有增效作用<sup>[14]</sup>.研究证明<sup>[15]</sup>冬凌草甲素加PYM的抑制率(83%)与单用冬凌草甲素(52%)和PYM(44%)相比有显著统计学意义( $P<0.05$ ).其作用机制为冬凌草甲素可阻止细胞

有丝分裂和引起G2+M期细胞堆积<sup>[16]</sup>。又发现冬凌草甲素可以改变细胞在周期中的比例, 导致G2+M比例的增加, 引起部分同步化, 由于G2及M期细胞的堆积, 利用其对M期细胞的阻断作用, 选用对G2、M期细胞敏感药物如平阳霉素或博莱霉素合用可产生增效作用<sup>[17]</sup>。经过长期临床应用, 未发现明显毒副作用, 与实验研究证明<sup>[18]</sup>冬凌草对动物骨髓、肝、肾功能均无明显影响相一致。

#### 4 参考文献

- 1 Fujita T, Takeda Y, Sun HD, Minami Y, Marunaka T, Takeda S, Yamada Y, Togo T. Cytotoxic and antitumor activities of Rabdosia diterpenoids. *Planta Med* 1988; 54: 414-417
- 2 Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Antibacterial trichorabdal diterpenes from Rabdosia trichocarpa. *Phytochemistry* 1994; 36: 1287-1291
- 3 Ikezoe T, Chen SS, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. Baicalin is a major component of PC-SPEs which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. *Prostate* 2001; 49: 285-292
- 4 Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Wu XY, Pan XL, Li MQ, Lin Q. Anti-proliferative effects of oridonin on SPC-A-1 cells and its mechanism of action. *J Int Med Res* 2004; 32: 617-625
- 5 Sartippour MR, Seeram NP, Heber D, Hardy M, Norris A, Lu Q, Zhang L, Lu M, Rao JY, Brooks MN. Rabdosia rubescens inhibits breast cancer growth and angiogenesis. *Int J Oncol* 2005; 26: 121-127
- 6 Zhang CL, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Oridonin induces a caspase-independent but mitochondria- and MAPK-dependent cell death in the murine fibrosarcoma cell line L929. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1527-1531
- 7 Ikezoe T, Yang Y, Bandobashi K, Saito T, Takemoto S, Machida H, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H. Oridonin, a diterpenoid purified from Rabdosia rubescens, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 578-586
- 8 林晨, 张覃沐, 吴文凯, 曹生海, 王德喜, 仪明光. [<sup>3</sup>H]冬凌草甲素在小鼠体内的吸收、分布和排泄. *中国药理学报* 1983; 4: 57-60
- 9 Wang RL. A report of 40 cases of esophageal carcinoma surviving for more than 5 years after treatment with drugs. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1993; 15: 300-302
- 10 Wang RL, Gao BL, Xiong ML, Mei QD, Fan KS, Zuo ZK, Lang TL, Gao GQ, Ji ZC, Wei DC. Potentiation by Rabdosia rubescens on chemotherapy of advanced esophageal carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1986; 8: 297-299
- 11 Guanrei Y, Songliang Q, He H, Guizen F. Natural history of early esophageal squamous carcinoma and early adenocarcinoma of the gastric cardia in the People's Republic of China. *Endoscopy* 1988; 20: 95-98
- 12 孙燕. 内科肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 522-548
- 13 Gao ZG, Ye QX, Zhang TM. Synergistic effect of oridonin and cisplatin on cytotoxicity and DNA cross-link against mouse sarcoma S180 cells in culture. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1993; 14: 561-564
- 14 王瑞林, 高保罗, 熊沐霖, 梅其达, 范魁生, 左中孔, 朗统伦, 高国谦, 纪珍灿, 尉德承, 张覃沐, 王留兴, 王贵吉, 陈绍堂, 周楠香. 冬凌草与化疗合用治疗食管癌增效作用的探讨. *中华肿瘤杂志* 1986; 8: 297
- 15 张覃沐, 寿马钢, 王锦英. 冬凌草甲素、博莱霉素A5和消瘤芥不同组合的抗肿瘤作用. *中国药理学报* 1986; 7: 457-460
- 16 Chen S, Gao J, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin (Rubescenin), a diterpenoid from Rabdosia rubescens, on tumor cells of different lineage. *Int J Oncol* 2005; 26: 579-588
- 17 王绵英, 寿马钢, 张覃沐. 用显微光度术和放射自显影相结合的方法研究冬凌草甲素对小鼠白血病L<sub>1210</sub>和小鼠S<sub>180</sub>细胞动力学的影响. *河南医科大学学报* 1986; 21: 24
- 18 张覃沐. 冬凌草的化学及药理作用研究. *中草药通讯* 1977; 10: 5 1977; 11: 30

编辑 程剑侠 电编 何基才

## 幽门螺杆菌阳性的疣状胃炎治疗112例

刘洁, 于皆平

### ■背景资料

疣状胃炎的发现已有半个多世纪的历史, 但到目前还没有引起广泛的重视。其病因、发病机制、本质、生化及基因改变、预后转归、是否癌变等缺乏深入研究, 对其认识存在较大分歧。

刘洁, 于皆平, 湖北省武汉市省人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

通讯作者: 刘洁, 430060, 湖北省武汉市省人民医院消化内科。  
ginger512@gmail.com

电话: 027-82915189

收稿日期: 2007-03-27 修回日期: 2007-08-09

### Treatment of verrucous gastritis with *Helicobacter pylori* infection: an analysis of 112 cases

Jie Liu, Jie-Ping Yu

Jie Liu, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Correspondence to: Jie Liu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China. ginger512@gmail.com

Received: 2007-03-27 Revised: 2007-08-09

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between *Helicobacter pylori* and verrucous gastritis.

**METHODS:** One hundred and twelve patients with verrucous gastritis diagnosed by endoscopy were randomly divided into two groups. All patients had *H pylori* infection. Patients in group A were treated with rabeprazole, amoxicillin and clarithromycin; and patients in group B were treated with rabeprazole and placebo. Treatment duration was 1 wk in both groups. After 1 mo, the clinical symptoms, endoscopic manifestations and *H pylori* infection were characterized.

**RESULTS:** There was a significant difference (89.3% vs 75.0%; 91.1% vs 76.8%;  $P < 0.05$ ) in clinical symptoms and endoscopic manifestations between group A and group B. All the patients that were clearly in good condition were followed up at 6 mo, and the relapse rate in group A was lower than that in group B ( $P < 0.05$ ). All relapsing patients were infected with *H pylori* and had a positive rate of *H pylori* of 100%. In the non-relapsing patients, the positive rate of *H pylori* was 37.7%.

**CONCLUSION:** There was a close relationship between *H pylori* and verrucous gastritis.

**Key Words:** Verrucous gastritis; *Helicobacter pylori*

Liu J, Yu JP. Treatment of verrucous gastritis with *Helicobacter pylori* infection: an analysis of 112 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2538-2541

### 摘要

**目的:** 了解疣状胃炎与*H pylori*感染的关系。

**方法:** 胃镜确诊*H pylori*阳性的疣状胃炎患者112例随机分组, 分别以雷贝拉唑钠、阿莫西林、克拉霉素根除*H pylori*治疗(A组)和雷贝拉唑钠抑酸治疗(B组)。治疗后1 mo评价症状、胃镜改善情况和*H pylori*根除情况。显效者随访至治疗后6 mo再次评价症状和胃镜改善情况、检测*H pylori*。

**结果:** 治疗1 mo后A组症状和胃镜改善情况明显好于B组, 两组比较有显著性差异(89.3% vs 75.0%; 91.1% vs 76.8%,  $P < 0.05$ )。所有显效者随访至治疗后6 mo, A组复发率11.1%, B组复发率50.0%, A组明显低于B组。两组复发者*H pylori*均为阳性, 未复发者*H pylori*阳性率为37.7%, 二者对比有显著性差异( $P < 0.05$ )。

**结论:** 疣状胃炎与*H pylori*感染密切相关。

**关键词:** 疣状胃炎; 幽门螺杆菌

刘洁, 于皆平. 幽门螺杆菌阳性的疣状胃炎治疗112例. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2538-2541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2538.asp>

### 0 引言

疣状胃炎(verrucous gastritis, VG)是一种特殊类型的胃炎, 也称痘疹性胃炎、慢性糜烂性胃炎, 其特征为胃黏膜出现多个丘疹样隆起, 顶部中央呈脐样凹陷, 凹陷处伴或不伴糜烂, 隆起周围多见红晕, 以胃窦部多见<sup>[1]</sup>。近年研究认为, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染与疣状胃炎的形成有关。我们观察根除*H pylori*对疣状

胃炎的症状、胃镜改善及疣状胃炎复发的影响,探讨疣状胃炎与*H pylori*感染的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2004-02/2005-02的门诊疣状胃炎患者112例,男59例,女53例,年龄30-74(平均50.8±9.9)岁,均经胃镜检查诊断为成熟型疣状胃炎,且经检测均为*H pylori*阳性。伴有胃和/或十二指肠溃疡患者,以及合并胃下垂、胃癌、胃息肉、肝胆疾患、阑尾炎、结肠炎、胰腺炎、感染性疾病的患者未进入本研究。本组疣状病灶位于胃窦部,表现为大小及形态不等(均>0.5 cm)的黏膜隆起性病变,起始部较陡,隆起较高,顶部脐样凹陷小而深,为糜烂灶,上覆盖灰白苔,有的伴有血痂。患者临床表现为上腹部闷胀不适、疼痛、反酸、嗝气等症状。两组患者的性别、年龄、身高、体质量等资料差异均无显著性。治疗前病灶大小、以及服药前两组患者不同症状所占比例差异无显著性( $P>0.05$ ,表1)。

### 1.2 方法

1.2 方法 患者分为2组: A组56例,给予雷贝拉唑钠(商品名:波利特)10 mg、阿莫西林1.0 g,克拉霉素0.5 g,均每日2次,早餐前半小时及睡前服用。B组56例,给予雷贝拉唑钠10 mg,每日2次,早晚po。两组疗程均为1 wk。患者于服药1 wk后门诊随访,每周记录症状及不良反应。治疗结束1 mo后,对患者的症状进行评分,并进行对比;复查胃镜,观察疣状胃炎病灶的形态、数目、大小变化、黏膜糜烂愈合程度,并对两组进行对比;同时行*H pylori*检测,了解*H pylori*根除情况。随访至治疗结束后6 mo,对所有显效者再次进行症状评分和胃镜检查,了解复发情况,并行*H pylori*检测。对上腹部闷胀不适、疼痛、反酸、嗝气进行症状评分。0分,无症状;1分,偶有症状;2分,常有症状,部分影响生活;3分,不能忍受,严重影响生活。3项症状分数相加/3为平均积分。显效:症状消失,或积分<1.5;有效:症状积分减少50%;无效:症状持续存在或恶化。总有效率包括显效和有效。胃镜表现:疣状病灶消失,活动性炎症(糜烂、坏死、渗出)消失为显效;胃镜下活动性炎症仍存在,但有所好转,疣状病灶消失1/2以上为有效;胃镜无改变或加重为无效。总有效包括显效和有效。显效者症状再次出现,积分>1.5;胃镜下再出现疣状病灶、活动性炎症,为复发。本次实验采用快速尿素酶检测和组织学染色的方法来诊断*H pylori*感染情况,两者均阳性为

表1 服药前*H pylori*阳性疣状胃炎两组患者症状评分( $n=56$ )

分组	1分	2分	3分
A	15(26.8%)	31(55.4%)	10(17.8%)
B	13(23.2%)	36(64.3%)	7(12.5%)

表2 *H pylori*阳性疣状胃炎症状和胃镜改善( $n, \%$ )

分组	显效	有效	无效	总有效
症状				
A组	36(64.3)	14(25.0)	6(10.7)	50(89.3)
B组	30(53.6)	12(21.4)	14(25.0)	42(75.0)
胃镜				
A组	35(62.50)	16(28.57)	5(8.95)	51(91.1)
B组	28(50.00)	15(26.79)	13(23.21)	43(76.8)

*H pylori*阳性,两者均阴性认为*H pylori*已根除。

统计学处理 采用SPSS统计软件分析,两组间平均年龄、身高、体质量和症状评分等计量资料均采用 $t$ 检验,两组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验,等级相关用Spearman相关分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 症状和胃镜缓解情况 治疗1 mo后,症状改善A组总有效率为89.3%,B组总有效率为75.0%。两组相比有显著性差异( $P<0.05$ ,表2)。胃镜改善A组总有效率为91.1%,B组总有效率为76.8%。两组相比有显著性差异( $P<0.05$ ,表2)。

2.2 *H pylori*根除和复发 A组*H pylori*转阴50例,根除率达89.5%;B组22例,根除率为39.4%。两组相比有明显差异( $P<0.05$ )。治疗后6 mo,对所有显效者随访。A组随访35例,复发4例,复发率11.1%;B组随访28例,复发14例,复发率50%。A组复发率明显低于B组,两组之间有显著性差异( $P<0.05$ )。两组随访者中,共复发18例,其*H pylori*阳性率为100%;未复发45例,其*H pylori*阳性率为37.7%。两者对比有显著性差异( $P<0.05$ )。复发者*H pylori*阳性率明显高于未复发者。药物不良反应:A组腹泻5例,口味差4例,恶心2例;B组腹泻3例,口味差3例。均不影响治疗。

## 3 讨论

疣状胃炎是1种临床常见的特殊类型的慢性胃炎,其内镜检出率1.2%-3.3%。近十余年来,有不少学者认为其与组织学上的淋巴细胞胃炎有

### ■ 相关报道

高晓红 *et al* 观察到疣状胃炎*H pylori*感染率明显高于慢性浅表性胃炎;金海 *et al* 做了进一步的观察,发现疣状胃炎不仅*H pylori*感染率高,而且中度以上的肠化生及异型增生均明显增高,提示其有较高的癌变倾向,值得引起重视和密切随访;于建勋 *et al*发现疣状胃炎*H pylori*阳性者其P53、P21表达均显著高于*H pylori*阴性者,进一步支持了上述观点。

### ■ 创新盘点

本文的侧重点在于探讨*H pylori*与疣状胃炎的关系。通过根除*H pylori*,观察症状、胃镜和病理表现的变化,以及随访6 mo后的情况,发现根除*H pylori*带来的好处,并观察到疣状胃炎的复发与*H pylori*再感染有关,但对于那些虽根除*H pylori*仍有疣状病灶存在的患者,其转归缺乏长期的观察资料。

## ■应用要点

由于病因不明确, 疣状胃炎的治疗亦有多种, 如抑酸、根除*H pylori*和内镜下治疗等. 通过本实验可为治疗提供一些启发, *H pylori*阳性的可行根除治疗, 对于根除后仍存在的病灶, 可考虑内镜下治疗.

对应关系<sup>[2-3]</sup>, 但近来有多项研究否认该结论<sup>[4]</sup>. 各国学者先后提出多种内镜和病理分类, 其中 Kawai *et al* 的分类最实用, 他根据病灶是否消退将疣状胃炎分为2型: (1)未成熟型: 隆起病灶主要由组织炎性水肿引起, 隆起较低, 周边平缓高起, 坡度小, 顶部脐样凹陷较大而浅. 本型易消退, 病灶一般可在数日至数月内消失, 但也可以转变为成熟型; (2)成熟型: 隆起型病变由组织增生所致, 病灶较高, 坡度较陡, 顶部凹陷较小而深, 或无脐样凹陷而呈息肉样, 少数呈香肠形或迂曲形. 胃窦部病变的活检可见幽门腺增生, 有时可见纤维化, 胃体部病变的活检为胃小凹上皮增生、延长、屈曲, 并有囊样形成. 本型病灶经治疗也不易消退.

关于疣状胃炎的病因仍不清楚<sup>[5]</sup>, 出现过多种学说. 早期有人认为疣状胃炎可能与变态反应等免疫因素有关<sup>[6]</sup>, 但至今未得到进一步证实. 此外还有酸学说<sup>[7]</sup>, 但一些研究显示疣状胃炎与胃酸分泌无关<sup>[8-10]</sup>. 现在*H pylori*已被看成是慢性胃炎的病因之一, 虽然有不同的意见<sup>[11]</sup>, 但许多研究均显示疣状胃炎患者的*H pylori*感染率较一般的慢性浅表性胃炎高, 且差异显著<sup>[12-14]</sup>, 认为*H pylori*可能是疣状胃炎的病因. *H pylori*致病因素包括空泡毒素、尿素酶分解尿素后产生的氨等毒性酶类及级联炎症作用. *H pylori*感染后参与胃黏膜的免疫反应, 产生细胞因子, 如白介素、肿瘤坏死因子等, 加剧炎症反应. Sano认为隆起的形成是由于急性胃黏膜的深度糜烂破坏或损伤了腺体颈部细胞, 结果幽门腺或胃小凹上皮孤立增生, 形成黏膜隆起. 我们观察到, 根除*H pylori*的三联疗法对症状的缓解率(89.3%)高于单纯抑酸法(75.0%), 内镜下的改变与之一致, (两组有效率分别为91.1%和76.8%), 差别均有显著意义. 提示三联疗法对症状及内镜的改善得益于*H pylori*的根除(其根除率达89.5%, 单纯抑酸法根除率39.4%, 差别有显著性). 随访6 mo, 显效的患者有部分复发, 复发者无一例外*H pylori*均为阳性, 未复发者*H pylori*阳性率仅37.7%, 两者有显著性差异. 提示复发与*H pylori*再感染有关.

总之, 众多学者已经观察到疣状胃炎的高*H pylori*感染率; 根除*H pylori*可使疣状胃炎的症状和内镜下表现得到改善; 治疗后复发者几乎均为*H pylori*阳性, 阳性率明显高于未复发者, 这揭示了疣状胃炎与*H pylori*感染密切相关, 与疣状胃炎属*H pylori*相关胃炎的理论一致. 由于

*H pylori*相关性胃炎经过若干年后可演变和发展为慢性萎缩性胃炎及肠化生, 而肠化生与胃癌的发生又密切相关, 因此早期根除*H pylori*可治疗疣状胃炎并预防其他合并症甚至恶性肿瘤的发生.

*H pylori*已被国际癌症研究机构(IARC)确定为胃癌的 I 类致癌因子, 目前也有一些研究提示疣状胃炎与胃癌相关. 如Cappell *et al*<sup>[15]</sup>通过一系列的胃镜观察, 追踪到1例疣状胃炎逐渐形成癌的过程. 李石 *et al*在191例中发现1例腺癌, 且有疣状改变、不典型增生与癌灶并存的病损区, 疣状病变与癌灶之间有过渡, 提示疣状胃炎有可能恶变. 姚忆蓉 *et al*对73例疣状胃炎进行了5 a随访, 发现4例癌变, 占5.48%, 癌变时间为1-3 a, 平均21 mo, 均在原疣状病灶上发生, 病理结果为黏膜内癌; 随访过程中病理检查显示由不典型增生向癌变的逐渐过渡. 徐三平 *et al*<sup>[10]</sup>常规病理检查发现疣状胃炎肠上皮化生29.55%, 肠上皮化生伴异型增生4.54%, 腺上皮萎缩22.73%, 比例明显高于一般浅表性胃炎, 提示疣状胃炎尤其是伴有不典型增生者有一定的癌变倾向. 宋莹 *et al*<sup>[16]</sup>用免疫组化检测P21、P53蛋白的表达, 发现疣状胃炎的表达高于慢性浅表性胃炎, 且*H pylori*阳性者高于阴性者. 陈淑萍<sup>[17]</sup>发现疣状胃炎患者胃液中CEA浓度明显高于慢性浅表性胃炎. 鉴于此, 根除*H pylori*显得尤为有意义.

值得注意的是, 仍有一些患者在根除*H pylori*后, 虽然症状得到解除, 但部分疣状病灶持续存在, 不易消退. 这提示我们, 除*H pylori*外还有其他因素参与了疣状胃炎的形成, 有待进行深入研究.

## 4 参考文献

- 1 Green PH, Gold RP, Marboe CC, Weinberg LM, Goldfarb JP, Brasitus TA. Chronic erosive gastritis: clinical, diagnostic, and pathological features in nine patients. *Am J Gastroenterol* 1982; 77: 543-547
- 2 Haot J, Berger F, Andre C, Moulinier B, Mainguet P, Lambert R. Lymphocytic gastritis versus varioliform gastritis. A historical series revisited. *J Pathol* 1989; 158: 19-22
- 3 Haot J, Jouret A, Willette M, Gossuin A, Mainguet P. Lymphocytic gastritis--prospective study of its relationship with varioliform gastritis. *Gut* 1990; 31: 282-285
- 4 Ribeiro VL, Barbosa AJ, Barros CA. Varioliform gastritis: frequency and relationship with lymphocytic gastritis. *Arq Gastroenterol* 2000; 37: 7-12
- 5 许国铭, 李兆申. 上消化道内镜学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 328-329
- 6 Andre C, Gillon J, Moulinier B, Martin A, Fargier



- MC. Randomised placebo-controlled double-blind trial of two dosages of sodium cromoglycate in treatment of varioliform gastritis: comparison with cimetidine. *Gut* 1982; 23: 348-352
- 7 Elta GH, Fawaz KA, Dayal Y, McLean AM, Philipps E, Bloom SM, Paul RE, Kaplan MM. Chronic erosive gastritis--a recently recognized disorder. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 7-12
- 8 Karvonen AL, Sipponen P, Lehtola J, Ruokonen A. Gastric mucosal erosions. An endoscopic, histological, and functional study. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 1051-1016
- 9 Rudzinski J, Kula Z, Jesa A. Gastric secretion in chronic erosive gastritis. *Przegl Lek* 1992; 49: 154-156
- 10 徐三平, 易粹琼, 张锦坤. 隆起糜烂性胃炎的临床及与酸相关性的研究. *中华消化内镜杂志* 1998; 4: 235-236
- 11 Rutgeerts L, Stuer A, Vandenborre K, Ghillebert G, Tanghe W. Lymphocytic gastritis. Clinical and endoscopic presentation and long-term follow-up. *Acta Gastroenterol Belg* 1995; 58: 238-242
- 12 Malfertheiner P, Stanescu A, Baczako K, Bode G, Ditschuneit H. Chronic erosive gastritis--a therapeutic approach with bismuth. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1988; 142: 87-92
- 13 金海, 於云燕. 367例疣状胃炎与幽门螺杆菌及病理关系的探索. *中华消化杂志* 2005; 25: 495-495
- 14 高晓红, 杨海鹰, 李英华, 李智力, 李小丽. 幽门螺杆菌与疣状胃炎伴或不伴糜烂及慢性表性胃炎相关性的研究. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 228-229
- 15 Cappell MS, Green PH, Marboe C. Neoplasia in chronic erosive (varioliform) gastritis. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 1035-1039
- 16 宋莹, 于建勋, 王炜佳, 梁洪亮. 疣状胃炎、胃癌组织中幽门螺杆菌感染与p53、p21蛋白表达. *中国老年学杂志* 2006; 10: 1341-1343
- 17 陈淑萍. 胃液CEA、 $\beta_2$ -MG测定与疣状胃炎关系的初步研究. *浙江医学* 2006; 28: 244-245

#### ■同行评价

本文研究了疣状胃炎与H pylori感染密切相关, 选题准确, 设计合理, 有一定的临床意义和实用价值.

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 •



APASL 2008 Seoul



The 18<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver

March 23 (Sun) - 26 (Wed), 2008

COEX Convention Center, Seoul, Korea

Online abstract submission and registration is available at [www.apaslseoul2008.org](http://www.apaslseoul2008.org)

#### Tentative Scientific Program

1. Postgraduate Courses: Viral Hepatitis; present and future
2. Symposia: Liver cancer: a critical reappraisal of current practice; New insights in NAFLD; New therapeutic approach to HCC; Therapy for viral hepatitis: promises and pitfalls; Management for complications of liver cirrhosis; Liver pathology: an update; Metabolic and autoimmune liver diseases
3. Plenary Presentations
4. New APASL Guideline of Chronic Hepatitis B Treatment
5. Research Workshop
6. State-of-the-art Lectures
7. Imaging Courses
8. Surgical Hepatology/ Transplantation
9. Endoscopy Course
10. AASLD-APASL Joint Workshop

Contact: APASL 2008 Seoul Secretariat, Tel: +82-2-3452-7241/Fax: +82-2-521-8683,

E-mail: [info@apaslseoul2008.org](mailto:info@apaslseoul2008.org).

# 胃窦粗大皱襞的临床表现、内镜形态及组织学改变

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云

## ■背景资料

我们在进行胃镜检查时, 经常会发现胃窦部小弯侧存在一或数条纵行皱襞, 并发现这些患者较普遍存在进食后较长时间的上腹饱胀和/或隐痛, 药物治疗难以奏效, 我们认为这是一种与炎症有关的病变, 是慢性胃炎反复发作后形成的, 为了进一步了解这一病变的形成原因, 探索治疗方法, 故对胃窦部粗大皱襞进行临床、内镜形态及组织学研究。

## ■研究前沿

关于胃部的粗大皱襞, 国内报道较少, 且大部分内容与本文所述内容并不一致, 文献上所谓的粗大皱襞指的是胃内良性或恶性病变所形成黏膜粗大或隆起, 大部分是恶性病变。而本文所述为慢性胃炎反复发作所形成的胃窦部的黏膜粗大隆起, 目前关于此方面的文献极少。

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云, 中国人民解放军251医院消化科 河北省张家口市 075000  
通讯作者: 程秀莲, 075000, 河北省张家口市, 中国人民解放军251医院消化科. wangbx19560715@sina.com  
收稿日期: 2006-11-20 修回日期: 2007-08-09

## Clinical manifestation, morphology under gastroscopy and histological alterations in patients with hypertrophic gastric folds

Xiu-Lian Cheng, Bing-Xin Wang, Qing-Hua Ren, Bo Hao, Xiao-Yi Song, Ai-Guo Fu, Yun Yang

Xiu-Lian Cheng, Bing-Xin Wang, Qing-Hua Ren, Bo Hao, Xiao-Yi Song, Ai-Guo Fu, Yun Yang, Digestive Department of Chinese PLA 251 Hospital, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Xiu-Lian Cheng, Digestive Department of Chinese PLA 251 Hospital Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China. wangbx19560715@sina.com  
Received: 2006-11-20 Revised: 2007-08-09

## Abstract

**AIM:** To explore causative agents, clinical manifestations, morphology under gastroscopy and histological alterations in patients with hypertrophic gastric folds (HGFs).

**METHODS:** Determining clinic characteristics, recording details of morphology under gastroscopy, detecting histological alterations, and calculating the infection rate of *Helicobacter pylori* in patients with HGFs.

**RESULTS:** Clinical characteristics were persistent superior abdominal distention or vague pain that was not improved by treatment with prokinetics or dijex. The frequent HGF morphology was longitudinal institia shaped, half-moon and unrepresentative round. In general, there were one to four HGFs that did not disappear after pumping air through the gastroscope in the sinus ventriculi on the lesser curvature side, the most part of which could enter the dodecactylon and block the duodenal opening of the stomach. All patients had gastritis, some accompanied with a duodenal bulbar ulcer. Pathology

of HGFs showed superficial gastritis, atypical hyperplasia, intestinal metaplasia, and glandular organ reduction. The rate of infection with *H pylori* was 84.98%.

**CONCLUSION:** The rate of infection with *H pylori*, atypical hyperplasia and intestinal metaplasia in patients with HGF is higher than that for superficial gastritis, which may be related to gastric carcinogenesis.

**Key Words:** Hypertrophic gastric folds; Gastroscopy; *Helicobacter pylori*; Atypical hyperplasia; Intestinal metaplasia

Cheng XL, Wang BX, Ren QH, Hao B, Song XY, Fu AG, Yang Y. Clinical manifestation, morphology under gastroscopy and histological alterations in patients with hypertrophic gastric folds. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2542-2544

## 摘要

**目的:** 探讨胃窦部粗大皱襞形成的原因、临床表现、内镜形态及组织学改变。

**方法:** 对胃镜检查中发现有胃窦部粗大皱襞患者, 询问临床特点、内镜下检查形态、活组织病理检测其组织学改变, <sup>13</sup>C尿素呼气试验测定其幽门螺杆菌感染率。

**结果:** 临床见有进食后上腹饱胀及上腹隐痛, 伴有反酸、烧心、嗝气, 胃动力药及助消化药物不能改善症状; 内镜下形态以纵行条状粗大皱襞多见, 弧形、类圆形次之。位于胃窦部小弯侧, 1-4条, 通向幽门, 大部分脱入十二指肠, 所有患者均有不同程度的胃炎。病理提示不同程度浅表性胃炎或不典型增生, 伴糜烂者不典型增生比例较高。肠上皮化生、腺体数量减少也占一定比例。幽门螺杆菌阳性率为84.98%。

**结论:** 在胃窦部粗大皱襞中, 幽门螺杆菌感染, 不典型增生和肠上皮化生较一般浅表性胃炎高, 可能与胃癌的发生有一定关系。

**关键词:** 粗大皱襞; 胃镜; 幽门螺杆菌; 不典型增生; 肠化生

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云. 胃窦粗大皱襞的临床表现、内镜形态及组织学改变. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2542-2544  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2542.asp>

## 0 引言

正常情况下胃窦及幽门前区黏膜光滑, 没有皱襞或肿物, 多年来, 我们在胃镜检查中经常观察到在此区出现一些形态各异的粗大皱襞, 我们在11 032例进行胃镜检查的患者中发现323例患者胃窦部有粗大皱襞, 并对其进行了组织学、内镜及临床的追踪观察, 现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 门诊就诊或住院患者323例; 男151例, 女172例, 男女之比为1:1.14; 年龄31-83岁(48.48±26.42)岁. 病程3 mo至11 a, 平均(3.43±1.14)a.

1.2 方法 胃镜检查胃窦部发现有粗大皱襞者, 追问并观察患者有无消化道症状, 如上腹饱胀, 上腹隐痛, 反酸、烧心、嗝气, 恶心、呕吐等症状. 胃镜检查检出后, 每3 mo复诊, 给予常规治疗, 追踪观察患者症状改善情况. 内镜下观察行胃镜检查的患者胃窦部发现粗大皱襞后, 观察皱襞的形态, 数目, 长度, 程度, 有无脱入幽门或十二指肠, 有无堵塞幽门口, 胃内炎症程度, 有无糜烂及溃疡. 胃镜检查发现有粗大皱襞的患者, 在粗大皱襞上活检, 做病理检查, 主要观察胃黏膜的慢性炎症、活动性炎症、肠化生、不典型增生, 并按标准进行分级<sup>[1]</sup>. 用<sup>13</sup>C尿素呼气试验检测幽门螺杆菌, 追踪观察要求患者3 mo复诊, 并按上述项目进行复查并详细记录.

## 2 结果

2.1 临床和内镜下表现 患者进食后上腹饱胀持续时间较长及上腹隐痛, 或伴有反酸、烧心、嗝气, 胃动力药及助消化药物不能改善症状. 上腹饱胀306例, 占94.74%; 间断上腹隐痛290例, 占89.78%; 反酸、烧心、嗝气216例, 占66.87%. 内镜下: 323例发现胃窦幽门前区粗大皱襞(占总检查人数的2.93%), 其内镜下形态以纵行条状多见, 弧形、类圆形次之. 经过充分注气后仍不消失, 部位以胃窦部小弯侧最多, 242例(74.92%)为1条, 32例(9.91%)为2条, 29例(8.99%)为3条, 20例(6.19%)4条. 均通向幽门, 脱入十二指肠301例(93.19%), 不同程度堵塞幽门口, 严重者皱襞

紊乱使幽门口变形甚至使胃窦变形, 导致幽门狭窄(图1). 其中129例(39.93%)皱襞表面黏膜糜烂、充血, 21例(6.50%)伴十二指肠球部溃疡, 所有患者均有不同程度的胃炎.

2.2 病理和幽门螺杆菌检查结果 对这些粗大皱襞进行活检, 病理提示不同程度浅表性胃炎或不典型增生, 慢性胃炎分级: 轻度: 16例, 占4.95%, 中度: 64例, 占19.81%, 重度: 243例, 占75.23%. 慢性活动性胃炎分级: 0级: 32例, 占9.91%. 1级: 61例, 占18.89%. 2级: 78例, 占24.15%. 3级: 152例, 占47.06%. 粗大皱襞表面伴糜烂者不典型增生比例较高. 在323例患者中这种不典型增生或细胞异形变有83例, 占25.70%, 其中轻度31例, 中度39例, 重度13例. 另外, 有109例伴肠上皮化生(33.75%), 46例(14.24%)病理结果为腺体数量减少. 用<sup>13</sup>C尿素呼气试验检测253例, 215例幽门螺杆菌阳性, 阳性率为84.98%, 其中伴有表面糜烂、充血129例, 122例幽门螺杆菌阳性, 其阳性率为94.57%. 我们对201例患者进行追踪观察, 患者均按消化性溃疡或胃炎的常规方法治疗, 内镜检查复查分别在治疗后3 mo至3 a, 复查结果粗大皱襞无1例幽门螺杆菌消失, 其中78例患者皱襞增大(38.81%). 临床症状均无明显改善(部分患者服药后有改善, 但近期复发). 病理复查所有肠上皮化生仍存在, 并增加了15例. 原有轻度不典型增生中有6例消失, 5例转为中度. 而在中、重度不典型增生患者中, 有4例呈腺瘤样增生, 1例出现癌细胞.

## 3 讨论

在胃镜检查过程中经常可以观察到胃窦部所出现的粗大皱襞, 这些粗大皱襞大多经幽门脱入十二指肠球部, 造成幽门的堵塞, 在胃蠕动时食物通过困难, 幽门变形, 关闭不全或关闭迟缓, 引起胆汁反流, 所以患者多伴有消化不良症状, 如上腹饱胀不适、纳差、上腹隐痛等, 大部分患者以持续上腹饱胀为主, 对药物治疗无改善. 内镜下对粗大皱襞活检病理均为浅表性胃炎表现, 其病理基础可能由于局部炎症, 血管通透性增加, 炎症细胞及红细胞渗出, 另外, 由于炎症反复发作, 使大量胶原纤维增生和细胞增生, 局部组织隆起形成了粗大皱襞, 或纤维收缩使黏膜呈条索状变形, 随着胃的蠕动逐渐脱入十二指肠球部. 经长期观察, 粗大皱襞形成后将长期存在, 难以消失. 随着炎症反复发作, 不断增生、肠上皮化生, 皱襞会增大增粗, 腺瘤样变

## ■名词解释

胃窦部粗大皱襞, 是指胃窦部以炎症病变为主的, 黏膜皱襞的纵行隆起, 从幽门口脱入十二指肠球部, 部分堵塞幽门, 从而影响了胃排空, 少部分患者出现了癌前病变及癌变.

### ■同行评价

本文通过观察胃窦部粗大皱襞裂的临床、内镜表现,提供了有意义的结论,选题有一定的新颖性,行文流畅,方法结果可信,具有一定的临床参考价值。

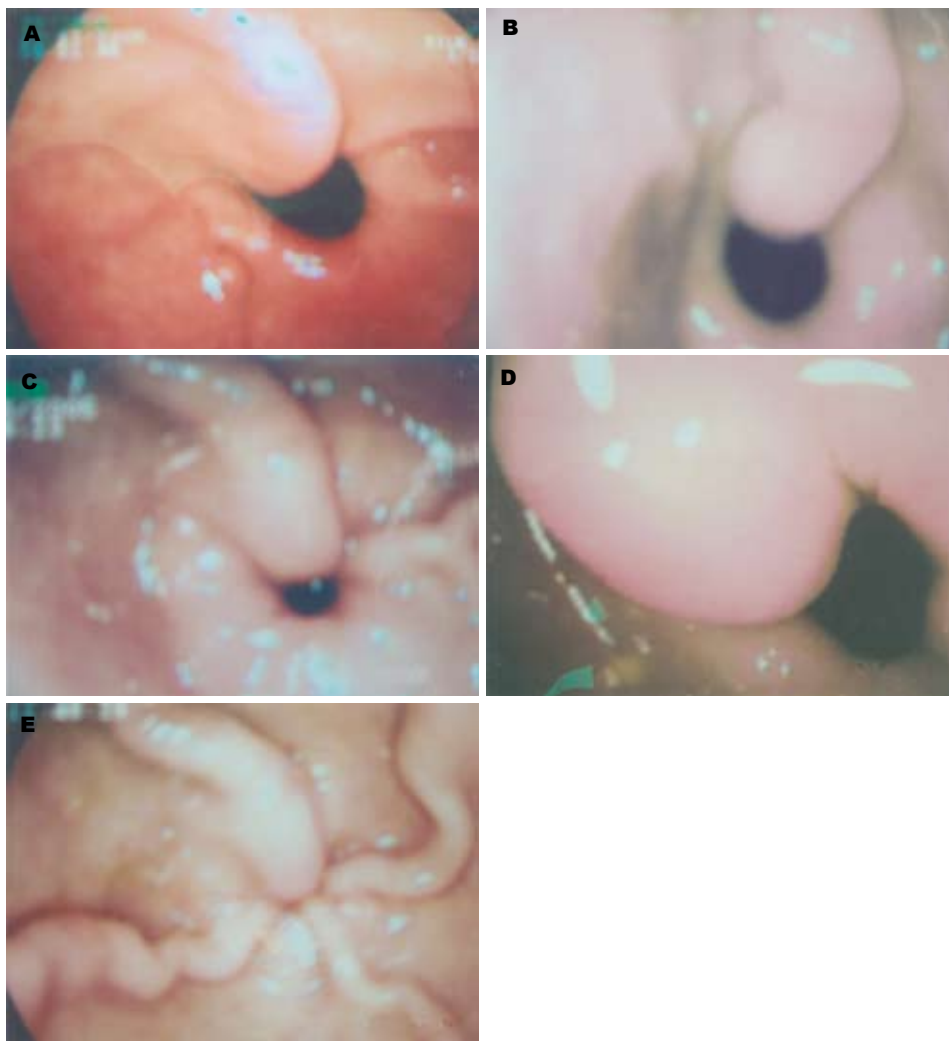


图1 胃窦胃镜检查。A: 幽门前区黏膜充血水肿, 1条粗大皱襞, 通向幽门口, 幽门口部分堵塞; B: 胃窦幽门前区黏膜充血水肿, 1条纵行粗大皱襞, 通向幽门口, 幽门口部分堵塞; C: 胃窦部充血水肿, 2条粗大皱襞, 通向幽门口, 幽门口大部分堵塞; D: 胃窦部充血水肿, 椭圆形粗大皱襞, 部分堵塞幽门口; E: 胃窦幽门前区充血水肿, 4条粗大皱襞, 脱入十二指肠球部, 堵塞幽门口。

或恶变。

胃窦部粗大皱襞形成的原因目前尚不十分清楚, 本文所描述的胃窦部的粗大皱襞与文献报道<sup>[2-4]</sup>不完全一致, 文献报道的粗大皱襞多为恶性病变所造成, 本文所报道粗大皱襞, 主要为炎症引起, 其幽门螺杆菌感染率比一般浅表性胃炎为高。有报道认为还与遗传、黏膜下结缔组织疏松有关<sup>[2]</sup>, 或与饮酒有关。组织活检病理检查对于不典型增生和肠上皮化生较没有粗大皱襞的浅表性胃炎发生率高, 这些病变与癌变的关系, 一般认为轻度增生呈明显良性, 可随炎症消失而消失; 中度不典型增生亦属于良性改变, 但细胞结构已明显变异, 可能是重要的癌前

病变; 重度不典型增生接近癌变, 与高分化腺癌不易区别。鉴于胃窦部是胃癌的好发部位, 当幽门前区出现粗大皱襞尤其不典型增生或肠化生时, 应密切注意, 宜定期复查, 追踪观察, 必要时给予适当治疗, 以阻止其癌变。

### 4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见. 中华消化杂志 2000; 20: 199-201
- 2 鞠爱红, 牟正彬, 明俊英. 胃黏膜粗大皱襞的胃镜诊断与病因分析. 中国内镜杂志 2002; 8: 57-61
- 3 刘晓红, 杨爱明, 陆星华, 陈红燕. 内镜下胃黏膜皱襞粗大45例分析. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 281
- 4 王晓燕, 沈守荣, 唐五良, 王芬, 肖定华. 高频微探头内镜超声在胃皱襞粗大病变中的诊断价值. 中华超声影像学杂志 2006; 15: 674-675

编辑 程剑侠 电编 何基才

# 安速快速检测试剂盒诊断幽门螺杆菌的现症感染

杨桂彬, 魏红, 胡伏莲, 牟方宏, 崔梅花

杨桂彬, 魏红, 牟方宏, 崔梅花, 北京大学航天临床医学院消化科 北京市 100049

胡伏莲, 北京大学第一医院消化科 北京市 100034

通讯作者: 胡伏莲, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化科. hufli@263.net

电话: 010-88200923 传真: 010-88200030

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-08-07

## Evaluation of the Assure *H pylori* Rapid Test for detection of *Helicobacter pylori*

Gui-Bin Yang, Hong Wei, Fu-Lian Hu, Fang-Hong Mu, Mei-Hua Cui

Gui-Bin Yang, Hong Wei, Fang-Hong Mu, Mei-Hua Cui, Department of Gastroenterology, Aerospace Clinical Medical School of Peking University, Beijing 100049, China

Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Correspondence to: Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Street, West Urban District, Beijing 100034, China. hufli@263.net

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-08-07

## Abstract

**AIM:** To evaluate the accuracy of a new office-based serological test (Assure *H pylori* Rapid Test with current infection marker) for the detection of current infection with *Helicobacter pylori*, compared with the Warthin-Starry stain and rapid urease test (RUT).

**METHODS:** Warthin-Starry staining and RUT for detection of current infection with *H pylori* was performed in 154 consecutive patients with upper gastrointestinal symptoms who underwent gastroscopy. The combination of the results of RUT and Warthin-Starry is regarded as the gold standard for detection of current infections with *H pylori*. All subjects simultaneously underwent serological testing with the Assure *H pylori* Rapid Test kit, using a 20  $\mu$ L finger prick blood sample. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of this test were calculated against those of the RUT and Warthin-Starry standard.

**RESULTS:** Compared to the gold standard,

sensitivity and specificity of this new serological test were 92.0% (81/88) and 94.0% (47/50), respectively. The positive and negative predictive values of this test were 96.4% (81/84) and 87.0% (47/54), respectively, and accuracy was 92.8% (128/138). Compared to RUT, sensitivity and specificity of this new serological test were 89.7% (87/97) and 91.2% (52/57), respectively. The positive and negative predictive values were 94.6% (87/92) and 83.9% (52/62), respectively, and accuracy was 90.3% (139/154).

**CONCLUSION:** The Assure *H pylori* Rapid Test, like RUT, is a simple and accurate method for rapid diagnosis of current infection with *H pylori*.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Serology; Diagnosis

Yang GB, Wei H, Hu FL, Mu FH, Cui MH. Evaluation of the Assure *H pylori* Rapid Test for detection of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2545-2548

## 摘要

**目的:** 评价安速幽门螺杆菌(*H pylori*)快速检测卡诊断*H pylori*现症感染的敏感性、特异性。

**方法:** 对154例因上消化道症状进行胃镜检查的患者同时进行快速尿素酶试验及Warthin-Starry银染, 同时取指血进行安速快速检测试剂盒检测。以快速尿素酶试验和Warthin-Starry银染同时阳性或阴性作为诊断是否*H pylori*感染的金标准。

**结果:** 和金标准相比较, 安速快速检测试剂盒敏感性为92.0%(81/88), 特异性为94.0%(47/50)。准确率为92.8%(128/138); 与RUT相比安速快速检测试剂盒敏感性为89.7%(87/97), 特异性为91.2%(52/57), 准确性为90.3%(139/154)。

**结论:** 安速快速检测试剂盒在没有进行根除治疗的患者中能够较好的反应现症感染的情况, 临床可用于*H pylori*现症感染的诊断。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 血清学; 诊断

## ■背景资料

安速*H pylori*快速检测卡由于含有现症感染条带(CIM), 对*H pylori*的现症感染有较大的价值。



### ■应用要点

本研究表明该检测卡诊断 *H pylori* 感染有较高的敏感性、特异性及准确性。在没有进行根除治疗的患者可以较好的反应现症感染的情况,但是,这一条带在 *H pylori* 根除治疗后并不马上消失,需要一定的时间,所以仍不宜用于近期检测 *H pylori* 根除效果。

杨桂彬, 魏红, 胡伏莲, 牟方宏, 崔梅花. 安速快速检测试剂盒诊断幽门螺杆菌的现症感染. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2545-2548

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2545.asp>

## 0 引言

1983年Marshall和Warren<sup>[1]</sup>首次分离出幽门螺杆菌(*H pylori*)以来, *H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤关系逐渐得到明确,从而引发了慢性胃、十二指肠疾病认识上的革命<sup>[2]</sup>。目前 *H pylori* 的检测和治疗已经成为胃肠道疾病上诊治最重要的内容。安速 *H pylori* 快速检测卡是一种胶体金间接固相免疫色谱分析,由于含有现症感染条带(current infection marker, CIM),相对于其他的血清学检查方法,对 *H pylori* 的现症感染有较大的价值<sup>[3-4]</sup>。本研究是利用安速快速免疫卡检测患者 *H pylori* 现症感染,评价其在诊断 *H pylori* 现症感染诊断中的价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2005-08/12因上消化道症状进行胃镜检查154例,男83例,女71例,平均年龄43±17(16-77)岁。排除标准:患者半年内接受过 *H pylori* 根除治疗;在1 mo内服用过抗生素;有胃部手术病史;半月服用过铋剂和质子泵抑制剂以及硫糖铝等药物。

1.2 方法 用快速尿素酶试验(RUT)和组织学染色(Warthin-Starry银染)作为诊断 *H pylori* 感染的金标准,2项检查均阳性判定为 *H pylori* 感染,均阴性判定为 *H pylori* 阴性。血清学检查严格按照操作说明,取1滴指血到检测卡的标本孔,随即加入1滴缓冲液,当标本沿着滤膜扩散,到达粉色的指示线时,在圆孔中加入2滴缓冲液,并拉出塑料片,15 min内读结果。B条带和C条带均阳性表示现症感染,仅有C阳性表示既往感染。检测卡由Genelab公司提供,批号:43481-020。

**统计学处理** 采用SPSS10.0进行统计。计算快速检测试剂盒的敏感性和特异性以及阳性和阴性预测值。

## 2 结果

2.1 各检测方法检测结果 共有154人纳入本研究,其中RUT和Warthin-Starry银染检测 *H pylori* 均阳性者88人,其中81人安速 *H pylori* 快速检测卡阳性;均阴性者50人,其中47人安速 *H pylori* 快

表 1 3种幽门螺杆菌检测方法的检测结果

RUT	Warthin-Starry银染	安速检测试剂盒	n
+	+	+	81
+	+	-	7
+	-	+	6
+	-	-	3
-	-	-	47
-	-	+	3
-	+	+	2
-	+	-	5

速检测卡阴性, RUT和Warthin-Starry银染检测结果不一致者共16人。RUT阳性者97例,其中87人安速 *H pylori* 快速检测卡阳性, RUT阴性者57例,其中52人安速 *H pylori* 快速检测卡阴性;银染阳性者95人,其中83人安速 *H pylori* 快速检测卡阳性,银染阴性者59例,其中50例安速 *H pylori* 快速检测卡阴性。各检测方法检测结果见表1。

2.2 安速 *H pylori* 快速检测试剂盒敏感性和特异性 相对于金标准、RUT以及Warthin-Starry银染,安速 *H pylori* 快速检测试剂盒敏感性分别为92.0%(81/88), 89.7%(87/97)以及87.4%(83/95),特异性分别为94.0%(47/50), 91.2%(52/57)以及84.7%(50/59),阳性预测值分别为96.4%(81/84), 94.6%(87/92)以及90.2%(83/92),阴性预测值分别为87.0%(47/54), 83.9%(52/62)以及80.6%(50/62),准确率分别为92.8%(128/138), 90.3%(139/154)以及86.4%(133/154)。

## 3 讨论

临床上检测 *H pylori* 的方法很多,包括侵入性的检测方法和非侵入性的检测方法,侵入性检查指依赖胃镜取材的检测方法。包括组织学检测、细菌培养、RUT、分子生物学技术等。组织学检测及细菌培养可以作为诊断 *H pylori* 感染的金标准。RUT是目前临床上最常用的 *H pylori* 诊断方法,如果患者有报警症状,如贫血、上消化道出血,或者体质量减轻,年龄大于45岁,则需要接受胃镜检查,排除上胃肠道病变。在胃镜检查的同时可以进行RUT诊断是否有 *H pylori* 感染<sup>[5-6]</sup>。RUT可在胃镜检查时快速进行,费用低廉、操作简便易行,有很高的敏感性和特异性<sup>[7-8]</sup>。非侵入性检查包括血清学检测、粪便抗原检测、<sup>13</sup>C/<sup>14</sup>C-尿素呼气试验等。目前有关 *H pylori* 感染处理的临床指南推荐对45岁以下且没有报警症状的消化不良患者适用“检测-治

疗”的处理策略. 可以不进行胃镜检查, 直接应用非侵入性的检测方法进行*H pylori*的检测, 若检测阳性则给予根除. 非侵入性的*H pylori*检测方法在这部分患者的处理上有更重要的意义.

非侵入性的检查中UBT和粪便抗原虽然可以较好的诊断现症感染<sup>[9-14]</sup>, 但是UBT需要复杂的设备和技术支持, 费用昂贵; 粪便抗原不能在办公室进行, 需要专门的场合处理患者的粪便. 这些问题限制了这两种方法在临床上的应用. 血清学检查方法检测血中的抗体, 不受尿素酶活性的影响, 可以较好的诊断*H pylori*感染, 但是对*H pylori*现症感染诊断价值有限. 因此, 临床上还需要一种简单的、可靠、便宜、容易操作、能够在办公室进行, 可以诊断*H pylori*现症感染的非侵入性检查方法<sup>[15]</sup>. 新加坡Genelab公司开发的含有现症感染条带(current infection marker, CIM)的安速*H pylori*快速检测试剂盒是一种血清学检测方法, 通过胶体金间接固相免疫色谱分析, 检测标本(血清、血浆或全血)中的抗体. 在检测卡上除了质控条带外, 还含有B和C两个条带. 两个条带的抗原为*H pylori* cDNA文库筛选、分离、重组出特异性较强的*H pylori*抗原蛋白(C1及A22蛋白). B带仅包含C1抗原, C带包含C1及A22抗原; B带、C带均呈阳性反应说明血清中含有C1抗原的抗体, 提示现症感染, 单纯的C带阳性说明血清中只有抗原A22的抗体, 提示曾经感染.

该试剂盒可作为*H pylori*活动性感染初筛试验, 如果患者检测阳性, 并半年内未接受*H pylori*根除治疗, 应高度怀疑*H pylori*活动性感染. 该试剂盒经我国香港、亚洲和西方人群中多项研究<sup>[3,16-19]</sup>表明其敏感度和特异性均>90%. 在国内尚未见有关评估该检测方法的研究. 本研究是利用安速快速免疫卡检测患者*H pylori*现症感染, 评价其在诊断*H pylori*现症感染诊断中的价值.

在本研究中, 相对于联合应用RUT和组织学检查的金标准, 安速快速检测试剂盒的敏感性为92%, 特异性达到94%, 准确率达到92.8%, 与其他同类研究结果一致, 完全可以满足临床需要. 安速快速检测卡区别于其他血清学检测方法最大的不同在于不仅可以检测既往感染, 还可以检测现症感染. 目前, 临床上大多数*H pylori*感染的诊断是通过有创的RUT进行的, 在本研究中, 相对于RUT安速快速检测卡敏感性为89.7%, 特异性91.2%, 准确

率为90.3%, 这两种检查有很好的 consistency. 在不需要胃镜检查的患者中, 完全可以用该方法代替RUT诊断*H pylori*现症感染. 安速快速检测卡在没有进行根除治疗的患者可以较好的反应现症感染的情况, 但是, 这一条带在*H pylori*根除治疗后并不马上消失, 需要一定的时间, 所以仍不宜用于近期检测*H pylori*根除效果.

## 4 参考文献

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- 2 胡伏莲. 重视幽门螺杆菌与上胃肠道疾病关系的研究. *中华医学杂志* 1998; 78: 483-484
- 3 Mumtaz K, Abid S, Yakoob J, Abbas Z, Hamid S, Islam M, Shah HA, Jafri W. An office-based serological test for detection of current *Helicobacter pylori* infection: is it useful? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 85-88
- 4 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染诊疗指南. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 55-67
- 5 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 6 中华医学会消化病学分会. 对幽门螺杆菌若干问题的共识意见(2003·中国). *中华医学杂志* 2004; 84: 522-523
- 7 Kamiya S, Taniguchi I, Yamamoto T, Shirai T, Harasawa S, Miwa T, Ozawa A. Evaluation of rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 450-452
- 8 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 250-252
- 9 Klein PD, Malaty HM, Martin RF, Graham KS, Genta RM, Graham DY. Noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: the 13C urea breath test. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 690-694
- 10 成虹, 胡伏莲. 幽门螺杆菌粪便抗原免疫卡在诊断幽门螺杆菌现症感染和判断其在根除治疗中的价值. *中华医学杂志* 2004; 84: 1166-1170
- 11 Tanaka A, Watanabe K, Tokunaga K, Hoshiya S, Imase K, Sugano H, Shingaki M, Kai A, Itoh T, Ishida H, Takahashi S. Evaluation of *Helicobacter pylori* stool antigen test before and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 732-738
- 12 Tanaka A, Takahashi S. *Helicobacter pylori* stool antigen test. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 464-469
- 13 Calvet X, Quesada M, Sanfeliu I, Montserrat A, Brullet E, Real J, Segura F, Campo R. Evaluation of a rapid test (ImmunoCard STAT! HpSA) for *Helicobacter pylori* detection in stools. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26: 531-534
- 14 Kato S, Ozawa K, Okuda M, Nakayama Y, Yoshimura N, Konno M, Minoura T, Iinuma K. Multicenter comparison of rapid lateral flow stool antigen immunoassay and stool antigen enzyme immunoassay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2004; 9: 669-673

## ■同行评价

本文通过临床观察安速*H pylori*快速检测试剂盒的作用, 说明其对*H pylori*的检测具有较高的敏感性和特异性, 研究目的明确, 方法恰当, 统计学处理较合理, 有一定的潜在应用价值.

- 15 Megraud F. How should *Helicobacter pylori* infection be diagnosed? *Gastroenterology* 1997; 113: S93-98
- 16 Hung CT, Leung WK, Chan FK, Sung JJ. Comparison of two new rapid serology tests for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese patients. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 111-115
- 17 Leung WK, Chow TP, Ng EK, Chan FK, Chung SC, Sung JJ. Validation of a new immunoblot assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in the Asian population. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 423-428
- 18 Leung WK, Ng EK, Chan FK, Chung SC, Sung JJ. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for diagnosis of *Helicobacter pylori* in Chinese patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 13-17
- 19 Wong BC, Wong W, Tang VS, Lai K, Yuen S, Hu WH, Chan C, Lau GK, Lai C, Lam S. An evaluation of whole blood testing for *Helicobacter pylori* infection in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 331-335

编辑 何燕 电编 张敏

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

• 消息 •

## 第三届国际微创外科论坛暨 2007 年天津市 消化内镜学会征文通知

**本刊讯** 为了跟踪国际发展的最新态势,加强该领域的交流与合作,由天津市医学会主办,天津市南开医院、天津市微创外科中心承办的“第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学会”将于2007-11-02/04在天津举办。

本次会议还将邀请澳大利亚、奥地利、日本、香港等国家和地区及国内内镜、腹腔镜领域的知名专家与会,以专题讲座及操作演示等方式展示当前微创外科(肝胆胰肠胃肠)领域的最新前沿技术,其中包括:大会专题演讲及大会论文交流;微创手术实况演示;内镜操作实况演示;世界级大师精彩手术实况演示;国家级继续教育项目;微创手术新技术与新器械;微创外科手术设备与器械展示。

### 1 征文内容和要求

征文内容:凡是与本次会议内容相关的实验研究、临床工作总结、新方法、新技术、新器械等论文,尚未在全国性学术会议上交流和尚未在国内外正式刊物上发表过的论文。征文要求:论文、摘要、软盘各一份,论文字数限4000字以内,摘要800字以内,按“目的、方法、结果、结论”。摘要中写明:“题目、作者、单位(包括城市和邮编)。截止日期:2007-09-30。

### 2 联系方式

300100,天津市南开区三纬路122号,天津市南开医院,邹富胜收,注明会议论文。

# 术中超声——微创观念在肝脏肿瘤手术中的应用

宋宣, 刘连新, 姜洪池

宋宣, 刘连新, 姜洪池, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

通讯作者: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科.

liulianxin@medmail.com.cn

电话: 0451-53643849-3886

收稿日期: 2007-05-07 修回日期: 2007-08-06

## Intraoperative ultrasound: a minimally invasive application in liver neoplasm surgery

Xuan Song, Lian-Xin Liu, Hong-Chi Jiang

Xuan Song, Lian-Xin Liu, Hong-Chi Jiang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Lian-Xin Liu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liulianxin@medmail.com.cn

Received: 2007-05-07 Revised: 2007-08-06

## Abstract

**AIM:** To investigate the application of intraoperative ultrasound to surgery for liver neoplasms.

**METHODS:** Intraoperative ultrasound was used to scan 78 patients with liver neoplasms. The results of intraoperative ultrasound were compared with those of preoperative ultrasound and computed tomography (CT)/enhanced CT.

**RESULTS:** Of 65 patients suffering from liver cancer, intraoperative ultrasound determined all cases, whereas preoperative ultrasound and CT/enhanced CT missed 10 and 6 cases, respectively. For diagnostic accuracy of liver hemangioma, intraoperative ultrasound was better than preoperative ultrasound and CT/enhanced CT (92.31% vs 69.23% and 76.92%, respectively). For small-sized foci with diameters  $\leq 1.0$  cm, intraoperative ultrasound had a statistically significant better detection rate than preoperative ultrasound or CT/enhanced CT (90.48% vs 59.52% and 69.05%, respectively, both  $P < 0.05$ ). Intraoperative ultrasound could also better ascertain lesions with diameters bigger. The detection rate

was 96.36%, which was significantly higher than that of preoperative ultrasound (74.55%,  $P < 0.05$ ). The operative style was changed in 22 patients and all lesions were removed after intraoperative ultrasound scans that then determined the resection line and pathway. No residual cancer cells were found at the cutting edge.

**CONCLUSION:** Compared with preoperative ultrasound and CT/enhanced CT, intraoperative ultrasound is accurate in its diagnosis of quality and localization of liver neoplasms. Thus intraoperative ultrasound, a minimally invasive concept, enhances the security of surgery and the degree of thoroughness for patients with liver tumors.

**Key Words:** Intraoperative ultrasound; Liver neoplasms; Minimally invasive procedure

Song X, Liu LX, Jiang HC. Intraoperative ultrasound: a minimally invasive application in liver neoplasm surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2549-2552

## 摘要

**目的:** 探讨术中超声在肝脏肿瘤手术中的作用.

**方法:** 对78例肝脏肿瘤患者行术中超声扫描, 与术前超声和CT/增强CT进行对比分析.

**结果:** 本组肝脏恶性肿瘤共65例, 术前超声和术前CT/增强CT分别有10例和6例不符合, 而术中超声全部诊断准确. 术中超声对于肝血管瘤的诊断准确率(92.31%)也要高于术前超声(69.23%)和CT/增强CT(76.92%). 术中超声对直径 $\leq 1$  cm的小肿瘤检出率达90.48%, 明显优于术前超声(59.52%)和CT/增强CT(69.05%)( $P < 0.05$ ). 术中超声对直径 $> 1$  cm者检出率为100%. 术中超声总体病灶检出率为96.36%, 也明显优于术前超声(74.55%)( $P < 0.05$ ). 对22例患者改变了原定的手术方案. 所有切除病灶均由术中超声预先确定切除线和切除径路, 使切缘无癌细胞残留.

**结论:** 与术前超声和CT/增强CT相比, 术中超

## ■背景资料

近年来, 肝脏肿瘤的发病率有增高趋势, 随着影像学技术的发展, 肝脏肿瘤的早期诊断率有一定的提高, 但体外超声和CT有自身的局限性, 影响了对肿瘤的定性和定位诊断. 随着微创观念的提出、微创理论的完善和微创技术的发展, 术中超声的应用越来越广泛.



## ■创新盘点

术中超声是在传统术前超声诊断和手术探查的基础上,将超声与手术有机地结合在一起的技术。通过对微创观念的思考,本文对在肝脏肿瘤手术中使用术中超声的情况进行分析,总结出,术中超声是微创观念在肝脏肿瘤治疗中的具体应用。

声对肝脏肿瘤定性定位诊断准确,提高了手术的安全性和彻底性,是微创观念在肝脏肿瘤手术中的体现。

**关键词:** 术中超声; 肝脏肿瘤; 微创观念

宋宣, 刘连新, 姜洪池. 术中超声——微创观念在肝脏肿瘤手术中的应用. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2549-2552

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2549.asp>

## 0 引言

微创化是外科医生的不懈追求,在临床实践过程中,无论做何种手术、无论外科发展到何时、无论是外科哪个领域,都要始终贯彻微创观念和使用微创操作技术,即所谓的“3W原则”<sup>[1]</sup>。关于肝脏肿瘤治疗的微创化问题,若只把血管介入、局部注射、射频、冷冻、电化学疗法、近距离放射等非手术治疗方法视为微创是有些局限的,实际上一切有利于将创伤控制在最小程度,以降低创伤对全身影响的措施都是外科微创化的一部分<sup>[2]</sup>。

术中超声是微创观念在肝脏肿瘤治疗中的具体应用。无论是在原发性肝癌、转移性肝癌还是在肝良性肿瘤中,术中超声都被看作是最精确的辅助检查手段,他不仅可以发现术前影像学未能发现的病灶,还可以准确地描述肿瘤的范围以及肿瘤与肝内重要血管的关系,以使肝切除能够更安全和顺利地进行<sup>[3]</sup>。本文将对作者在2003-2006年施行的78例肝脏肿瘤手术中使用术中超声情况进行总结报告。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-2006年作者在78例肝脏肿瘤手术中使用术中超声进行辅助诊断的患者。年龄33-78(平均55.6)岁,男62例,女16例,均为第1次肝脏手术,术后病理诊断,其中肝细胞型癌52例,胆管细胞型癌5例,转移性肝癌8例,肝血管瘤13例。

**1.2 方法** 术前行肝脏CT、三期增强CT和超声检查,做定位和定性诊断,详细记录所发现病灶的数目、大小以及病灶与肝脏主要血管和胆管间的关系,术前怀疑恶性者需判断有无远处转移,常规术前准备。在术中行常规探查和游离肝周各韧带之后,进行术中超声检查。应用日本生产的Aloka-4000型超声扫描仪,探头型号8731,频率为7.5 MHz,扫描可以由超声科医生操作,也可以由有超声检查经验的外科医生进行操作。

表1 肝脏肿瘤影像学检查诊断准确率

病理诊断	n	符合准确率 n(%)		
		术前 超声	术前CT/ 增强CT	术中 超声
肝细胞型癌	52	46(88.46)	49(94.23)	52(100.00)
胆管细胞型癌	5	4(80.00)	4(80.00)	5(100.00)
转移性肝癌	8	5(62.50)	6(75.00)	8(100.00)
肝血管瘤	13	9(69.23)	10(76.92)	12(92.31)
合计	78	64(82.05)	69(88.46)	77(98.72)

按顺序、全方位地进行扫描,从第一肝门开始,沿门静脉主干及左、右两支扫描,然后从第二肝门开始扫描左、中、右三支肝静脉及其属支至末梢,在判断肿瘤有无血管浸润时,探头要垂直于肿瘤与血管的接触面,再从左向右逐段逐叶做不同断面的扫描。扫描时要注意记录病灶的位置、数目以及大小;病灶与肝脏主要血管和胆管间的关系,血管内是否有癌栓,以判断手术切除的可能性同时确定切除线;重点扫描术前超声和CT已经发现病灶的部位,还要注意术前超声容易漏诊的位置,如肝第Ⅶ段接近膈顶处。

**统计学处理** 对病灶数目检出情况进行配对资料的 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 判定差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 影像学检查定性诊断准确率** 本组78例均有术后病理诊断,以此为标准,计算影像学检查定性诊断准确率。本组肝脏恶性肿瘤共65例,术前超声诊断准确率为84.62%,有10例不符合,其中7例原发性肝癌误诊为肝血管瘤,3例转移性肝癌误诊为原发性肝癌,术前CT诊断准确率为90.77%,有6例不符合,其中4例原发性肝癌误诊为肝血管瘤,2例转移性肝癌误诊为原发性肝癌,而术中超声全部诊断准确。在肝血管瘤的病例中,术前超声和CT分别有4例和3例误诊为原发性肝癌,术中超声有1例误诊为原发性肝癌,诊断准确率要高于术前超声和CT(表1)。

**2.2 肝脏恶性肿瘤影像学检查病灶检出结果** 本组65例肝脏恶性肿瘤中,经病理证实,共有病灶110个,术中超声对发现肝深部小肿瘤要明显优于术前超声和CT。对直径 $\leq 1$  cm的小肿瘤检出率达90.48%,与术前超声和术前CT/增强CT的检出率相比均有显著差异( $P<0.05$ ),对直径 $>1$  cm者检出率为100%。总体检出率为96.36%,与术前超声进行配对资料的 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ (表2)。



2.3 手术情况 本组病例中, 有14例术前超声定性诊断错误, 另有8例于术中超声探及术前未发现的病灶和门静脉癌栓, 此22例及时改变了原定的手术方案, 13例改行根治性切除手术, 5例因小癌灶多而改行姑息性切除术, 另4例行血管瘤切除术。所有切除病灶均由术中超声预先确定切除线和切除径路, 使切缘无癌细胞残留。必要时可以在切除肿瘤过程中再次行超声扫描以确认肿瘤和主要血管的毗邻关系, 直至肿瘤完整切除。

### 3 讨论

随着影像学技术的快速发展, 肝癌的早期诊断率有所提高<sup>[4-5]</sup>, 但体外超声为获取较大的声波从而可以穿透腹腔内的脏器, 而只能选择频率较低的探头, 同时又受到体表组织如皮肤和皮下脂肪、肠气、肺气和肋骨的影响<sup>[6]</sup>, 都使图像的分辨率和质量大为降低, 精确性差<sup>[7]</sup>, 尤其在肝脏肿瘤合并有肝硬化时, 肿瘤与肝硬化结节不易区分, 使正确诊断的难度进一步加大, 故经腹壁超声检查受到了一定的限制<sup>[8-9]</sup>。CT检查虽然可以部分克服经腹壁超声的缺点, 但是对小的病灶定性诊断也非常困难。手术中将超声探头直接置于肝脏表面进行扫描, 没有周围脏器干扰, 比术前超声、CT的敏感性要高, 对于病变的定性诊断有一定的优越性, 全肝扫描无盲区和死角, 对于病变的定位诊断的优越性更大, 而且术中超声具有频率高、体积小、无辐射、适合手持、易于操作、重复性好、经济便宜等特点, 克服了体外超声检查的种种缺点。

肝癌的根治性切除是治疗肝癌, 延长患者寿命的有效方法<sup>[10-11]</sup>。到目前为止, 手术切除的彻底性是何种介入疗法都无法比拟的, 他能将肿瘤完整切除, 从而极大程度上预防了肿瘤的局部复发。肝癌根治性切除强调的是彻底切除肿瘤病灶, 不能有肿瘤病灶残留。但是卫星病灶和门静脉癌栓在术前超声和CT中不易发现, 因为位置较深, 术中探查时也不易触及, 容易遗漏。术中超声的使用可以发现术前影像学检查遗漏的病灶, 尤其是微小病灶<sup>[12]</sup>, 明显地减少了肝内转移病灶、卫星病灶和门静脉癌栓的残留, 从而降低了复发的可能, 提高了治愈的机会。本组数据显示, 术中超声对直径 $\leq 1$  cm的小肿瘤检出率达90.48%, 而术前超声检出率只有59.52%, 术前CT/增强CT检出率也只有69.05%。术前超声对较大肿瘤的漏检主要是因为肿瘤的位置靠后

表 2 恶性肿瘤影像学检查病灶检出结果

病灶直径(cm)	n	检出率 n(%)		
		术前超声	术前CT/增强CT	术中超声
$\leq 1$	42	25(59.52) <sup>a</sup>	29(69.05) <sup>a</sup>	38(90.48)
1-5	47	38(80.85)	46(97.87)	47(100.00)
>5	21	19(90.48)	21(100.00)	21(100.00)
合计	110	82(74.55) <sup>a</sup>	96(87.27)	106(96.36)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 术中超声。

靠上, 受到肋骨的影响较大, 同时肝脏硬化结节多。病灶确定以后, 能否切除和切除是否顺利的关键在于明确肿瘤的进展程度和血管浸润情况, 准确定位病灶与周围主要血管和胆管的毗邻关系, 这将为术者决定手术方式、明确切除范围、确定切除线和切除径路提供重要依据<sup>[13-14]</sup>。术中超声能够明确病灶边缘与病灶周围血管和胆管的距离, 因而在术中可以从容妥善地处理病灶周围的各种管道, 使肿瘤的切除率得以明显提高。本组病例经由术中超声扫描确定病灶周围管道走行后, 除部分病例行姑息性切除外, 其余病灶全部顺利切除。

在我国, 绝大多数肝癌患者并存有严重肝硬化<sup>[15]</sup>, 手术中既要彻底切除肿瘤又要最大限度地保留非瘤肝组织, 以维持术后肝脏功能, 因此, 对于一些小的肝癌病灶可以采用非规则性局部切除来替代规则性肝段和肝叶的切除, 以避免切除大量无瘤肝组织, 但是在切除过程中要避免损伤肝静脉和主要胆管, 以保证术后存留肝组织的静脉回流和胆汁流出, 术中超声又起到了至关重要的作用。外科微创化的内容非常广泛, 绝不是几种治疗方法所能涵盖的, 术中超声在传统术前检查方法和手术的基础上, 将超声与手术很好地结合在一起, 使术式更加合理, 术程更加顺利, 根治更加彻底, 恢复更加快速, 是微创观念在肝脏肿瘤治疗中的良好体现。

### 4 参考文献

- 姜洪池, 陆朝阳. 关于微创手术入路与整体损伤比的思考. 中国实用外科杂志 2005; 25: 323-325
- 姜洪池. 微创化——外科学发展的不懈追求. 中国实用外科杂志 2004; 24: 472-474
- Shukla PJ, Pandey D, Rao PP, Shrikhande SV, Thakur MH, Arya S, Ramani S, Mehta S, Mohandas KM. Impact of intra-operative ultrasonography in liver surgery. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 62-65
- Hamer OW, Schlottmann K, Sirlin CB, Feuerbach S. Technology insight: advances in liver imaging. *Nat*

### ■应用要点

术中超声可以精确的对肝脏内病灶进行定性和定位诊断, 他不仅可以发现术前影像学未能发现的病灶, 还可以准确地描述肿瘤的范围以及肿瘤与肝内重要血管的关系, 以使肝切除能够更安全和顺利地

### ■同行评价

本文将外科微创技术结合术中超声进行了肝脏肿瘤手术,研究的内容具有较高的科学性,研究思路新颖,论据充分、结果可信,具有较高的应用价值和临床意义。

- 5 Ren FY, Piao XX, Jin AL. Efficacy of ultrasonography and alpha-fetoprotein on early detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4656-4659
- 6 Lin LW, Ye Z, Xue ES, Gao SD, He YM. Intraoperative ultrasonography in hepatobiliary surgery. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 425-428
- 7 Nishiura T, Watanabe H, Ito M, Matsuoka Y, Yano K, Daikoku M, Yatsuhashi H, Dohmen K, Ishibashi H. Ultrasound evaluation of the fibrosis stage in chronic liver disease by the simultaneous use of low and high frequency probes. *Br J Radiol* 2005; 78: 189-197
- 8 郑荣琴, 黄冬梅, 张波, 苏中振, 工藤正俊, 川崎俊彦. 超声、CT及MRI诊断肝硬化的比较. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 993-996
- 9 Zheng RQ, Zhang B, Kudo M, Sakaguchi Y. Hemodynamic and morphologic changes of peripheral hepatic vasculature in cirrhotic liver disease: a preliminary study using contrast-enhanced coded phase inversion harmonic ultrasonography. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6348-6353
- 10 Jievaltas M, Stoskuvienė L, Petrenkienė V, Barauskas G, Pundzius J. Results of treatment of primary liver cancer at Kaunas University of Medicine Hospital. *Medicina (Kaunas)* 2004; 40: 127-134
- 11 Capussotti L, Muratore A, Massucco P, Ferrero A, Polastri R, Bouzari H. Major liver resections for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: early and long-term outcomes. *Liver Transpl* 2004; 10: S64-68
- 12 Cohen MP, Machado MA, Herman P. The impact of intra operative ultrasound in metastases liver surgery. *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 206-212
- 13 Sahani DV, Kalva SP, Tanabe KK, Hayat SM, O'Neill MJ, Halpern EF, Saini S, Mueller PR. Intraoperative US in patients undergoing surgery for liver neoplasms: comparison with MR imaging. *Radiology* 2004; 232: 810-814
- 14 Agrawal N, Fowler AL, Thomas MG. The routine use of intra-operative ultrasound in patients with colorectal cancer improves the detection of hepatic metastases. *Colorectal Dis* 2006; 8: 192-194
- 15 Zhang MG, Huang XJ, Zhu Q, Geng J, Zhang AJ. Relationship between CT grouping and complications of liver cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 219-223

编辑 何燕 电编 张敏

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

### • 消息 •

## 2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation

10 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007

15-18 October 2007

Kobe

apdw@convention.co.jp

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology

11-12 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

15th United European Gastroenterology Week, UEGW

27-31 October 2007

Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting

12-17 October 2007

Pennsylvania Convention Center

Philadelphia, PA

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases

2-6 November 2007

Boston - MA

www.aasld.org

# 肝病患者血清血管紧张素转化酶活性变化的临床意义

张剑平, 魏红山, 孙继云, 肖凡, 张毅, 徐道振, 成军

张剑平, 魏红山, 孙继云, 肖凡, 徐道振, 成军, 北京地坛医院  
传染病研究所 北京市 100011

张毅, 北京中医药大学基础医学院 北京市 100029

通讯作者: 张剑平, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13

号, 北京地坛医院传染病研究所. zhjp2358@126.com

电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64281540

收稿日期: 2007-03-30 修回日期: 2007-08-03

## Clinical significance of serum angiotensin-converting enzyme changes in patients with liver disease

Jian-Ping Zhang, Hong-Shan Wei, Ji-Yun Sun,  
Fan Xiao, Yi Zhang, Dao-Zhen Xu, Jun Cheng

Jian-Ping Zhang, Hong-Shan Wei, Ji-Yun Sun, Fan  
Xiao, Dao-Zhen Xu, Jun Cheng, Institute of Infectious  
Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Yi Zhang, Basic Medicine College, Beijing University of  
Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Correspondence to: Jian-Ping Zhang, Institute of Infec-  
tious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, An-  
wai Street, Beijing 100011, China. zhjp2358@126.com

Received: 2007-03-30 Revised: 2007-08-03

## Abstract

**AIM:** To discuss the clinical significance of changes in angiotensin-converting enzyme (ACE) in different sub-types of hepatitis B and in healthy controls.

**METHODS:** A Hitachi 7180 fully automatic biochemical analyzer was used to detect ACE activity and to measure prothrombin activity (PTA) in samples from the two groups.

**RESULTS:** Serum ACE activity among the different clinical sub-types of hepatitis B was as follows: control group ( $24.71 \pm 9.43 \mu\text{mol/L}$ ); obstruct jaundice ( $28.75 \pm 13.04 \mu\text{mol/L}$ ); liver cirrhosis combined with liver cancer after hepatitis B ( $43.81 \pm 15.01 \mu\text{mol/L}$ ); acute hepatitis B ( $46.97 \pm 17.40 \mu\text{mol/L}$ ); chronic hepatitis B ( $53.01 \pm 16.38 \mu\text{mol/L}$ ); liver cirrhosis after hepatitis B ( $72.29 \pm 20.26 \mu\text{mol/L}$ ); and chronic severe hepatitis B ( $74.12 \pm 21.04 \mu\text{mol/L}$ ). Serum ACE activity in patients with liver cirrhosis after hepatitis B was significantly higher than that in those with

liver cirrhosis combined with liver cancer. Serum ACE activity in patients with liver disease was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). When PTA of chronic hepatitis B was  $> 80\%$ , the activity of ACE was  $44.01 \pm 11.27 \mu\text{mol/L}$ ; when it was  $< 40\%$ , it was  $72.62 \pm 12.31 \mu\text{mol/L}$ ; and when it was  $40\%-80\%$ , it was  $57.65 \pm 13.22 \mu\text{mol/L}$ . The differences between each group were significant ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Serum activity of ACE in clinical sub-types of hepatitis B had clinical significance for assessing the degree of liver cell injury and for identifying liver cellularity and ecto-liver diseases.

**Key Words:** Angiotensin-converting enzyme; Type B viral hepatitis; Prothrombin activity

Zhang JP, Wei HS, Sun JY, Xiao F, Zhang Y, Xu DZ, Cheng J. Clinical significance of serum angiotensin-converting enzyme changes in patients with liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2553-2556

## 摘要

**目的:** 探讨病毒性乙型肝炎不同临床分型中血清血管紧张素转化酶(ACE)的变化及临床价值。

**方法:** 采用速率法, 利用日立7180全自动生化分析仪对各组样本进行血管紧张素转化酶(ACE)活性和凝血酶原活动度(PTA)的测定。

**结果:** 病毒性乙型肝炎不同临床分型血清中ACE活性变化的顺序由低到高为: 正常对照组( $24.71 \pm 9.43 \mu\text{mol/L}$ ), 梗阻性黄疸( $28.75 \pm 13.04 \mu\text{mol/L}$ )乙肝后肝硬化合并肝癌( $43.81 \pm 15.01 \mu\text{mol/L}$ ), 急性病毒性乙型肝炎( $46.97 \pm 17.40 \mu\text{mol/L}$ ), 慢性病毒性乙型肝炎( $53.01 \pm 16.38 \mu\text{mol/L}$ ), 乙肝后肝硬化( $72.29 \pm 20.26 \mu\text{mol/L}$ ), 慢性重型病毒性乙型肝炎( $74.12 \pm 21.04 \mu\text{mol/L}$ )。乙肝后肝硬化患者血清ACE活性显著高于肝硬化合并肝癌的患者, 各组肝病患者血清ACE活性都明显高于正常对照组( $P < 0.01$ )。慢性乙型肝炎患者凝血酶原活动度

## ■背景资料

研究表明肝脏也存在局部RAAS, Ang II是RAS中的主要活性物质。在肝纤维化的形成和肝硬化发生、发展过程中Ang II发挥着多种病理生理作用。ACE是Ang I形成Ang II过程中重要的限速酶, 在血管生理调节过程中起着非常重要的作用。为了探讨病毒性乙型肝炎不同临床分型中血清ACE的变化及临床价值, 本文观察了病毒性乙型肝炎后肝硬化、肝硬化合并肝癌等患者血清中ACE活性。

## ■相关报道

有学者认为：(1)ACE的主要代谢场所是肝脏，当肝脏因各种原因功能低下时对ACE的清除减少。(2)慢性肝病时出现的蜘蛛痣、脾肿大均是血管内皮细胞增生所致，增生的血管内皮细胞释放更多的ACE到血循环中。也有人认为肝脏有灭活ACE的功能。另外，肝硬化门脉高压形成后，肺内分流增加，出现低氧血症，从而刺激ACE释放。

(PTA)在高于80%，40%-80%之间，低于40%时，ACE活性分别为 $44.01 \pm 11.27 \mu\text{mol/L}$ ， $57.65 \pm 13.22 \mu\text{mol/L}$ ， $72.62 \pm 12.31 \mu\text{mol/L}$ 。各组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。

**结论：**检测病毒性乙型肝炎不同临床分型中血清ACE的活性变化，对于判断肝细胞损伤程度及鉴别肝细胞性与肝外病变有一定的临床意义。

**关键词：**血管紧张素转化酶；病毒性乙型肝炎；凝血酶原活动度

张剑平，魏红山，孙继云，肖凡，张毅，徐道振，成军。肝病患者血清血管紧张素转化酶活性变化的临床意义。世界华人消化杂志 2007;15(23):2553-2556

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2553.asp>

## 0 引言

人类对肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的研究已有近百年的历史，血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)在RAAS和心血管系统中的重要作用已被大量研究所证实。ACE是血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I)形成血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)过程中重要的限速酶，他能将Ang I 转化成Ang II，还可灭活舒血管物质缓激肽，因而在血管生理调节过程中具有重要意义。近年来研究表明肝脏也存在局部RAAS<sup>[1-3]</sup>，Ang II是肾素——血管紧张素系统(reninangiotensinsystem, RAS)的主要活性物质，在肝纤维化的形成和肝硬化发生、发展过程中发挥多种病理生理作用<sup>[4-5]</sup>。本研究旨在通过对部分肝病患者及健康献血者的血清中ACE活性的检测，探讨病毒性乙型肝炎不同临床分型中血清ACE的变化及临床价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2004年在我院住院的237例病毒性乙型肝炎患者，男190例，女47例，年龄15-76(平均 $44.75 \pm 14.89$ )岁。其中，急性病毒性乙型肝炎41例，慢性病毒性乙型肝炎53例，慢性重型病毒性乙型肝炎56例，乙肝后肝硬化合并肝癌42例，乙肝后肝硬化45例，237例患者均为HBsAg阳性，均符合2003年全国第十三届病毒性肝炎、肝病学术会议修订的病毒性乙型肝炎的诊断标准。正常对照组59例，男29例，女30例，来自健康献血员，平均年龄为 $23.75 \pm 3.0$ 岁。试剂购自英国朗道公司，仪器：HITACHI 7180全自动生化分析仪。

表 1 不同肝病临床分型血清ACE活性比较(mean  $\pm$  SD)

分组	n	ACE ( $\mu\text{mol/L}$ )
正常对照组	59	$24.71 \pm 9.43$
急性病毒性乙型肝炎	41	$46.97 \pm 17.40$
慢性病毒性乙型肝炎	53	$53.01 \pm 16.38$
慢性重型病毒性乙型肝炎	56	$74.12 \pm 21.04$
肝硬化合并肝癌	42	$43.81 \pm 15.01$
乙肝后肝硬化	45	$72.29 \pm 20.26$
梗阻性黄疸	18	$28.75 \pm 13.04$

**1.2 方法** 血清中的ACE作用于FAPGG，FAPGG被水解成苯丙氨酸基(FAP)和双甘氨酸(GG)，在波长340 nm下，吸光度呈下降反应均在一定范围内，吸光度下降的速率与标本中ACE酶活性成正比。速率法严格按试剂盒说明操作。单位定义：血清与底物在37℃条件下每升血清每分钟释放双甘氨酸所需要的酶量为一个ACE单位。

**统计学处理** 计量资料以mean  $\pm$  SD表示，多组间差异采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性，计量数据统计分析均采用SPSS10.00软件。

## 2 结果

**2.1 健康人与病毒性乙型肝炎不同临床分型血清中ACE活性的改变** 病毒性乙型肝炎不同临床分型血清中ACE活性变化的顺序为：正常对照组 < 梗阻性黄疸 < 乙肝后肝硬化合并肝癌 < 急性病毒性乙型肝炎 < 慢性病毒性乙型肝炎 < 乙肝后肝硬化 < 慢性重型病毒性乙型肝炎( $24.71 \pm 9.43 < 28.75 \pm 13.04 < 43.81 \pm 15.01 < 46.97 \pm 17.40 < 53.01 \pm 16.38 < 72.29 \pm 20.26 < 74.12 \pm 21.04 \mu\text{mol/L}$ )。正常对照组与各个实验组比较， $P < 0.01$ ，均有高度显著性差异。急性病毒性乙型肝炎组与慢性病毒性乙型肝炎组和乙肝后肝硬化合并肝癌组比较， $P > 0.05$ ；慢性病毒性乙型肝炎组与乙肝后肝硬化合并肝癌组比较， $P > 0.05$ ；慢性重型病毒性乙型肝炎组与乙肝后肝硬化组比较， $P > 0.05$ 。其余各组比较， $P < 0.01$ ，有高度显著性差异(表1)。

**2.2 慢性乙型肝炎患者凝血酶原活动度(PTA)与ACE活性改变的关系** 慢性乙型肝炎患者凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)高于80%(C组)时，ACE活性为 $44.01 \pm 11.27 \mu\text{mol/L}$ ，而PTA低于40%(A组)时，ACE活性则为 $72.62 \pm 12.31 \mu\text{mol/L}$ ，PTA在40%-80%(B组)之间时慢性乙型肝炎患者血清ACE活性为 $57.65 \pm 13.22 \mu\text{mol/L}$ 。

## ■应用要点

本文发现肝脏局部RAS激活可能与病毒性肝炎的病理发展过程有关，对于判断肝细胞损伤程度及鉴别肝细胞性与肝外病变有一定的临床意义。



其中: A组与B组和C组比较,  $P < 0.01$ , 有高度显著性差异; B组与C组比较,  $P < 0.05$ , 有显著性差异(表2)。

### 3 讨论

ACE又名激肽酶 II, 广泛分布于全身各组织的血管内皮或上皮细胞。ACE作用于Ang I (十肽)的c-末端, 脱去组氨酰亮氨酸, 形成Ang II (八肽), 是调节RAAS、缓激肽系统的重要酶, 故与机体的血液、水电解质生理调节密切相关。ACE作为呼吸、心血管、内分泌、泌尿及消化等系统疾病的诊断和治疗指标越来越受重视。

Zhang *et al*<sup>[6]</sup>和Schwiesf-urth *et al*<sup>[7]</sup>先后报道了病毒性肝炎、肝硬化患者血清中的ACE活性明显高于健康对照组。Olivero *et al*<sup>[8]</sup>将92例急性黄疸患者与病毒性肝炎患者的血清中ACE活性进行比较, 发现病毒性肝炎患者血清中ACE活性较急性黄疸患者明显升高。本实验结果, 各肝病组患者血清中ACE活性与健康对照组相比, 明显升高。按血清中ACE活性由低到高依次为: 正常对照组, 乙肝后肝硬化合并肝癌, 急性病毒性乙型肝炎, 慢性病毒性乙型肝炎, 乙肝后肝硬化, 慢性重型病毒性乙型肝炎。之前的研究也发现无论体内HBV的HBsAg是否阳性, 肝功正常的病毒性肝炎患者血清中ACE活性无明显变化, 但无论体内HBV的HBsAg是否阳性, 肝功异常的病毒性肝炎患者血清中ACE活性明显高于肝功正常者<sup>[9]</sup>。提示患者血清中ACE的活性与其功能的改变及肝细胞的损伤有直接的关系, 并且随着肝脏损伤的加重, 患者血清中ACE逐渐增加。

本研究结果显示随着患者凝血酶原活动度的减少, 患者血清中ACE的活性逐渐升高, 这进一步说明血清中ACE活性的升高与其肝脏损伤的程度密切相关。慢性肝病时ACE升高机制尚不是十分清楚, 日本学者富川正人认为: (1)ACE的主要代谢场所是肝脏, 当肝脏因各种原因功能低下时对ACE的清除减少; (2)慢性肝病时出现的蜘蛛痣、脾肿大均是血管内皮细胞增生所致, 增生的血管内皮细胞释放更多的ACE到血液循环中。也有人认为肝脏有灭活ACE的功能。另外, 肝硬化门脉高压形成后, 肺内分流增加, 出现低氧血症, 从而刺激ACE释放<sup>[10]</sup>。肝癌为我国常见恶性肿瘤, 多见于慢性肝炎后肝硬化患者, RAS与胚胎发育、器官形成、血压调节及内环境稳态调控有密切关系。有研究显示, 恶性肿瘤细胞可表达肾素、血管紧张素原或ANG II受

表 2 凝血酶原活动度与血管紧张素转化酶活性变化的关系(mean  $\pm$  SD)

PTA(%)	组	n	ACE ( $\mu$ mol/L)
<40	A	34	72.62 $\pm$ 12.31
40-80	B	55	57.65 $\pm$ 13.22
>80	C	20	44.01 $\pm$ 11.27

体, 因此多种恶性肿瘤患者血清ACE活性均有不同程度的降低<sup>[11-12]</sup>。肝癌患者血清中ACE活性与血清中甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的水平无差异<sup>[13]</sup>。

以上实验结果表明病毒性乙型肝炎患者血清血管紧张素转化酶活性的改变与其肝脏细胞的损伤程度密切相关。提示检测病毒性乙型肝炎不同临床分型中血清ACE的活性变化, 对于判断肝细胞损伤程度及鉴别肝细胞性与肝外病变有一定的临床意义。

### 4 参考文献

- 张晶, 宗春华, 李定国, 周仁建, 杜学亮, 周馨, 徐芹芳, 陆汉明. 肝内肾素-血管紧张素-醛固酮系统与大鼠肝纤维化的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 397-400
- Matsuki K, Sakata T. Angiotensin-converting enzyme in diseases of the liver. *Am J Med* 1982; 73: 549-551
- Johnson DA, Diehl AM, Sjogren MH, Lazar J, Cattau EL Jr, Smallridge RC. Serum angiotensin converting enzyme activity in evaluation of patients with liver disease. *Am J Med* 1987; 83: 256-260
- 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 陈颖伟. 肾素-血管紧张素系统与肝纤维化发生. 中华消化杂志 2001; 21: 145-147
- Letizia C, D'Ambrosio C, De Francesco V, De Ciocchis A, Cerci S, Scavo D. Serum angiotensin-converting enzyme in patients with hepatic cirrhosis and ascites in the recumbent and orthostatic positions. *J Clin Gastroenterol* 1993; 16: 267-269
- Zhang Z, Feng H, Leng X, Ma F, Wang B, Du R. The levels of renin activity, angiotensin converting enzyme and angiotensin II in cirrhotic patients with ascites undergoing portacaval shunt. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1999; 37: 366-368
- Schweisfurth H, Wernze H. Changes of serum angiotensin I converting enzyme in patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1979; 26: 207-210
- Olivero S, Sciascia C, Mao P, Arione R, Enrichens F, Alberghina A, Festa T, Pessione E, Sanfelici G. Variations in serum kininase II activity in acute jaundice. *Minerva Med* 1986; 77: 793-798
- Wen J, Ma WC, Hsieh CC, Lau YT. Serum activity of angiotensin converting enzyme (ACE) is not affected by hepatitis B viral infection. *Chin J Physiol* 1995; 38: 19-22
- Wolfe JD, Tashkin DP, Holly FE, Brachman MB, Genovesi MG. Hypoxemia of cirrhosis: detection of abnormal small pulmonary vascular channels by a

### ■名词解释

血管紧张素转化酶: 是一种膜固定的金属蛋白酶, 他能催化水解血管紧张素 I 和血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)。在血管紧张素转化酶的作用下, 能将肾素(血管紧张素原酶)刺激血管紧张素原释放的 1 种非活性 10 肽脱去 C 端 His-Leu 二肽, 由血管紧张素 I 转化成为有生物活性的血管紧张素 III。



## ■同行评价

本文通过部分病例及健康者血清ACE活性的检测,发现肝脏局部RAS激活可能与病毒性肝炎的病理发展过程有关,选题具有一定创新性,方法得当,统计学处理正确,结果可信,有一定的临床意义。

- quantitative radionuclide method. *Am J Med* 1977; 63: 746-754
- 11 Kucerova D, Zelezna B, Sloncova E, Sovova V V. Angiotensin II receptors on colorectal carcinoma cells. *Int J Mol Med* 1998; 2: 593-595
- 12 Laflamme L, Brechler V, Reudelhuber TL, Gallo-Payet N, Deschepper CF. The renin-angiotensin

system in hybrid NG108-15 cells. Renin gene is from mouse neuroblastoma, angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genes are of rat glioma origin. *Regul Pept* 1998; 77: 9-15

- 13 周爱国, 黄玉波, 王开贺, 徐本峰, 宋思琴, 魏红山. 检测血管紧张素转化酶在AFP阴性肝癌诊断中的价值. 潍坊医学院学报 2001; 23: 21-22

编辑 王晓瑜 电编 张敏

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

## • 消息 •

## 中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

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.

# 胰岛素瘤的术前及术中超声定位

刘雪梅, 曹立赢, 刘泗清, 汪石盘

刘雪梅, 曹立赢, 华北煤炭医学院附属开滦医院超声科 河北省唐山市 063000

刘泗清, 汪石盘, 华北煤炭医学院附属开滦医院肝胆外科 河北省唐山市 063000

通讯作者: 刘雪梅, 063000, 河北省唐山市新华东道57号, 华北煤炭医学院附属开滦医院超声科. gbx791020@126.com

电话: 0315-3025758

收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-08-12

## Contribution of preoperative and intraoperative ultrasonographic localization of insulinomas

Xue-Mei Liu, Li-Ying Cao, Si-Qing Liu, Shi-Pan Wang

Xue-Mei Liu, Li-Ying Cao, Department of Ultrasound, the Affiliated Kailuan Hospital of North Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Si-Qing Liu, Shi-Pan Wang, Department Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Kailuan Hospital of North Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Liu, Department of Ultrasound, the Affiliated Kailuan Hospital of North Coal Medical College, 57 Xinhua East Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. gbx791020@126.com

Received: 2007-07-12 Revised: 2007-08-12

## Abstract

**AIM:** To evaluate the contribution of preoperative and intraoperative ultrasonographic localization of insulinomas.

**METHODS:** Preoperative data from four cases of insulinoma were analyzed using B ultrasonography, computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and digital subtraction angiography (DSA).

**RESULTS:** The rates for accurately localizing insulinoma preoperatively by B ultrasonography, CT, MRI, and DSA were 40%, 100%, 40%, 20%, and 60%, respectively, and intraoperatively ultrasonography was 100%.

**CONCLUSION:** Intraoperative ultrasound not only accurately shows the location of insulinoma, but also the spatial relationship between insulinomas, thereby helping surgeons choose appropriate surgical procedures.

**Key Words:** Preoperative ultrasonography; Intraoperative ultrasonography; Insulinoma

Liu XM, Cao LY, Liu SQ, Wang SP. Contribution of preoperative and intraoperative ultrasonographic localization of insulinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2557-2559

## 摘要

**目的:** 探讨术前及术中超声在胰岛素瘤定位诊断中的价值。

**方法:** 对4例胰岛素瘤患者的术前B型超声检查B超及术中B超、计算机断层摄影(CT)、核磁共振成像术(MRI)和数字减影血管造影(DSA)定位治疗进行分析。

**结果:** 术前B超, CT, MRI和DSA对胰岛素瘤的定位诊断准确率分别为40%, 100%, 40%, 20%和60%, 术中超声(IOUS)定位诊断准确率为100%。

**结论:** 术中超声对胰岛素瘤的定位诊断率高, 并可显示肿瘤的毗邻关系, 有助于术中选择合适的术式。

**关键词:** 术前超声; 术中超声; 胰岛素瘤

刘雪梅, 曹立赢, 刘泗清, 汪石盘. 胰岛素瘤的术前及术中超声定位. *世界华人消化杂志* 2007;15(23):2557-2559

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2557.asp>

## 0 引言

胰岛素瘤是胰岛的β细胞瘤, 占胰岛细胞肿瘤的70%-75%, 导致胰岛素分泌过多, 引起低血糖症。因瘤体直径<2.0 cm, 定位诊断较困难。但术中超声(intraoperative ultrasound, IOUS)定位对胰岛素瘤的定位诊断准确率显著提高, 并可显示肿瘤的毗邻关系, 有助于术中选择合适的术式。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究共收集1998-01/2006-12在唐山市开滦医院就诊的4例胰岛素瘤患者, 全部经

## ■背景资料

胰岛素瘤传统影像学定位诊断有很多种, 主要包括超声、CT、MRI、DSA等, 其诊断符合率各异。术中超声检查所用设备简单, 可操作性强, 诊断符合率高。近年来, 利用内镜超声(EUS)这一内镜领域的新技术, 评价其对胰岛素瘤的术前定位诊断的价值, 认为其敏感性显著优于传统的影像方法, 为胰岛素瘤的外科手术提供了很有价值的术前资料; 同时, EUS操作难度不太大, 安全性较高, 患者耐受性相对较好, 有推广应用前途。

### ■应用要点

本文分析了术中超声对胰岛素的定位诊断率高,并可显示肿瘤的毗邻关系,有助于选对合适的手术方式。

IOUS定位. 其中男3例,女1例,年龄30-58(平均45.3)岁,均伴有典型的whipple三联症,病程1-8 d. 4例患者中有3例为单发,分别位于胰头、胰体、胰尾部,1例患者胰腺组织中存在2个肿瘤,分别位于胰体及胰尾部,肿瘤大小介于0.5-2.7 cm之间. 本研究均采用Aloka 900超声仪进行术中检查,所用探头频率为3.5-5.0 MHz.

1.2 方法 探头术前用40 g/L甲醛熏蒸消毒,打开腹腔后将探头置于胰腺表面,从胰头至胰尾顺次纵横多方位扫查. 术前禁食12 h,多体位检查,调整仪器设置,使图像达到最佳状态.

## 2 结果

本研究中4例患者术前均行术前B超和CT, MRI检查, 3例患者术前行DSA检查. 4例患者行肿瘤切除术后,共发现胰腺占位病灶5个,病理检查均证实为良性胰岛素瘤. 其中术前超声定位发现2个,分别位于胰头和胰体部; CT定位发现2个分别位于胰头和胰体部; MRI定位发现1个,位于胰头部; DSA定位发现3个,分别位于胰头和胰体及胰尾部; 术中扪诊定位4个,分别位于胰头部1个和胰体部2个及胰尾部1个; IOUS定位5个肿瘤被全部发现. 术前B超、CT、MRI和DSA检查其诊断准确率分别为40%, 40%, 20%, 60%; 而术中IOUS定位诊断准确率为100%.

## 3 讨论

胰岛素瘤临床以反复发作的空腹低血糖症为特征,常伴有精神神经症状而误诊,whipple三联症是定性诊断的依据: (1)空腹和运动时低血糖发作; (2)发作时血糖低于2.5 mmol/L; (3)供糖后低血糖症状迅速缓解,可以确定低血糖症. 正常人胰岛素血糖比值 $<0.3$ ,而胰岛素瘤患者常 $>0.4$ ,甚至可达1.0以上. 只要提高对本病的警惕性,增强对低血糖表现的敏感性,可以有效的减少误诊. 本文1例表现为脑功能障碍,注意力不集中,语言迟钝,步态不稳,有幻觉,行为异常,曾被误诊为癫痫.

手术摘除是治疗胰岛素瘤的唯一方法,术前术中准确定位是外科手术的关键. 肿瘤位于胰头、胰体、胰尾者各占1/3,偶有异位在胰腺周围组织或脾门处. 国内文献[1]报道超声、CT、MRI、DSA的定位敏感性分别为20%-30%, 30%-50%, 59.5%, 50%-70%, 国外分别为39.2%-61%, 33.3%-36%, 33%-45%和53%-61.65%<sup>[2-4]</sup>. 胰岛素瘤的B超表现通常是在

正常的胰腺组织中出现一弱回声,呈圆形或卵圆形,边界清楚,多有清楚、完整的包膜;瘤体较小者其周围组织分界不甚清楚. 本组4例中1例首次超声检查即发现肿瘤,另1例对照螺旋CT片反复检查于胰体部发现直径1.2 cm $\times$ 0.8 cm的肿瘤. 另有2例漏诊,其中1例胰体、胰尾各有1肿瘤均未发现,与肠气干扰,患者肥胖有关. 对可疑胰岛素瘤的患者应仔细扫查,减少漏诊.

Owens *et al*<sup>[5]</sup>认为手术探查加IOUS是定位胰岛素瘤最简单有效的方法. 传统上对胰岛素瘤的术中探查往往依赖于外科医生的临床经验,其阳性检出率波动于75%-95%<sup>[6-8]</sup>, IOUS广泛应用于临床,将阳性率提高到90%-100%<sup>[9-10]</sup>, IOUS定位诊断价值表现在可以发现触摸不到的肿瘤<sup>[11]</sup>,并可显示肿瘤与周围重要结构——主胰管、胆总管和血管的毗邻关系,有助于选择手术方式,避免主胰管和重要血管的损伤,减少手术并发症. 本组1例胰体部肿瘤切除术后测定血糖值为2.87 mmol/L,经仔细扫查于胰尾部发现1个0.8 cm $\times$ 0.6 cm低回声结节,切除后30 min,血糖升至5.7 mmol/L.

术前超声诊断符合率较低原因:胰腺位置深,肠气干扰,肥胖,肿瘤过小,仪器分辨率低,检查者经验不足. 因此,在怀疑有胰岛素瘤存在时,应反复多次检查,并仔细检查胰尾和钩突部位,减少漏诊. 而且,若患者在检查前饮水500 mL左右,可以有效提高胰腺显像质量.

近年来,随着内镜超声(endoscopic ultrasonography, EUS)在消化系疾病诊断中的临床应用,除了可借助EUS对消化道肿瘤、黏膜下病灶以及壁腔内外压迫作出准确的判断外,还能依据EUS较高的分辨率及更加接近靶组织、器官的特殊优点,对邻近脏器作更为细致、准确的观察. 利用EUS这一内镜领域的新技术,评价EUS对胰岛素瘤的临床术前定位诊断的价值,认为其敏感性显著优于传统的影像方法,为胰岛素瘤的外科手术提供了很有价值的术前资料<sup>[12]</sup>;同时, EUS操作难度不太大,安全性较高,患者耐受性相对较好,有推广应用前途.

## 4 参考文献

- 1 杨志英, 刘展, 赵平, 唐伟松, 钟守先. 1078例胰岛素瘤的定位诊断. 外科理论与实践 2001; 6: 87-90
- 2 Grant CS, van Heerden J, Charboneau JW, James EM, Reading CC. Insulinoma. The value of intraoperative ultrasonography. Arch Surg 1988; 123: 843-848
- 3 Rothmund M, Angelini L, Brunt LM, Farndon

- JR, Geelhoed G, Grama D, Herfarth C, Kaplan EL, Largiader F, Morino F. Surgery for benign insulinoma: an international review. *World J Surg* 1990; 14: 393-398; discussion 398-399
- 4 Klotter HJ, Ruckert K, Kummerle F, Rothmund M. The use of intraoperative sonography in endocrine tumors of the pancreas. *World J Surg* 1987; 11: 635-641
- 5 Owens LV, Huth JF, Cance WG. Insulinoma: pitfalls in preoperative localization. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21: 326-328
- 6 杨光唯, 陈力. 胰岛素瘤23例诊治分析. *国际外科学杂志* 2007; 34: 11-14
- 7 钟守先. 胰岛素瘤. 沈魁. 胰腺外科. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 483-499
- 8 汪建平, 王磊, 王吉甫, 詹文华. 胰岛素瘤41例的定位诊断和外科治疗分析. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 264-266
- 9 Mirallie E, Pattou F, Malvaux P, Filoche B, Godchaux JM, Maunoury V, Palazzo L, Lefebvre J, Huglo D, Paris JC, Carnaille B, Proye C. Value of endoscopic ultrasonography and somatostatin receptor scintigraphy in the preoperative localization of insulinomas and gastrinomas. Experience of 54 cases. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26: 360-366
- 10 杜焕社, 赵予坤, 张景春. 胰岛素瘤诊治10例分析. *中国误诊学杂志* 2004; 4: 1718-1719
- 11 王炳煌. 胰岛素瘤. *医师进修杂志(外科版)* 2004; 27: 5-8
- 12 诸琦, 袁耀宗, 田小年, 郁忠勤, 吴云林, 江石湖, 罗邦尧. 内镜超声在胰腺内分泌肿瘤——胰岛素瘤诊断中的价值. *中华内分泌代谢杂志* 2000; 16: 21-23

#### ■同行评价

本文探讨了术前及术中超声在胰岛素瘤定位诊断中的价值, 旨在提示临床医生术中B超定位的重要性, 减少漏诊和误诊, 有一定的临床价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏

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

## • 消息 •

### 《肿瘤冷冻治疗学》出版

由徐克成教授和牛立志博士主编的《肿瘤冷冻治疗学》近日由上海科技教育出版社出版. 全书50万字, 彩色印刷, 图文并茂.

冷冻疗法是一种既古老又现代的微创消融技术. 20世纪80年代后, 随着影像技术的进步和新的冷冻设备的诞生, 现代冷冻治疗逐步建立起来. 以氩氦冷冻技术为代表的现代冷冻疗法, 从最初应用于治疗前列腺癌, 已发展到治疗各种实质性肿瘤, 包括肝癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、妇科肿瘤和各种软组织肿瘤等. 本书系统详细介绍了冷冻治疗各种肿瘤的方法、适应证、疗效、不良反应, 对冷冻疗法的机制、冷冻与免疫及化疗的关系、冷冻治疗肿瘤的有效性和安全性等, 均作了详细阐述; 不仅综述了大量文献, 而且介绍了作者自己临床应用冷冻治疗的经验, 列举了大量典型病例. 中华医学会会长、中国工程院院士钟南山为本书作序, 评价本书“为我国第一本肿瘤冷冻治疗专著, ……反映了当代肿瘤冷冻治疗最新成果, 对临床研究和实践具有指导价值.” 国际冷冻外科学会主席Franco Lugnani博士认为本书“总结3000余例肿瘤治疗的经验, ……这些手术大多数是经皮完成, 这一点非常重要. 他们提供了充实的材料和详细的评估, ……为世界临床冷冻治疗的应用作出了杰出贡献.” 著名消化病专家、上海交通大学仁济医院终身教授萧树东对本书中与他“专业相关的内容有着浓厚的兴趣. ……冷冻不仅如同手术切除一样, 能消除肿瘤本身, 而且能发挥全身性免疫促进或免疫清除作用, 而这些是手术所不可能达到的.” 亚太消化内镜学会会长曹世植教授认为本书使他“深深体会到作为一个成功的医生, 认真的态度和高超的技艺是有效治疗的关键.” 周殿元教授、孟宪镛教授和张静仁教授也对本书作了高度评价(徐克成).

# 急诊十二指肠镜治疗急性胆源性胰腺炎94例

勾承月, 秦鸣放, 邹富胜

## ■背景资料

对于急性胆源性胰腺炎的早期治疗, 目前国内绝大多数医疗单位多主张采取非手术治疗方法。

勾承月, 秦鸣放, 邹富胜, 天津市南开医院微创外科 天津市 300122

通讯作者: 勾承月, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创外科. liza-zhang@sohu.com  
电话: 022-27022268-3487

收稿日期: 2007-04-10 修回日期: 2007-08-15

## Emergency duodenoscopy for acute biliary pancreatitis: an analysis of 94 cases

Cheng-Yue Gou, Ming-Fang Qin, Fu-Sheng Zou

Cheng-Yue Gou, Ming-Fang Qin, Fu-Sheng Zou, Minimally Invasive Surgery Center, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Cheng-Yue Gou, Minimally Invasive Surgery Center, Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. liza-zhang@sohu.com  
Received: 2007-04-10 Revised: 2007-08-15

## Abstract

**AIM:** To study the clinic outcomes of endoscopic naso-biliary drainage (ENBD) for acute biliary pancreatitis (ABP).

**METHODS:** We retrospectively analyzed 94 patients with ABP who had undergone emergency endoscopic examination and were treated with endoscopic naso-biliary drainage (ENBD) from January 2004 to December 2005. Endoscopic sphincterotomy (EST) was also carried out in some cases.

**RESULTS:** Ninety-one patients (96.81%) were successfully healed after emergency duodenoscopy. There were no severe complications or mortality. On average, abdominal pain symptoms recovered within 42.3 h and amylase level within 56 h. After being treated by ENBD for 1 week, the pancreatic edema in 49 of 61 cases was resolved; peripancreatic effusion was completely absorbed in 21 of 29 patients and was obviously decreased in the remaining 8, without clinical complications.

**CONCLUSION:** Emergency duodenoscopy is a safe and new method for treating ABP.

Key Words: Emergency duodenoscopy; Endoscopic

nasobiliary drainage; Acute biliary pancreatitis

Gou CY, Qin MF, Zou FS. Emergency duodenoscopy for acute biliary pancreatitis: an analysis of 94 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2560-2562

## 摘要

**目的:** 探讨急诊十二指肠镜行胆胰管引流治疗急性胆源性胰腺炎的价值及可行性, 扩大完善内镜在胆胰疾病中的治疗范围。

**方法:** 2004-01/2005-12急诊十二指肠镜治疗急性胆源性胰腺炎94例, 治疗方式以经内镜鼻胆管引流(ENBD)为主, 必要时行Oddi's括约肌切开(EST)。

**结果:** 94例患者中成功91例, 成功率96.81%。无发展为重症胰腺炎患者。上腹痛症状平均症状缓解时间42.3 h; 尿淀粉酶平均56 h下降到正常。内镜治疗后1 wk, 复查B超, 61例伴有胰腺水肿患者49例水肿消退, 形态恢复正常; 29例伴有胰周积液患者中21例胰周积液完全吸收, 8例积液量明显减少, 无伴随临床症状。

**结论:** 急诊十二指肠镜治疗急性胆源性胰腺炎是安全可靠的, 可以阻止胰腺向恶性转化。

**关键词:** 急诊十二指肠镜; 内镜鼻胆管引流; 急性胆源性胰腺炎

勾承月, 秦鸣放, 邹富胜. 急诊十二指肠镜治疗急性胆源性胰腺炎94例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(23): 2560-2562  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2560.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎的病因很多, 以急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)最常见。近年来对于ABP特别是有明确梗阻性黄疸或胆道感染的病例主张早期内镜下治疗<sup>[1]</sup>, 可避免严重并发症的发生及降低死亡率。Folsch *et al*<sup>[2]</sup>认为壶腹部梗阻持续时间与胆石性胰腺炎的严重程度呈正比, 24 h内几乎所有的胰腺病变都是可逆的, 24-48 h最常见的病变为出血、脂肪坏死, 超过



48 h胰腺可出现广泛的出血坏死. 因此早期(24 h内)行经十二指肠镜括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)、经内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)治疗, 对胰腺炎的恢复及预后至关重要. 现将我院急诊十二指肠镜治疗胆源性胰腺炎的经验汇报如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2005-12天津南开医院微创外科共治疗急性胆源性胰腺炎患者193例. 其中94例因急性胆管炎或影像学检查发现胆管内结石或胆总管明显扩张(直径>1.1 cm), 急诊行十二指肠镜治疗. 94例中, 男51例, 女43例. 年龄33-87(平均67.5)岁. 入院时全部患者均有不同程度的剑突下及左上腹疼痛, 7例伴有左肩背及腰部放射痛, 无寒战发热. 其中有急性胆管炎症状者25例, 均伴有黄疸; 影像学检查显示胆总管结石者69例, 均无寒战发热, 其中伴有黄疸者38例. 94例中伴有胆囊结石患者59例. B超或CT显示伴有胰腺水肿者61例, 其中胰周积液29例.

1.2 方法 经内镜逆行性胆管插管成功后, 先行诊断性逆行性胆胰管造影(encoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)以明确胆总管结石的存在及结石的位置、大小和数量, 然后根据具体情况选择治疗方式. 如果不伴有壶腹部结石嵌顿或Oddi's括约肌狭窄, 确认胰管通畅, 可单纯行ENBD治疗, 减少EST和网篮取石对胰腺的刺激. 必要时行EST或电针开窗, 打开括约肌, 务必保持胰管通畅.

## 2 结果

全部94例患者在入院24 h内行急诊十二指肠镜治疗. 94例患者中成功91例, 3例失败, 成功率96.81%. 其原因为导丝反复进入胰管, 胆管插管失败2例; 憩室内乳头, 无法完成插管1例. 此3例为胆总管结石, 无急性胆管炎患者. 2例待胆源性胰腺炎控制后行腹腔镜胆总管探查、T管引流术; 1例出现寒战、发热、黄疸加重, 急诊行腹腔镜胆总管探查、T管引流术. 3例手术患者均得到治愈, 排除观察范围.

经十二指肠镜治疗后, 全部91例无发展为重症胰腺炎患者. 上腹痛症状在成功引流后1-3 d内消失, 平均症状缓解时间42.3 h. 每日行尿淀粉酶检查, 平均56 h下降到1000 U/L以下. 内镜治疗后1 wk, 复查B超, 61例伴有胰腺水肿患者中49例水肿消退, 形态恢复正常; 29例伴有胰周积液患者中21例胰周积液完全吸收, 8例积液量

明显减少, 无临床症状伴随.

待急性胰腺炎症状控制、尿淀粉酶正常后, 行鼻胆引流管造影, 84例显示胆总管内结石; 7例为单枚结石壶腹部嵌顿, 电针开窗后直接取净. 84例胆管内结石患者, 其中59例造影显示结石较小, 再次内镜治疗后取净结石. 25例中造影显示结石较大、较多, 十二指肠镜取石困难21例; 十二指肠憩室内乳头2例, 十二指肠扁平乳头点状开口2例, 无法进行EST. 此25例患者中伴有胆囊结石者21例, 在胰腺炎控制后择期行三镜联合胆总管探查、胆囊切除术. 经十二指肠镜取净胆总管结石的66例患者中, 伴有胆囊结石者38例, 2例有手术禁忌症, 其余36例在胰腺炎控制5-7 d后行腹腔镜胆囊切除术.

## 3 讨论

ERCP可以在获取诊断同时提供实时治疗. 张圣道 *et al*<sup>[3]</sup>认为只要操作得当, 急性胆源性胰腺炎发作时行ERCP是安全的. 目前尚未见急性胆源性胰腺炎患者经ERCP、EST术后病情加重, 由轻症急性胆源性胰腺炎发展为重症胰腺炎的报导, 且可清除胆道结石, 恢复胆流, 减少胆汁胰液反流, 使重症ABP病情迅速改善并减少复发, 疗效优于传统常规治疗, 成功率可达90%以上<sup>[4]</sup>.

内镜治疗有如下优点<sup>[4-7]</sup>: 可以直接于镜下观察病因, 明确诊断, 特别是对壶腹部结石嵌顿更有特殊诊断价值, 同时又可对因治疗, 缓解梗阻, 通畅引流; 迅速缓解胆绞痛及防止出现急性重症胆管炎及重症胰腺炎, 避免了开腹手术对已处于全身炎症反应综合征、甚至多脏器功能不全状态下患者的再一次打击, 为疾病的最终治愈争取了时间, 创造了条件; 内镜治疗操作简单, 创伤小, 安全可靠, 在有丰富临床经验的内镜医师操作下发生并发症的几率很小, 本组无严重并发症发生, 无穿孔、胰腺炎加重病例; 对于胆囊切除术后合并良性乳头括约肌狭窄、胆道残余或再生细小结石而导致的ABP, EST是其最有效甚至可以说是最终的治疗方法.

急性胆源性胰腺炎中胆总管结石的发病率愈来愈高, 对急性胆源性胰腺炎应做急症ERCP和EST, 以解除梗阻因素, 对预测为重症的急性胆源性胰腺炎的患者, 经48 h保守治疗未见明显好转, 也应急症行ERCP、EST术. 急症(发病24-72 h)ERCP及EST或ENBD, 已成为首选, 可清除胆道结石, 恢复胆流, 减少胆汁胰管返流, 使急性胆源性胰腺炎的病情得到迅速改善, 并减

### ■应用要点

本文探讨急诊十二指肠镜行胆胰管引流治疗急性胆源性胰腺炎的价值及可行性, 为急性胆源性胰腺炎的早期治疗找到了一种新的治疗方法.

### ■同行评价

本文探讨探讨了急性十二指肠镜治疗急性胆源性胰腺炎是安全可靠的,可以阻止胰腺向恶性转化,层次清楚,分析合理,数据可信,有一定的临床价值.

少并发症,疗效优于传统的保守治疗,成功率可达90%以上<sup>[8-10]</sup>. Neoptolemos *et al*<sup>[11]</sup>报导121例重症急性胆源性胰腺炎患者在入院72h内做ERCP和EST或保守治疗,发现重症患者内镜和保守之间差异显著,病残率分别为24%和61%,病死率2%和18%.

我们体会是: ABP一经确诊,影像学检查提示胆管内结石或存在胆道梗阻,只要无ERCP禁忌证,均应尽早(24-72 h内)行内镜治疗,不必等待病情稳定,因为在此期间胰管梗阻不解除,随时都有可能使病情恶化,失去内镜治疗时机,增加中转外科手术的机率及死亡率,并延长住院日.

### 4 参考文献

- 1 Schmalz MJ, Geenen JE. Therapeutic pancreatic endoscopy. *Endoscopy* 1999; 31: 88-94
- 2 Folsch UR, Nitsche R, Ludtke R, Hilgers RA, Creutzfeldt W. Early ERCP and papillotomy compared with conservative treatment for acute biliary pancreatitis. The German Study Group on Acute Biliary Pancreatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 237-242
- 3 张圣道, 韩天权, 汤耀卿. 重症急性胰腺炎临床新技术. 北京: 人民军医出版社, 2002: 68-69
- 4 李兆申, 许国铭, 孙振兴, 金震东, 邹晓平, 谢苏庆, 李平. 急性胰腺炎早期ERCP及内镜治疗66例. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 150-152
- 5 Ricci F, Castaldini G, de Manzoni G, Borzellino

- G, Rodella L, Kind R, Cordiano C. Treatment of gallstone pancreatitis: six-year experience in a single center. *World J Surg* 2002; 26: 85-90
- 6 Tarnasky PR, Cotton PB. Early ERCP and papillotomy for acute biliary pancreatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 1835; author reply 1836
- 7 Sharma VK, Howden CW. Metaanalysis of randomized controlled trials of endoscopic retrograde cholangiography and endoscopic sphincterotomy for the treatment of acute biliary pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3211-3214
- 8 Oria A, Cimmino D, Ocampo C, Silva W, Kohan G, Zandalazini H, Szelagowski C, Chiappetta L. Early endoscopic intervention versus early conservative management in patients with acute gallstone pancreatitis and biliopancreatic obstruction: a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2007; 245: 10-17
- 9 Vazquez-Lglesias JL, Gonzalez-Conde B, Lopez-Roses L, Estevez-Prieto E, Alonso-Aguirre P, Lancho A, Suarez F F, Nunes R. Endoscopic sphincterotomy for prevention of the recurrence of acute biliary pancreatitis in patients with gallbladder in situ: long-term follow-up of 88 patients. *Surg Endosc* 2004; 18: 1442-1446
- 10 Martin del Olmo JC, Toledano M, Blanco JL, Cuesta C, Carbajo M, Vaquero C, Inglada L, Atienza R, Martin F. ERCP's role in the management of acute biliary-pancreatic pathology in the laparoscopic era. *JSLs* 2002; 6: 353-357
- 11 Neoptolemos JP, Carr-Locke DL, London NJ, Bailey IA, James D, Fossard DP. Controlled trial of urgent endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic sphincterotomy versus conservative treatment for acute pancreatitis due to gallstones. *Lancet* 1988; 2: 979-983

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: liuxishuangl@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672.