

重视腰椎外伤手术患者的胃肠道症状

刘改芳, 吴婧, 孟霞, 赵丽伟

刘改芳, 吴婧, 孟霞, 赵丽伟, 河北医科大学第三医院消化科
河北省石家庄市 050051

刘改芳, 主任医师, 主要从事消化系统疾病和消化内镜诊治, 研究领域是幽门螺杆菌基础与临床。

通讯作者: 刘改芳, 050051, 河北省石家庄市自强路139号, 河北医科大学第三医院消化科, liugaifang@medmail.com.cn

电话: 0311-87891965

收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-10-19

Gastrointestinal symptoms after lumbar injury and operation

Gai-Fang Liu, Jing Wu, Xia Meng, Li-Wei Zhao

Gai-Fang Liu, Jing Wu, Xia Meng, Li-Wei Zhao, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Correspondence to: Gai-Fang Liu, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Hebei Medical University, 139 Ziqiang Road, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. liugaifang@medmail.com.cn

Received: 2007-07-13 Revised: 2007-10-19

Abstract

Lumbar injury and operation can lead to different stomach intestine functional disturbances and severe conditions can lead to enteroparalysis and peritonitis owing to retroperitoneal hematoma and stimulation of the coeliac plexus, causing severe abdominal distention, abdominal pain and an inability to take food. These are the main factors associated with antibiotic-associated diarrhea and severe pseudomembranous colitis owing to the use of antibiotics. The reasons for death are generally due to osteopathic incognizanting pseudomembranous colitis and the doctors of gastrointestinal departments for not recognizing or treating in a timely manner intra-abdominal hypertension leading to pseudomembranous colitis, which is the best period to save a patient. Abdominal compartment syndrome is also a reason. Therefore, attention should be paid to early gastrointestinal symptoms after lumbar injury and operation, specifically, antibiotic-associated diarrhea and severe pseudomembranous colitis, to effectively

treat intra-abdominal hypertension, prevent abdominal compartment syndrome and reduce mortality.

Key Words: Lumbar injury; Pseudomembranous colitis; Abdominal compartment syndrome

Liu GF, Wu J, Meng X, Zhao LW. Gastrointestinal symptoms after lumbar injury and operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3563-3566

摘要

腰椎外伤和腰椎手术患者由于腹膜后血肿和手术刺激腹腔神经丛导致不同程度的胃肠道功能障碍。严重者出现肠麻痹和腹膜炎, 患者出现严重腹胀、腹痛、不能进食。在此基础上术后应用抗生素时易出现抗生素相关性腹泻, 严重者出现重度伪膜性肠炎。由于骨科医师对伪膜性肠炎不认识, 消化科医师又对伪膜性肠炎可出现腹腔内高压甚至腹腔间隔室综合征不认识或重视观察处理不够, 错过了在腹腔内高压时段抢救的最佳时机, 导致患者死亡, 因此对腰椎外伤和腰椎手术患者要高度重视早期胃肠道症状, 及时发现抗生素相关性腹泻, 尤其重度伪膜性肠炎的出现。重视腹腔内高压的有效处理, 防止腹腔间隔室综合征的出现, 降低死亡率。

关键词: 腰椎外伤; 伪膜性肠炎; 腹腔间隔室综合征

刘改芳, 吴婧, 孟霞, 赵丽伟. 重视腰椎外伤手术患者的胃肠道症状. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3563-3566

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3563.asp>

0 引言

腰椎外伤和腰椎手术患者由于腹膜后血肿和手术刺激腹腔神经丛导致不同程度的胃肠道功能障碍, 表现为腹胀、腹痛、停止排气、排便等肠麻痹症状, 不能进食。而目前这类患者无论是术前还是术后又常规使用抗生素, 尤其是在老年患者应用广谱抗生素, 很容易出现抗生素相关性腹泻。严重的患者出现重度伪膜性肠炎(pseudomembranous colitis, PMC), 甚至出现

背景资料

腰椎外伤和手术可引起胃肠功能障碍, 患者因腹胀不能进食, 在老年患者应用抗生素时易出现重度伪膜性肠炎, 死亡率比较高。本文通过死亡病例分析和CT阅片并查阅有关腹腔内高压或腹腔间隔室综合征的有关知识, 认识了重度伪膜性肠炎存在腹水的患者往往存在腹腔内高压。如果认识不足, 处理不及时可很快出现腹腔间隔室综合征, 导致多器官功能衰竭、感染中毒性休克而死亡。近来我们在腹腔内高压时段给予患者有效的处理, 死亡率明显下降。

研发前沿
随着广谱抗生素的广泛应用, 社会人口的老齡化, 全球范围内伪膜性肠炎的发生率不断增加, 有必要进一步深入研究这一疾病的生理病理过程和临床分期, 个体化采取及时有效的治疗, 降低死亡率。

腹腔内高压(intra-abdominal hypertension, IAH)或腹腔间隔室综合征(abdominal compartment syndrome, ACS). 如果重视和观察治疗不及时, 可危及患者的生命. 我院是以骨科为主的一家综合性医院, 每年接收大量的腰椎外伤和腰椎疾病的患者. 少数患者在住院过程中出现严重腹胀、腹泻和腹痛等胃肠道症状, 由于骨科医师对PMC不认识, 消化科医师又对IAH或ACS不认识或观察重视处理不够, 导致患者死亡. 因此要高度重视这类患者, 加强防治, 以挽救患者的生命.

1 重视早期胃肠道症状的处理

腰椎外伤和腰椎手术的患者早期出现腹胀、腹痛、停止排气、排便等肠麻痹症状十分常见, 临床骨科医师要给予积极的处理, 尤其是对中老年患者, 要尽早恢复胃肠道功能, 让患者能够进食, 以防更严重的情况出现. 如可能出现的抗生素相关性腹泻, 尤其是PMC. 重度PMC时炎症可累及浆膜层导致腹腔积液, 感染肿胀的肠壁及腹腔积液可引起IAH, 引起肾脏、肺、心脏、肝脏、脑等发生生理功能改变, 进一步可导致器官功能衰竭, 出现ACS. 如不能立即给予有效的腹腔减压, 患者可很快死亡. 因此, 早期胃肠道症状是导致严重后果的基础, 临床要积极的给予调整和改善胃肠功能的治疗, 有报道^[1-2], 表明应用开塞露灌肠和中药配合肌注新斯的明可收到良好的效果.

2 重视抗生素相关性腹泻, 警惕重度伪膜性肠炎的出现

在应用抗生素的过程中出现非特异性腹泻时应考虑抗生素相关性腹泻. 临床有4种情况, 需加以鉴别. (1)单纯抗生素相关性腹泻: 大便为稀水样, 每日3-5次, 体温多正常或低于38℃, 无脱水, 酸中毒表现, 血白细胞正常, 便细菌总数可正常或减少, 球菌/杆菌基本正常, 便常规正常, 结肠镜检查结肠黏膜无明显的炎症表现, 艰难梭菌(*Clostridium difficile*, CD)检出率约15%-25%. (2)抗生素相关性结肠炎: 大便为黏液便, 每日5-20次, 体温多正常或达38℃, 可伴脱水, 酸中毒. 血白细胞: $(10-15) \times 10^9/L$, 便细菌总数减少, 球菌>杆菌, 便常规中可有白细胞或脓球, 结肠镜检查结肠黏膜有炎症表现, 但无明显伪膜形成, CD检出率约50%-70%. (3)抗生素相关性的伪膜性肠炎: 大便多为绿色黏液便, 表面附果冻样物, 可见白色膜状物排出, 每日>20次, 体温>39℃, 亦

可正常, 脱水, 酸中毒明显, 或出现感染中毒性休克、中毒性巨结肠等, 血白细胞计数 $>15 \times 10^9/L$, 便细菌总数明显减少, 球菌>杆菌, 便常规中可有白细胞或脓球和红细胞, CD检出率约95%-100%. (4)药物性出血性结肠炎: 大多发生于内服抗生素10 d内, 突然腹痛, 水样便, 继之出现番茄汁样血便, 每日10余次, 严重时可达10 min 1次, 可有低热, 血白细胞计数 $>10 \times 10^9/L$, 便细菌学检查较多出现的是克雷白杆菌或CD, 结肠镜检查多在横结肠及肝曲有弥漫性浅表出血, 水肿, 很少有溃疡和伪膜形成.

PMC是一种主要发生于结肠的急性渗出坏死性炎症, 主要累及结肠远端, 也可出现在小肠. 病损的黏膜有伪膜形成. 病情较严重时, 如处理不当, 病死率甚高. 1977年证实绝大多数(95%-100%)PMC是由CD的产毒菌株产生的毒素所引起. CD是一种革兰阳性厌氧菌, 主要产生A和B两种毒素, A毒素是肠毒素, B毒素是细胞毒素. 肠毒素是主要的致病因子, 通过激活巨噬细胞、肥大细胞及其后的中性粒细胞, 释放强效的炎症递质和细胞因子, 引起局部黏膜血管通透性增加, 黏液分泌, 炎性细胞浸润, 出血及绒毛损害, 甚至黏膜坏死, 细胞毒素在肠毒素的基础上加重黏膜损害. 但是健康成人粪便中仅有1%-5%存在CD^[3], 也就是仅有1%-5%健康成人是CD携带者. 因此, 如果不存在交叉感染, 只有CD携带者在某些易患因素的情况下发生PMC. 临床常见的易感因素有腰椎外伤和腰椎疾病手术后以及腹部、盆腔手术, 尤其是中老年患者. 另外也见于肿瘤放疗或化疗、尿毒症、糖尿病晚期患者.

绝大多数伪膜性肠炎的出现由抗生素激发, 由CD引起. 临床几乎所有的抗生素都可诱发PMC, 依次为阿莫西林(氨苄青霉素)、克林霉素(氯林可霉素)和头孢菌素类. 不常引起的是青霉素、红霉素、复方新诺明, 偶可引起的是氯霉素、四环素和氨基糖苷类.*po*、静脉或单剂抗生素治疗都可发生PMC. 因此对重症或手术后患者, 在应用抗生素过程中发生非特异性腹泻时应考虑本病的可能性. PMC可发生于抗生素使用期间或停药后近期内出现. 多数患者于使用抗生素的第1-2周发病, 多发生于5-10 d, 也可早到数小时或迟至停药后6 wk. 突然起病者可以发生爆发性结肠炎, 出现感染中毒性休克和ACS, 如处理不及时, 患者可很快死亡. 因此, 重度PMC除停用相关抗生素, 给予*po*甲硝唑或万

古霉素针对CD药物治疗外, 尚需积极得当的内科综合处理。

为了早期诊断和及时有效的治疗PMC, 结肠镜检查简便可行, 在一般医院均可进行。由于腹泻和病变多在左半结肠, 无需做特殊肠道准备, 安全性大, 必要时还可做病理活检证实。因此如怀疑PMC可尽早行结肠镜检查。

3 重视腹腔内高压和腹腔间隔室综合征的出现

腹腔内压力(intra-abdominal pressure, IAP)是腹腔封闭腔隙内稳定状态下的压力, 主要由腹腔内脏器的静水压产生。其数值随呼吸而变化, 吸气时上升, 呼气时下降。正常腹内压在5 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)左右, 肥胖及术后会相对高一些。临床上能够引起腹腔内容物急剧增加, 导致腹内压增加的因素有空腔脏器创伤、肠道感染性炎症、小肠或结肠梗阻、弥漫性腹膜炎、重症急性胰腺炎等。实验和临床研究均已证实, IAH确可单独作为多器官功能损害的致病因素, 导致胃肠道、心血管、肾脏、呼吸和中枢神经系统障碍。在Sugrue的综述中表明^[4], 如不了解腹腔内高压, 使其得不到及时处理的后果是增加肾损害、内脏小肠缺血、呼吸衰竭和死亡的危险性。

2004-12 ACS世界联合会(World Society of the Abdominal Compartment Syndrome, WSACS)将IAH定义为间隔4-6 h分别进行至少3次标准测压中记录到的数值稳定 ≥ 12 mmHg, ACS是IAH进一步发展所致。WSACS定义ACS为腹腔内高压在间隔1-6 h分别进行至少3次标准测量中, 腹腔内压力逐渐稳定上升, 并 ≥ 20 mmHg, 同时合并单个或多个器官功能衰竭。Serpytis *et al*^[5]报道, 腹腔内压增加可引起几乎所有器官功能受损, 即使轻微的腹腔内压增加也可对呼吸、心血管、脑、胃肠、肝脏和肾脏功能产生负面影响。IAH可导致内脏器官血流灌注不足, 引起肠缺血, 进一步导致细菌易位、细胞因子释放和氧自由基的产生。在这些因素的作用下导致患者多器官功能衰竭。因此, 提高对IAH/ACS的认识水平, 有利于早期发现IAH, 防止ACS。如果能针对性地采取适当治疗方法, 将会明显改善患者预后。

目前公认直接测量腹腔内压力是直接测压法的“金标准”, 而间接测压法的“金标准”则是简单易行的膀胱内测压法。当膀胱内容量 < 100 mL时, 膀胱仅作为一个被动储存库, 可以传递腹腔内压力而不附加任何一点来自其自身肌肉的压力。测量方法是在膀胱内置入一根

Foley导管, 排空膀胱内尿液, 注入50-100 mL生理盐水, 通过导管与压力换能器相连。在患者完全平卧位, 消除腹肌收缩影响的情况下, 以腋中线为零点, 取呼气末的数值, 单位为mmHg。

腰椎外伤和腰椎手术的患者如出现PMC, 尤其是重度PMC时, 炎症可累及浆膜层导致大量腹腔积液。急性感染肿胀的肠壁和腹腔积液可引起IAH, 患者出现呼吸急促, 心率增快, 尿量减少, 烦躁, 中心静脉压升高。这时如果认识到IAH, 及时给予腹腔减压如腹腔穿刺放腹水, 胃肠减压, 应用利尿剂等, 可有效的缓解症状, 阻止病情的进一步恶化, 从而挽救患者的生命。如果对IAH认识不足, 病情进一步发展可导致肾脏、肺、心脏、肝脏、脑等发生器官功能衰竭, 出现ACS。ACS早期患者出现呼吸困难, 呼吸道阻力增加和高碳酸血症(如气道压 > 45 cm H₂O, PaCO₂ > 50 mmHg), 尿量减少。后期体征包括严重的腹胀, 腹壁顺应性降低、紧张度增加, 少尿或无尿和氮质血症, 呼吸衰竭及心输出量减少。腹部CT表现有下腔静脉狭窄, 肾脏直接受压移位, 肠壁水肿增厚, 腹腔前后径增大, 圆形腹征阳性(肾静脉、下腔静脉同时显影层面, 不包括皮下脂肪: 前后径比横径的比值大于0.80)。

胃肠道对IAP升高最敏感, 是受IAH/ACS影响最早的器官, 其血流灌注对腹内压力非常敏感。小肠黏膜血流灌注在IAP达到10 mmHg, 20 mmHg时, 分别减少17%, 36%。IAP达到40 mmHg, 小肠黏膜血流灌注减少67%, 此时肠系膜上动脉血流减少69%, 胃组织血流减少45%。胃肠缺血造成肠壁通透性增高, 细菌易位。20世纪90年代初, 国外有学者在动物模型中观察到IAH与细菌易位到肠系膜淋巴结、肝脏和脾密切相关。即使IAP升高时间不足1 h, 细菌易位发生率也显著增加。IAH也使肠系膜静脉受压, 加重肠壁水肿和内脏肿胀, 形成恶性循环。早期腹腔减压可有效逆转器官功能障碍, 常用的减压治疗措施有穿刺引流、胃肠减压、促进肠蠕动、血液超滤和手术减压等。

4 结论

为防止腰椎外伤和腰椎手术的患者出现PMC, 尤其是重度PMC, 从而危机患者生命, 现需要广大医师做到以下几点: (1)合理应用抗生素, 严格控制用药指征, (2)掌握PMC的发病情况和特点, (3)密切观察患者腹部症状和大便情况, (4)及时化验检查并及时分析和正确处理, (5)加强患者

应用要点
重视伪膜性肠炎, 及时发现腹腔内高压, 采取有效的治疗措施, 防止腹腔间隔室综合征。

同行评价
本文语句通顺,层次清楚,建议联系临床作更深入的阐述.

的管理,防止院内交叉感染.

Malbrain *et al*^[6]强调是重视ACS的时候了.有研究表明^[7],腹腔内压力越大,病死率越高.为防止腰椎外伤和腰椎手术的患者出现重度PMC时进一步出现IAH,临床医生必须尽力缓解IAH,防止最后演变为ACS.这就需要消化科每一位医师要学习和掌握IAH和ACS,密切观察病情变化,把更多的注意力放在诊断及治疗介于正常IAP与ACS之间狭窄的腹内高压区上.因为胃肠对低血流状态非常敏感,在压力10-15 mmHg时就可出现内脏缺血及酸中毒.治疗越早,效果越好,尤其在少尿初期给予积极有效的减低腹压治疗,可明显改善患者的预后,降低病死率.

5 参考文献

- 1 史建娣. 开塞露灌肠治疗单纯性腰椎骨折骨盆骨折病人腹胀临床效果观察. 中国航天医药杂志 2003; 5: 42

- 2 李俊宇, 于其华. 大成汤加味配合肌注新斯的明治疗胸腰椎骨折早期腹胀腹痛. 汕头大学医学院学报 2000; 13: 63-65
- 3 高德明, 吴金生. 现代急腹症学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 398
- 4 Sugrue M. Abdominal compartment syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 333-338
- 5 Serpytis M, Ivaskevicius J. Intra-abdominal hypertension and multiple organ dysfunction syndrome. *Medicina (Kaunas)* 2005; 41: 903-909
- 6 Malbrain ML, Cheatham ML, Kirkpatrick A, Sugrue M, De Waele J, Ivatury R. Abdominal compartment syndrome: it's time to pay attention! *Intensive Care Med* 2006; 32: 1912-1914
- 7 Malbrain ML, Chiumello D, Pelosi P, Bihari D, Innes R, Ranieri VM, Del Turco M, Wilmer A, Brienza N, Malcangi V, Cohen J, Japiassu A, De Keulenaer BL, Daelemans R, Jacquet L, Laterre PF, Frank G, de Souza P, Cesana B, Gattinoni L. Incidence and prognosis of intraabdominal hypertension in a mixed population of critically ill patients: a multiple-center epidemiological study. *Crit Care Med* 2005; 33: 315-322

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 •

世界华人消化杂志的同行评价

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

牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟, 大连医科大学卫生学教研室 辽宁省大连市 116044
曲淑贤, 大连医科大学中心实验室 辽宁省大连市 116044
刘爽, 大连医科大学硕士研究生, 主要从事毒理学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30571584; 30600488
辽宁省教育厅资助项目, No. 05L113
通讯作者: 朴丰源, 116044, 辽宁省大连市, 大连医科大学卫生学教研室. piaofy-dy@yahoo.com.cn
电话: 0411-86110330 传真: 0411-86110329
收稿日期: 2007-05-17 修回日期: 2007-11-10

Protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic

Shuang Liu, Feng-Yuan Piao, Shu-Xian Qu, Xian-Ce Sun, Xiao-Feng Yao, Jian-Xin Ye, Qiu-Juan Li

Shuang Liu, Feng-Yuan Piao, Shu-Xian Qu, Xian-Ce Sun, Xiao-Feng Yao, Jian-Xin Ye, Qiu-Juan Li, Department of Hygiene, College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Shu-Xian Qu, Central Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571584; 30600488. the Scientific Research Foundation of the Education Department in Liaoning Province, No. 05L113

Correspondence to: Feng-Yuan Piao, Department of Hygiene, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China. piaofy-dy@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-17 Revised: 2007-11-10

Abstract

AIM: To observe the protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic (As).

METHODS: Forty mice were divided into 4 groups: As group (4 ppm As₂O₃), taurine protective group (4 ppm As₂O₃ + 150 mg/kg taurine), vitamin C protective group (4 ppm As₂O₃ + 45 mg/kg vitamin C), and normal saline group as controls. Liver tissues were obtained and HE staining was performed, 8-OH-dG expression was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: Liver cells in mice in the As-treated groups showed swelling and ballooning degeneration. 8-OH-dG was strongly expressed in these groups compared with the control group ($P < 0.01$). The two protective groups showed mild damage with lower 8-OH-dG levels than the As group. The total optical density of 8-OH-dG immunohistochemical staining in the taurine protective group was lower than that in the vitamin C protective group (0.824 ± 0.1062 vs 246.7 ± 61.81 , $P = 0.012$).

CONCLUSION: Mouse livers showed severe tissue injuries and DNA oxidative damage after long-term As exposure. Taurine and vitamin C alleviated this damage significantly, with the taurine group showing better recovery than the vitamin C group.

Key Words: Arsenic; Liver; 8-hydroxy-2'-deoxyguanine; Taurine; Vitamin C; Immunohistochemistry

Liu S, Piao FY, Qu SX, Sun XC, Yao XF, Ye JX, Li QJ. Protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3567-3571

摘要

目的: 观察牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用。

方法: 将小鼠40只随机分为4组, 即: 染砷组(4 ppm As₂O₃)、牛黄酸保护组(4 ppm As₂O₃+150 mg/kg牛黄酸)、维生素C保护组(4 ppm As₂O₃+45 mg/kg维生素C)以及生理盐水对照组, 用HE染色法进行组织病理学观察, 用免疫组化及图像分析检测肝组织内8-OH-dG的水平。

结果: 染砷组小鼠肝组织出现胞质疏松化和气球样变等病理学改变, 牛黄酸和维生素C保护组肝组织上述病理学变化较轻。免疫组化结果表明, 染砷组肝组织呈现8-OH-dG的高表

背景资料
砷是一种常见的环境毒物, 全世界有超过200万人饮用砷超标的水(我国现行饮水卫生标准 <0.05 ppm)而造成各种疾病。因此, 其损伤机制和防治的研究十分重要。

应用要点
本文以8-羟基脱氧鸟嘌呤作为砷毒性导致DNA损伤的标志物,观察到氧化损伤是砷肝损伤的机制之一。牛黄酸和维生素C有较好的保护作用,为砷损害的防治提供了依据。

达($P<0.01$)。两保护组小鼠肝组织8-OH-dG的表达显著低于染砷组($P<0.01$),其中牛黄酸保护组小鼠肝组织8-OH-dG免疫染色总光密度值(0.824 ± 0.1062)显著低于维生素C保护组(246.7 ± 61.81 , $P=0.012$)。

结论:牛黄酸和维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤具有保护作用,其中牛黄酸的保护作用更明显。

关键词:三氧化二砷; 肝脏; 8-羟基脱氧鸟嘌呤; 牛黄酸; 维生素C; 免疫组化方法

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟. 牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3567-3571
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3567.asp>

0 引言

砷是一种常见的环境毒物和已知的人类致癌物。Lu *et al*^[1]对贵州燃煤型砷中毒患者的肝脏活检中发现,肝组织有明显退化、变性等病理变化。Santra *et al*^[2]对248例饮水型砷中毒患者调查发现,190例有肝脏肿大,91.3%显示有非硬化性汇管区纤维化的改变。但是,砷对肝脏的毒性作用机制尚不清楚。目前认为,过量砷暴露可使机体产生过量活性氧族(Reactive oxygen species, ROS),导致组织细胞的DNA损伤很可能是砷的毒作用机制之一。因此,通过拮抗剂对砷的毒性作用进行干预,使机体生物大分子免受损伤是预防砷的毒性作用的研究重点。本研究以小鼠为研究对象,以8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-OH-dG)作为砷毒性导致DNA损伤标志物,以牛黄酸和维生素C作为拮抗剂,通过免疫组化方法,观察拮抗剂对砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用,为砷毒性损伤肝脏的预防和治疗提供实验动物依据。

1 材料和方法

1.1 材料 As₂O₃(Sigma, 美国),牛黄酸(北京奥博星生物技术责任有限公司),抗8-OH-dG mAb(Fukuroi, 日本),UltrasensitiveTM S-P超敏试剂盒及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),其他试剂均为分析纯。石蜡切片机(YD-1508B, 浙江省金华市益迪医疗设备厂)、万用光学显微镜(Olympus BX-51, 日本)、数码相机(Kodak DC290, 日本)、图像分析处理系统(Image-pro plus 4.5)。健康昆明种小鼠40

只,雌雄各半,体质量 20 ± 2 g,由大连医科大学实验动物中心提供。按体质量将小鼠随机分为4组:染毒组(4 ppm As₂O₃),牛黄酸保护组(4 ppm As₂O₃+150 mg/kg牛黄酸),维生素C保护组(4 ppm As₂O₃+45 mg/kg维生素C),生理盐水对照组。小鼠正常饮食,室温18-22℃,通过自然饮用含不同浓度As₂O₃蒸馏水的方式使小鼠暴露于砷。保护剂是以灌胃方式投给,每星期2次。每天换水,连续染毒60 d,断头处死小鼠后立即取肝组织固定。

1.2 方法

1.2.1 组织形态学观察:肝组织经40 g/L甲醛固定后,常规石蜡包埋,5 μm连续切片,在65℃温箱中烤片60 min,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下进行组织形态学观察。

1.2.2 免疫组织化学观察:按照S-P免疫组化染色法,将未经HE染色的切片常规二甲苯脱蜡后,在肝组织切片上滴1:300稀释的鼠抗人8-OH-dG mAb,在4℃条件下孵育过夜,然后按UltrasensitiveTM S-P超敏试剂盒的步骤进行,DAB显色,苏木素复染细胞核,自来水冲洗返蓝。常规脱水、透明,中性树胶封片。阅片时,先观察整张切片,再随机选择不同区域的五个高倍视野,显微镜下拍照,并应用图像分析软件对8-OH-dG表达的总光密度值进行定量的分析。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件,计量资料用mean±SD表示。用单因素方差分析(ANOVA)比较各实验组与对照组间的统计学差异,以 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 肝组织病理学观察 光镜观察的结果显示,对照组小鼠肝组织病理变化未见异常,而染砷组小鼠肝组织出现不同程度的肝细胞变性,可见肝细胞明显肿大,胞质疏松呈网状、半透明,肝细胞索排列紊乱、拥挤,肝窦受压变窄,偶见细胞核固缩等病理学改变。牛黄酸和维生素C保护组小鼠肝细胞肿胀较轻,未见核固缩(图1)。

2.2 小鼠肝组织抗8-OH-dG免疫组化的观察结果 对照组小鼠肝组织细胞中几乎无8-OH-dG的表达,染砷组细胞核内出现较多的棕褐色抗8-OH-dG阳性颗粒,表明8-OH-dG呈现明显的高表达(图2)。而两保护组小鼠肝组织8-OH-dG的表达较少。各组小鼠肝细胞抗8-OH-dG免疫组化染色总光密度检测结果如表1所示。染砷组抗8-OH-dG免疫组化染色总光密度值明显高于对照组,

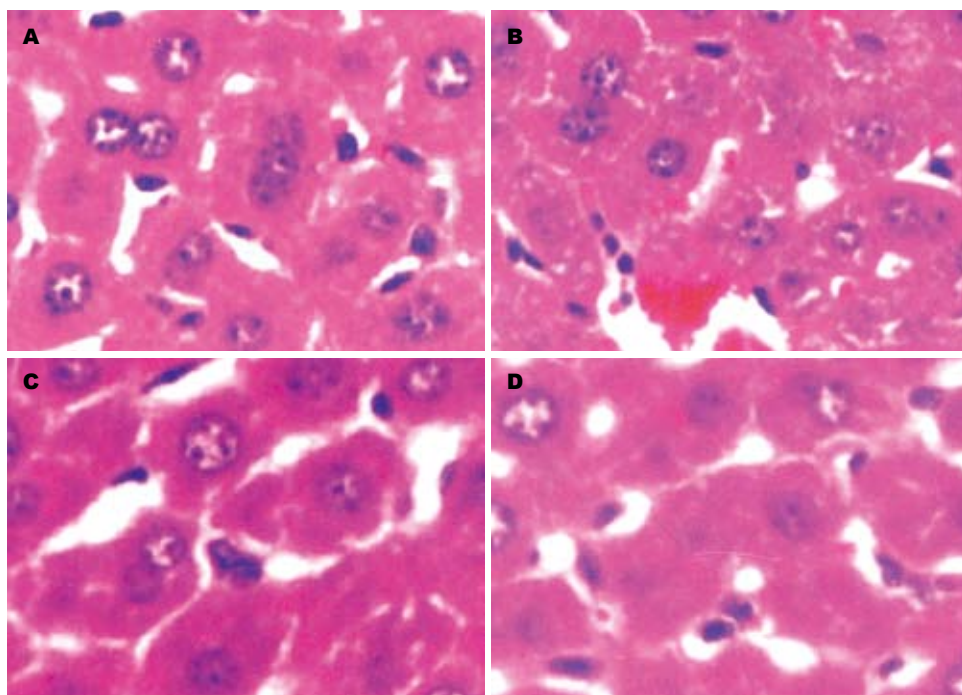


图 1 小鼠肝组织病理(H&E × 400). A: 对照组; B: 染砷组; C: 牛黄酸保护组; D: 维生素C保护组.

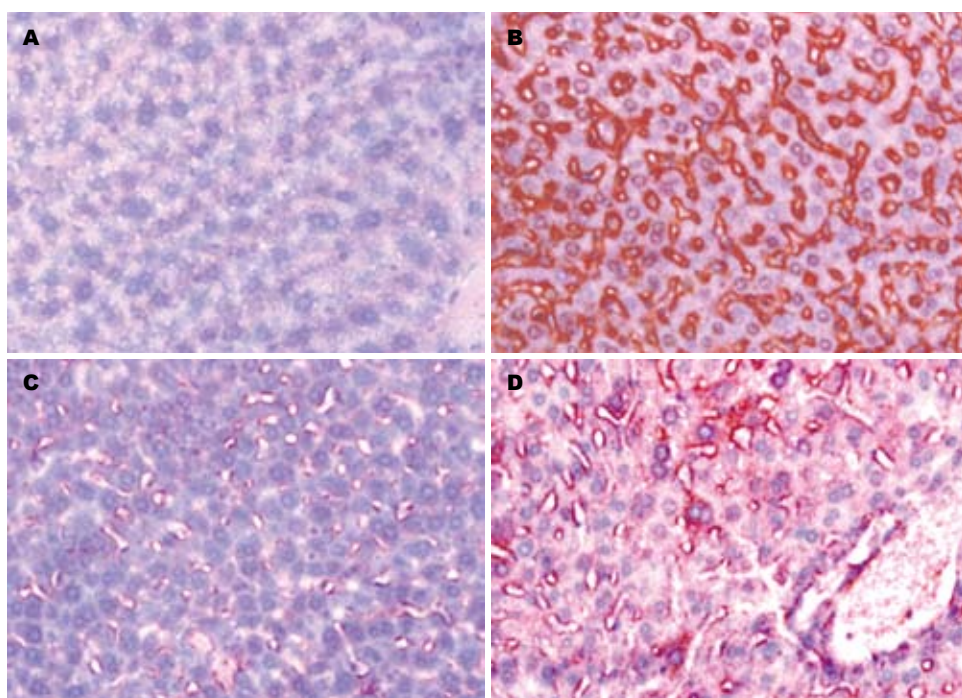


图 2 小鼠肝组织8-OH-dG免疫组化染色(× 200). A: 对照组; B: 染砷组; C: 牛黄酸保护组; D: 维生素C保护组.

具有显著性差异($P < 0.01$), 而牛黄酸及维生素C保护组的总光密度值明显低于染砷组($P < 0.01$). 其中牛黄酸的保护效果明显好于维生素C ($P = 0.012$).

3 讨论

慢性砷暴露可造成机体多器官损伤, 而肝脏是

砷毒性作用的靶器官之一^[3-6]. Guha Mazumder发现, 长期摄入高砷水可引起氧化性损伤, 导致小鼠肝脏脂肪浸润和纤维化^[7]. Gupta也报道了小鼠腹膜内砷暴露可引起氧化性指标的升高并伴随多种抗氧化酶水平的降低^[8]. 但关于慢性低剂量砷暴露与小鼠肝脏DNA氧化损伤之间的关系还未见报道.

同行评价
本文选题新颖, 设计基本合理, 统计方法正确, 有一定创新. 获得的结果对砷暴露肝损伤的防治提供了一定的理论和实践价值的参考资料, 但文章写作的严谨性和逻辑性方面稍有欠缺.

表 1 8-OH-dG在各组小鼠肝组织中免疫组化染色的总光密度值($n = 10$, mean \pm SD)

分组	总光密度值
对照组	0.275 \pm 0.022
染砷组	1995 \pm 467.2 ^b
牛黄酸保护组	0.824 \pm 0.1062 ^d
维生素C保护组	246.7 \pm 61.81 ^{bdf}

^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^d $P < 0.01$ vs 染砷组, ^f $P < 0.01$ vs 牛黄酸保护组.

动物细胞在应激条件下可以产生ROS. 当其生成作用大于机体的清除作用时, ROS升高并造成细胞的膜脂质、蛋白质和DNA的氧化损伤^[9-10]. 由于DNA的抗氧化能力不如膜脂质和蛋白质, DNA氧化产物的测定对于体内氧化损伤程度的估计是比较敏感的^[11]. DNA中的脱氧鸟嘌呤最容易被ROS氧化而生成8-OH-dG, 因此8-OH-dG可作为由ROS诱导的DNA损伤的特异性标记物. 本实验发现慢性砷暴露小鼠肝组织8-OH-dG的水平增高, 提示砷可通过ROS引起肝组织DNA损伤. 而8-OH-dG主要集中在细胞核内, 细胞质内染色很少, 这是因为dG主要在细胞核内表达.

病理学观察可见染砷组小鼠肝组织出现细胞变性, 胞质疏松化和气球样变及核固缩等病理学改变. 使用牛黄酸和维生素C保护组小鼠肝组织的病理变化相对较少, 肝细胞水肿程度较轻、范围较小, 未见核固缩. 结果显示, 染砷组8-OH-dG表达较强, 病理损伤也较重, 提示砷可能通过氧化性损伤造成肝脏的病理损害.

由于我们之前的研究已表明氧化应激参与砷的神经毒性作用^[12], 因此抑制或改善氧化应激是一种合理的干预途径. 近期有报道将维生素C加入透析用水可明显降低血液透析患者体内OX-LDL水平, 改善氧化应激状态^[13]. 我们用灌胃的方式给小鼠补充维生素C, 观察到小鼠肝细胞8-OH-dG表达较砷暴露组少, 说明维生素C能增强染砷小鼠的抗氧化能力. 维生素C减轻氧化应激的机制可能为, 维生素C作为自由基的清除剂, 可能与超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH^{\cdot})反应, 保护机体免受内源性氧自由基的损伤. 在本实验中, 牛黄酸较维生素C对肝组织的保护作用强,

8-OH-dG的表达也显著降低. 牛黄酸是一种含硫的 β 氨基酸, 有多种生物效应, 如降低小鼠脑组织中脂褐质的含量, 清除脂质过氧化物代谢产物丙二醛(MDA), 提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性等^[14]. 可能SOD通过清除氧自由基起到对DNA的保护作用. 此外, 在胆汁的合成过程中, 牛黄酸的巯基也可能与组织中的砷发生螯合作用, 促进砷硫化物在肝脏中的排泄^[15].

总之, 使用牛黄酸和维生素C可以缓解砷介导的机体氧化性肝损伤, 并且进一步证实了ROS在肝脏砷毒性中的作用. 所以及早投放保护剂可以减轻或预防慢性低剂量砷暴露所致的机体损伤.

4 参考文献

- 1 Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001; 59: 185-192
- 2 Santra A, Das Gupta J, De BK, Roy B, Guha Mazumder DN. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian J Gastroenterol* 1999; 18: 152-155
- 3 Centeno JA, Mullick FG, Martinez L, Page NP, Gibb H, Longfellow D, Thompson C, Ladich ER. Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect* 2002; 110 Suppl 5: 883-886
- 4 刘爽, 朴丰源, 姚晓峰, 曲淑贤, 李秋娟, 孙鲜策, 叶建新. 慢性砷暴露对小鼠肾组织DNA损伤及牛黄酸和维生素C的保护作用. *毒理学杂志* 2007; 21: 248-250
- 5 Waalkes MP, Ward JM, Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis* 2004; 25: 133-141
- 6 许玲, 张信江, 刘杰, 程明亮, 周运书, 杜辉. 燃煤型砷中毒患者死因的调查. *中国地方病学杂志* 2002; 21: 484-486
- 7 Mazumder DN. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 169-175
- 8 Gupta R, Dubey DK, Kannan GM, Flora SJ. Concomitant administration of Moringa oleifera seed powder in the remediation of arsenic-induced oxidative stress in mouse. *Cell Biol Int* 2007; 31: 44-56
- 9 Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998; 30: 225-243
- 10 Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Guido M, Rugge M. Oxidative damage, pro-inflammatory cytokines, TGF- α and c-myc in chronic HCV-related hepatitis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2065-2069
- 11 Akagi S, Nagake Y, Kasahara J, Sarai A, Kihara

- T, Morimoto H, Yano A, Nakao K, Nanba K, Ichikawa H, Makino H. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8: 192-195
- 12 Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K. Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *J Occup Health* 2005; 47: 445-449
- 13 Shi XF, Ding F, Zhu QY, Xue J, Lu FM, Gu Y, Lin ST. Use of ascorbate-rich dialysate to attenuate oxidative stress in maintenance hemodialysis patients. *Ren Fail* 2005; 27: 213-219
- 14 周白云, 刘春蕾. 抗氧化剂对博莱霉素拮抗作用的研究. *泰山医学院学报* 2006; 27: 17-19
- 15 Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev* 1998; 3: 262-270

编辑 程剑侠 电编 马文华

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议及作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量,即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略,将同行评议者姓名,职称,机构的名称与文章一同在脚注出版.如:同行评议者:房静远教授,上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所;韩新巍教授,郑州大学第一附属医院放射科;匡安仁教授,四川大学华西医院核医学科.

WCJD和WJG即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率,如:作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等;此课题由陈湘川,庞丽娟,陈玲,杨兰,张金芳,齐妍及李洪安设计;研究过程由陈玲,杨兰,张金芳,蒋金芳,杨磊,李锋及曹秀峰操作完成;研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供;数据分析由陈湘川,杨兰及庞丽娟完成;本论文写作由陈湘川,庞丽娟及李洪安完成.

WCJD和WJG即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传.读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文.使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.(总编辑:马连生 2007-11-15)

RNA干扰阻断cyclin D1表达抑制结肠癌细胞增殖

丁健, 李丹, 王承党, 吴婷, 王小众, 于皆平

背景资料
肿瘤细胞不同于正常细胞的重要特点在于其生长和增殖的失控。细胞的生长增殖受细胞周期蛋白的调节, 现有资料证实多种肿瘤表达异常增多的细胞周期蛋白, 其中报道最多是cyclin D1, cyclin D1已被证实是调节肿瘤细胞生长增殖的关键信号分子。

丁健, 王承党, 吴婷, 福建医科大学附属第一医院消化内科 福建省福州市 350002
李丹, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
丁健, 2005年武汉大学医学院医学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的基因治疗研究。
福建省科技厅青年人才创新基金资助项目, No. 2006F3035
福建省卫生厅青年基金资助项目, No. 2006-1-10
通讯作者: 丁健, 350002, 福建省福州市茶中路, 福建医科大学附属第一医院消化内科。docdingjian@yahoo.com.cn
电话: 0591-88808826
收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2007-11-28

RNA interference inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells by blocking the expression of cyclin D1

Jian Ding, Dan Li, Cheng-Dang Wang, Ting Wu, Xiao-Zhong Wang, Jie-Ping Yu

Jian Ding, Cheng-Dang Wang, Ting Wu, Digestive Department, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China
Dan Li, Xiao-Zhong Wang, Digestive Department, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Jie-Ping Yu, Digestive Department, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Supported by: Youth Creation Foundation of Sci-Tech Bureau of Fujian Province, No. 2006F3035; Youth Scientific Foundation of Health Bureau of Fujian Province, No. 2006-1-10
Correspondence to: Jian Ding, Digestive Department, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Chazhong Road, Fuzhou 350002, Fujian Province, China. docdingjian@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-23 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To inhibit the expression of cyclin D1 in a human colorectal cancer cell line using RNA interference, and to examine its effect on the growth and proliferation of colorectal cancer cells.

METHODS: Human colorectal cancer HT-29 cells were divided into three groups: antisense group transfected with antisense siRNA against cyclin D1, sense group transfected with sense siRNA against cyclin D1, and control group. The inhibitory effect of antisense siRNA on cyclin

D1 protein expression was detected by immunoprecipitation and Western blotting. MTT assay was used to detect the effect of antisense siRNA on the growth and metabolism of HT-29 cells. ^3H -TdR incorporation assay and flow cytometry were used to test the metabolism and cell cycle changes in HT-29 cells transfected with antisense siRNA against cyclin D1.

RESULTS: The expression level of cyclin D1 was clearly decreased in HT-29 cells in the antisense group. MTT assay showed a significant decrease in the metabolism of HT-29 cells in the antisense group, between 12 h and 72 h, compared with that in the control and sense groups ($P < 0.01$). ^3H -TdR incorporation was lower in the antisense group than that in the control and sense groups (^3H -TdR: 1181.8 ± 117.97 vs 1798.4 ± 55.36 , 1851.4 ± 83.46 ; $P < 0.01$; G_0/G_1 : 79.31% vs 60.87% , 59.14% ; S : 13.67% vs 26.42% , 27.93% ; $P < 0.01$).

CONCLUSION: RNA interference can effectively inhibit the expression of cyclin D1, and inhibition of cyclin D1 expression causes a decrease in the growth, metabolism and proliferation of colorectal cancer cells, due to a delay in the progression of the cell cycle from G_1 to S phase.

Key Words: Small RNA interference; Colorectal cancer; Cyclin D1; Cell cycle; Proliferation; MTT assay; Flow cytometry

Ding J, Li D, Wang CD, Wu T, Wang XZ, Yu JP. RNA interference inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells by blocking the expression of cyclin D1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3572-3576

摘要

目的: 使用RNA干扰技术阻断人结肠癌细胞cyclin D1的表达, 检测其对细胞生长增殖的影响和机制。

方法: 将人结肠癌细胞株HT-29分成3组, antisense组(转染反义链组)、sense组(转染正义链组)和对照组。免疫沉淀和蛋白质印迹法观察cyclin D1 siRNA对细胞cyclin D1蛋白质表达的影响, 并对蛋白质电泳图像进行分析, MTT比色法绘制细胞生长曲线, ^3H -TdR技术

和流式细胞技术观测细胞周期变化.

结果: 反义siRNA有效抑制了cyclin D1蛋白质表达, MTT实验显示, 转染反义siRNA的细胞, 生长代谢减慢, 与对照组细胞差异显著($P<0.01$). 而antisense组细胞24 h的 ^3H -TdR掺入量, G_0/G_1 期和S期细胞较对照组和sense组明显减少(^3H -TdR: 1181.8 ± 117.97 vs 1798.4 ± 55.36 , 1851.4 ± 83.46 ; $P<0.01$; G_0/G_1 期: 79.31% vs 60.87% , 59.14% ; S期: 13.67% vs 26.42% , 27.93% ; $P<0.01$).

结论: RNA干扰技术能有效减弱cyclin D1蛋白质表达, 使细胞周期受阻, 并抑制结肠癌细胞的生长增殖.

关键词: 小干扰RNA; 结肠癌; cyclin D1; 细胞周期; 细胞增殖; MTT比色法; 流式细胞技术

丁健, 李丹, 王承党, 吴婷, 王小众, 于皆平. RNA干扰阻断cyclin D1表达抑制结肠癌细胞增殖. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3572-3576
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3572.asp>

0 引言

哺乳动物细胞的生长增殖受到细胞周期蛋白的调控. 其中cyclin D1在细胞从 G_1 期进入S期的过程中发挥关键作用, 决定细胞是否继续生长和增殖^[1-6]. 肿瘤细胞的生长同样受到cyclin D1调控, 在许多肿瘤细胞内发现cyclin D1的过表达, 比如肝癌^[7-10]、食管癌^[11-14]、胰腺癌^[15]、乳腺癌^[16]、喉癌^[17-18]、膀胱癌^[19]、纤维肉瘤^[20]和肺癌^[21]. 使用细胞转录因子Cdx1可以降低细胞内cyclin D1的含量, 达到抑制结肠癌增殖的目的^[22]. 因此, 通过降低cyclin D1表达来抑制肿瘤的发生和转移成为肿瘤治疗的一个新思路. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA分子介导的序列特异性转录后的基因静默过程, 是一种高效的基因阻断技术^[23]. 本研究选择cyclin D1作为靶基因, 使用RNA干扰技术, 合成小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), 并将其转导人结肠癌细胞株HT-29细胞, 观察siRNA对cyclin D1的阻断效果, 检测随之而来结肠癌细胞增殖和细胞周期的变化, 对cyclin D1的生物学作用进行补充, 同时为结肠癌的治疗探求一条新的途径.

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株HT-29购自上海生物

细胞研究所, Lipofectamine2000是Invitrogen公司产品, 兔抗人cyclin D1抗体购自Santa Cruz公司, 电化学发光法检测试剂盒(包括二抗)购自武汉博士德公司, RPMI1640、小牛血清试剂为GIBCO-BRL公司产品, 蛋白A、噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砜均为Sigma公司产品, ^3H -TdR为美国Amersham公司产品, 液体闪烁技术仪BeckmanL-9800型为美国贝克曼公司, 流式细胞仪FACSCalibur型是美国BD公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人结肠癌细胞株HT-29使用含100 mL/L小牛血清的1640培养液, 置于 37°C 、100%湿度和50 mL/L CO_2 的培养箱中培养.

1.2.2 siRNA的设计和合成: 根据GenBank检索cyclin D1的mRNA序列, 使用美国Ambion公司siRNA设计软件设计, 由大连TaKaRa公司合成双链小RNA. 正义链: UGACCCCGCACGAUUUCAUtt, 反义链: AUGAAAUCGUGCGGGGUCAtt. G/C含量: 47.6%, 在GenBank中使用同源序列查询, 确定与人类基因外显子无同源性.

1.2.3 siRNA的转染和细胞分组: 人结肠癌细胞株HT-29细胞生长至80%融合时, 使用Lipofectamine2000将siRNA转染入细胞, 操作过程按Lipofectamine2000的说明书进行. 根据转染siRNA的不同和对照组一起, 建立3个细胞组: 转染: antisense组、转染: sense组和对照组即正常HT-29细胞组. 转染结束后, 即进入下一步实验.

1.2.4 免疫沉淀和蛋白质印迹法检测cyclin D1蛋白质表达: 转染48 h后, 取各细胞组细胞, 裂解, 离心后上清液蛋白定量. 三组细胞各取等量蛋白加兔抗人cyclin D1抗体和琼脂糖交联的蛋白A沉淀蛋白质, 振荡过夜后, 离心取沉淀. 行SDS-PAGE电泳, 之后以电转印法将蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 封闭后加兔抗人cyclin D1抗体, 使用电化学发光法试剂盒进行显影. 使用图像分析软件Image-Pro Plus对蛋白质电泳图像进行分析. 为方便直观比较, 将蛋白质表达的最大值定义为100%.

1.2.5 MTT比色法检测细胞增殖实验: 使用胰蛋白酶消化antisense组、sense组和对照组细胞. 以每孔 10^4 个细胞的密度将细胞接种于96孔板中, 每组接种5孔. 置于 37°C 、50 mL/L CO_2 细胞培养箱中, 分别于12、24、36、48、60、72 h每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μL , 继续培养4 h, 吸去上清液, 每孔加入二甲基亚砜150 μL , 振荡10 min.

研发前沿
本文使用RNA干扰技术, 封闭cyclin D1表达, 观察随之而来的细胞生物学功能的变化, 旨在进一步了解cyclin D1在人结肠癌发生发展过程中的作用, 并试图通过阻断细胞生长和增殖过程中的信号传导, 达到治疗结肠癌的目的.

相关报道

研究证实许多抑制肿瘤细胞生长和增殖的转录因子,其作用是通过降低cyclin D1表达来实现的。研究者发现Cdx1通过干扰cyclin D1转录,减少结肠癌细胞中cyclin D1的蛋白质水平,使细胞生长停滞于G₀/G₁期;而不表达Cdx1的变异株则无此作用。

表 1 MTT法检测cyclin D1 siRNA对HT-29细胞增殖的影响(mean ± SD, n = 5)

	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	70 h
对照组	0.043 ± 0.003	0.200 ± 0.005	0.391 ± 0.017	0.497 ± 0.011	0.631 ± 0.009	0.765 ± 0.006	0.866 ± 0.021
sense组	0.042 ± 0.004	0.198 ± 0.005	0.401 ± 0.006	0.512 ± 0.031	0.614 ± 0.011	0.733 ± 0.009	0.835 ± 0.017
antisense组	0.041 ± 0.003	0.124 ± 0.004 ^b	0.206 ± 0.008 ^b	0.365 ± 0.050 ^b	0.516 ± 0.007 ^b	0.583 ± 0.010 ^b	0.676 ± 0.016 ^b

^bP<0.01 vs 对照组。

在酶联免疫检测仪上,使用595的波长进行检测,记录吸光值。以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.6 ³H-TdR掺入法实验检测细胞周期的变化: 转染24 h后,使用胰蛋白酶消化antisense组、sense组和对照组细胞。以每孔10⁴个细胞的密度将细胞接种于96孔板中,每组5孔,每孔加入2.0 μL的³H-TdR(3.7 × 10¹³ Bp/L)继续培养24 h。使用胰蛋白酶消化细胞,收集细胞。破膜后使用液体闪烁计数器测定³H-TdR渗入量的CPM值。

1.2.7 流式细胞技术检测细胞周期的改变: 细胞转染后48 h后,使用胰蛋白酶消化并收获antisense组、sense组和对照组细胞。用4℃预冷的700 mL/L乙醇固定1 h,然后使用PBS洗涤细胞3次。将细胞重悬于50 mg/L的PI染液(含20 g/L RNase)中,室温孵育1 h,使用流式细胞仪对细胞周期进行分析。

统计学处理 其他数据与最大值的比率定义为表达量。使用成组t检验对实验数值进行分析。

2 结果

2.1 免疫沉淀和蛋白质印迹法检测cyclin D1蛋白质表达 转染反义siRNA的antisense组细胞cyclin D1表达明显低于sense组和对照组。Image-Pro Plus图像分析显示: antisense组细胞cyclin D1的表达只有对照组的24.77%,而转染正义siRNA的sense组和对照组cyclin D1表达相似(图1A-B)。

2.2 MTT比色法检测细胞增殖 开始检测时, antisense组、对照组和sense组细胞吸光度无差别(P>0.05)。从12 h开始, antisense组细胞的吸光度显著低于对照组和sense组(P<0.01)。在此后的每一个检测时间,即24、36、48和72 h, antisense组细胞的吸光度均显著低于对照组和sense组(P<0.01)(表1, 图2)。

2.3 ³H-TdR掺入实验检测细胞增殖 对照组和sense组24 h的³H-TdR掺入量分别为1798.4 ± 55.36和1851.4 ± 83.46,而antisense组细胞24 h的³H-TdR掺入量为1181.8 ± 117.97,较对照组和

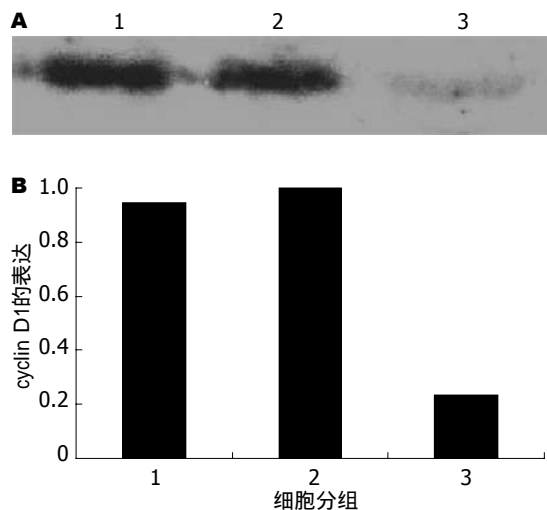


图 1 免疫沉淀和蛋白质印迹法检测RNA干扰对HT-29细胞cyclin D1表达影响。1: 对照组; 2: sense组; 3: antisense组。

表 2 流式细胞技术检测cyclin D1 siRNA对HT-29细胞周期的影响(mean ± SD, n = 5)

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	60.87 ± 5.23	26.42 ± 4.65	12.91 ± 3.13
sense组	59.14 ± 8.67	27.93 ± 3.64	13.93 ± 2.65
antisense组	79.31 ± 7.34 ^b	13.67 ± 4.32 ^b	7.32 ± 1.65 ^b

^bP<0.01 vs 对照组和Sense组。

sense组明显减少(P<0.01)。对照组和sense组24 h的³H-TdR掺入量无差别(P>0.05)(图3)。

2.4 流式细胞技术检测细胞周期的改变 正常细胞组即对照组细胞有60.87%处于G₀/G₁期, 26.42%处于S期, sense组细胞有59.14%处于G₀/G₁期, 27.93%处于S期, 而转染反义siRNA的antisense组细胞有79.31%处于G₀/G₁期, 13.67%处于S期。与对照组和sense组相比, 处于G₀/G₁期的细胞和处于S期的细胞, 均有显著性差异(P<0.01, 表2, 图4)。

3 讨论

在细胞周期中, G₁到S期的转变非常重要。细胞一旦从G₁期跨入S期就可以不再依靠外来信

创新盘点

本文寻找到了高效阻断cyclin D1表达的基因序列和随之而来的系统化研究是对现有相关资料的补充。

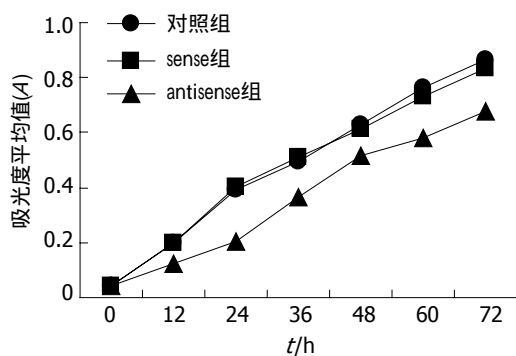


图2 MTT法检测cyclin D1 siRNA对HT-29细胞增殖的影响。

息的刺激而自动完成分裂过程。与G₁期相关的细胞周期素主要是cyclin D, 他包括三个亚型: D1、D2和D3, 其中D1和肿瘤细胞的关系最为密切。cyclin D1基因位于人染色体11q13上, 全长15 kb, 共5个外显子。cDNA全长4.2 kb, 编码295个氨基酸残基组成的蛋白质, 分子量为36 kDa^[24]。cyclin D1于G₁期最先合成, 形成cyclin D1-CDK4或cyclin D1-CDK6复合物, 激活CDK磷酸化底物pRB, 使之释放出结合的转录因子E2F, 促进DNA转录, 使细胞从G₁期进入S期, 从而促进细胞生长和增殖^[25]。目前已在多种肿瘤细胞内发现cyclin D1表达增多, 提示cyclin D1在肿瘤的发生过程中发挥重要作用。通过抑制其基因的表达达到抑制肿瘤生长的目的已经引起人们重视^[26]。

在现有抑制基因表达技术中, RNA干扰技术是被公认为最有效的手段。干扰RNA合成的方法有化学合成、体外转录、长片段双链RNA消化和体内表达等方法^[27-31]。其中化学合成法具有快捷, 方便, 使用剂量容易控制, 转染效果稳定, 可重复性强等优点。

本实验选择化学合成cyclin D1的siRNA对cyclin D1基因表达进行封闭, 观察cyclin D1蛋白质表达被部分封闭后, 结肠癌HT-29细胞生物学功能变化。转染cyclin D1的反义siRNA后, 使用免疫沉淀和蛋白质印迹法证实cyclin D1蛋白质表达明显下降, 只有对照组的24.77%。蛋白质是基因的最终表达产物, 此结果说明反义siRNA有效封闭了cyclin D1基因, 造成cyclin D1蛋白质质量的减少。cyclin D1-CDK4或cyclin D1-CDK6复合物可以促使细胞从G₁期进入S期, 完成分裂增殖。本实验试图观察cyclin D1表达被有效降低后, 细胞的生长增殖情况。MTT实验和³H-TdR渗入实验证实了cyclin D1降低会导致细胞活性和增殖能力的下降, 同时³H-TdR渗入实验还说明了生

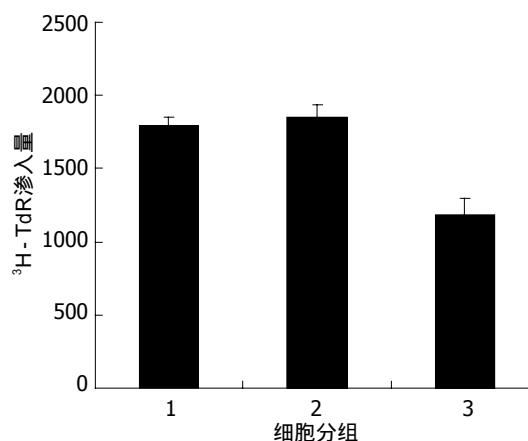


图3 ³H-TdR渗入实验检测cyclin D1 siRNA对HT-29细胞增殖的影响。1: 对照组; 2: sense组; 3: antisense组。

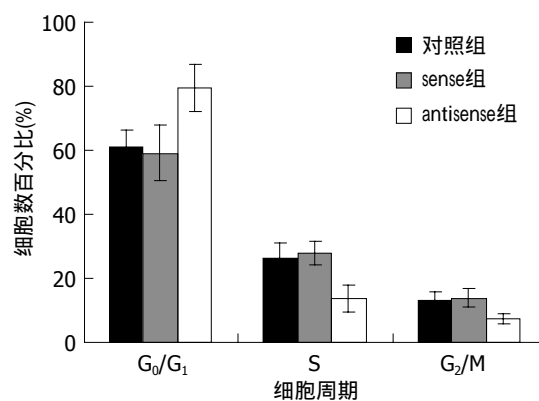


图4 流式细胞技术检测cyclin D1 siRNA对HT-29细胞周期的影响。

长代谢减慢与细胞从G₁进入S期受阻有关。本实验使用了流式细胞技术, 进一步明确转染siRNA细胞出现活性减低和增殖能力下降是因为在G₁期受阻。此结果和cyclin D1作用特点相符。总之, 本实验成功设计合成cyclin D1 siRNA, 转染后有效阻断cyclin D1表达并减弱结肠癌细胞的生长增殖明显, 出现细胞周期停滞。一方面进一步验证cyclin D1是细胞周期进展中的关键信号分子, 发挥重要生物学功能。另一方面证实, 封闭cyclin D1表达可以抑制结肠癌增殖, 为肿瘤的基因治疗开辟一条新思路。

4 参考文献

- 1 Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145: 5439-5447
- 2 Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299: 35-55
- 3 Baker GL, Landis MW, Hinds PW. Multiple functions of D-type cyclins can antagonize pRB-mediated suppression of proliferation. *Cell Cycle* 2005; 4: 330-338
- 4 Gladden AB, Diehl JA. Location, location, location:

应用要点
本文针对肿瘤细胞生长周期进行抑制, 达到治疗肿瘤生长增殖的目的, 为类似的研究打下基础, 提供了新思路。高效的siRNA序列将来可以用来进行动物实验和临床前期实验, 并可以试验用于其他肿瘤细胞。

同行评价
本文图文并茂,层次清楚,有一定的可读性和参考价值。

- the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* 2005; 96: 906-913
- 5 Rampalli S, Pavithra L, Bhatt A, Kundu TK, Chattopadhyay S. Tumor suppressor SMAR1 mediates cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/histone deacetylase 1 complex. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8415-8429
- 6 Zhang ZK, Davies KP, Allen J, Zhu L, Pestell RG, Zagzag D, Kalpana GV. Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5975-5988
- 7 Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1010-1016
- 8 Zhang YJ, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Polymorphisms in cyclin D1 gene and hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2002; 33: 125-129
- 9 Xu JM, Wen JM, Zhang M, Lu GL, Wu LZ, Wang WS. A study of gene amplification and expression of cyclin D1 in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2004; 33: 26-30
- 10 Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3107-3110
- 11 Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu SH, Harris CC, Montesano R, Weinstein IB. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 9026-9030
- 12 Nakagawa H, Zukerberg L, Togawa K, Meltzer SJ, Nishihara T, Rustgi AK. Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 541-549
- 13 Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-2983
- 14 Gramlich TL, Fritsch CR, Maurer D, Eberle M, Gansler TS. Differential polymerase chain reaction assay of cyclin D1 gene amplification in esophageal carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 255-259
- 15 Huang L, Lang D, Geradts J, Obara T, Klein-Szanto AJ, Lynch HT, Ruggeri BA. Molecular and immunochemical analyses of RB1 and cyclin D1 in human ductal pancreatic carcinomas and cell lines. *Mol Carcinog* 1996; 15: 85-95
- 16 Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994; 54: 1812-1817
- 17 Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J, Cardesa A. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4813-4817
- 18 Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Neri G. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 175-180
- 19 Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurung E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 1996; 12: 1747-1753
- 20 Hochhauser D, Schnieders B, Ercikan-Abali E, Gorlick R, Muise-Helmericks R, Li WW, Fan J, Banerjee D, Bertino JR. Effect of cyclin D1 overexpression on drug sensitivity in a human fibrosarcoma cell line. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1269-1275
- 21 Reissmann PT, Koga H, Figlin RA, Holmes EC, Slamon DJ. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 61-70
- 22 Lynch J, Keller M, Guo RJ, Yang D, Traber P. Cdx1 inhibits the proliferation of human colon cancer cells by reducing cyclin D1 gene expression. *Oncogene* 2003; 22: 6395-6407
- 23 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 24 Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991; 65: 691-699
- 25 Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-1065
- 26 Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer* 2003; 41 Suppl 1: S155-S161
- 27 Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 505-508
- 28 Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002; 32: 107-108
- 29 Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002; 8: 1454-1460
- 30 Kawakami S, Hashida M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22: 142-151
- 31 Natt F. siRNAs in drug discovery: target validation and beyond. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9: 242-247

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞

俞瑞珺, 刘海林

俞瑞珺, 刘海林, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科 上海市 200011

俞瑞珺, 2007届上海交通大学硕士, 内科住院医师, 主要从事肝硬化及肝细胞移植的研究。

通讯作者: 刘海林, 200011, 上海制造局路639号, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科. liuhailin@medmail.com.cn
电话: 021-53078068

收稿日期: 2007-07-16 修回日期: 2007-11-10

Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells *in vitro*

Rui-Jun Yu, Hai-Lin Liu

Rui-Jun Yu, Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China

Correspondence to: Dr. Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, 639 Zhizaoju Road, Shanghai 200011, China. liuhailin@medmail.com.cn

Received: 2007-07-16 Revised: 2007-11-10

Abstract

AIM: To induce hepatocyte-like cells from mouse bone marrow mesenchymal stem cells, and improve their differentiation rate *in vitro*.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were collected from C57 mice, and cultured in differentiation medium including HGF, FGF4, EGF, OSM, Dex and ITS. Expression of hepatocyte specific genes, such as AFP, Alb, CK18, TAT and CYP2b9 was detected by RT-PCR. Cells expressing Alb and CK18 proteins were identified by immunofluorescence staining and flow cytometry.

RESULTS: In the differentiation group, some polygonal cells appeared on day 3 in culture, cobblestone-shaped epithelial-like cells appeared after 5 to 7 days and increased in number until day 14, while control group cells retained their spindle morphology. AFP, Alb and CK18 mRNA could be detected on days 7, 14 and 21. TAT and CYP2b9 mRNA were also detected on days 14 and 21. However, Alb, CK18, TAT and

CYP2b9 mRNAs were not detected in the control group, and only low levels of AFP mRNA were detected. In the differentiation group, Alb protein was detected by immunofluorescence on days 7, 14 and 21. The percentages of cells that were Alb-positive were 75.0%, 79.7% and 81.1% on days 7, 14, 21 respectively, and the percentages that were CK18-positive were 71.4%, 75.9% and 80.6%, respectively.

CONCLUSION: Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*, which provides a solid experimental basis for hepatocyte transplantation.

Key Words: Differentiation; Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatocyte; Growth Factor

Yu RJ, Liu HL. Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3577-3582

摘要

目的: 体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化(BMSCs)为肝样细胞, 提高分化效率。

方法: 将第一代BMSCs随机分为诱导组 and 对照组。诱导组加肝细胞生长因子、成纤维生长因子、表皮生长因子、抑瘤素M等进行诱导培养, 观察细胞形态, 检测甲胎蛋白(AFP)、白蛋白(Alb)、细胞角蛋白18(CK18)、酪氨酸氨基转移酶(TAT)和细胞色素P450 2b9(CYP2b9)的mRNA表达, Alb合成以及Alb和CK18蛋白标记细胞阳性率。

结果: 诱导组第3天出现多边形细胞, 5-7 d上皮样细胞呈岛状分布, 14 d呈铺路石状。对照组细胞为长梭形。第7, 14, 21天, 诱导组细胞AFP, Alb, CK18 mRNA和Alb蛋白检测阳性; 第14, 21天, 细胞表达TAT和CYP2b9 mRNA。对照组除AFP mRNA呈弱阳性外, 其余均为阴性。第7, 14, 21天, 诱导组CK18阳性率分别为71.4%, 75.9%, 80.6%; Alb阳性率分别为75.0%, 79.7%, 81.1%。而对照组第7天CK18和Alb阳性率仅2.3%, 1.7%, 与诱导组相比有显著差异。

背景资料
缺乏足量的、具有良好生物学特性的肝细胞是阻碍肝细胞移植治疗在临床中得以实行的关键原因之一。BMSCs采集方便, 容易培养, 能大量扩增, 具有多向分化潜能等特性, 使其可能成为肝细胞移植所需的细胞重要来源途径之一。

研发前沿
研究领域中的热点、重点主要集中在如何有效的诱导BMSCs具有肝脏细胞特性。亟待研究的问题主要是提高BMSCs的诱导效率、诱导后细胞的纯度,保证诱导扩增后能提供足够数量的细胞,同时能保持良好的肝细胞特性。

($P_{CK18} = 1.97 \times 10^{-5}$, $P_{Alb} = 3.08 \times 10^{-6}$).

结论: BMSCs在体外可以被诱导分化为肝样细胞,诱导率最高可达80%以上。

关键词: 诱导分化; 骨髓间充质干细胞; 肝细胞; 生长因子

俞瑞琨, 刘海林. 体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3577-3582
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3577.asp>

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是成体干细胞中最易获得的干细胞之一,具有多向分化潜能^[1-4],并且采集方便、容易培养、增殖能力强、性质稳定^[5],适合自体移植^[6-9].研究表明BMSCs可以分化为上皮样细胞^[10-11],如肺泡上皮支气管上皮细胞^[12-13]、皮肤^[14]、肾^[15]、胰腺^[16]和胃肠^[17]等.在适当条件下可以向肝脏细胞分化^[18-28],移植入体内可改善肝功能^[29-30].但对提高诱导分化的效率和稳定性尚有待进一步研究.我们选择在肝脏细胞发育成熟过程中发挥关键性作用的细胞因子肝细胞生长因子(HGF)、成纤维生长因子4(FGF4)、抑瘤素M(OSM)、表皮生长因子(EGF)组成诱导体系,对体外培养的BMSCs进行定向诱导,通过观察细胞形态变化,检测肝细胞相关标志如甲胎蛋白(AFP)、白蛋白(Alb)、细胞角蛋白18(CK18)、酪氨酸氨基转移酶(TAT)、细胞色素P4502b9(CYP2b9)的表达,评价其诱导BMSCs分化为肝细胞的效率,为开展肝细胞移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 1周龄C57小鼠(上海中科院实验动物中心), Ficoll分离液(Pharmacia公司), L-DMEM培养液(Gibco公司), MCDB-201培养液(Sigma公司), HGF(R&D systems公司), FGF4(R&D systems公司), OSM(R&D systems公司), EGF(Chemicon international公司), ITS(Gibco公司), Alb抗体(Rockland 公司), TRIzol试剂盒(Sigma-Aldrich公司), TaKaRa RNA PCR试剂盒(Biotech公司), RT-PCR引物(上海生工生物工程公司合成), CK18(Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs标本的分离培养和诱导: 从C57小鼠股骨和胫骨获取骨髓细胞, Ficoll分离液密度

梯度离心900 g, 30 min. 收集单个核细胞, PBS洗涤2次, 台盼兰染色、计数, 按密度 $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于培养皿, 加入基础培养液, 37℃、50 mL/L CO₂, 饱和湿度培养. 将第一代BMSCs, 以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于培养皿中, 随机分为诱导组和对照组. 对照组为基础培养液(L-DMEM, 含100 mL/L胎牛血清、NaHCO₃、L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素), 诱导组培养液为540 g/L L-DMEM, 360 g/L MCDB-201, 其他同基础培养液, 另加20 μg/L HGF, 20 μg/L FGF4, 10 μg/L EGF, 20 μg/L OSM, 10^{-8} mol/L地塞米松和1×ITS(胰岛素铁硒传递蛋白)。

1.2.2 形态学观察: 应用倒置相差显微镜, 每天观察细胞的生长情况和形态特征变化. 免疫细胞化学: 细胞爬片, 丙酮固定5 min, 羊血清封闭30 min, 加兔抗鼠的Alb抗体, 4℃过夜, 加FITC标记抗兔二抗, 37℃孵育30 min, 900 mL/L的丙三醇封片, 荧光显微镜观察。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应: 采用TRIzol试剂盒分别提取细胞和小鼠肝组织总RNA, TaKaRa RNA PCR试剂盒进行RT-PCR反应. 逆转录反应体系由MgCl₂ 4 μL, 10×RNA Buffer 2 μL, RNase Free双蒸水7.5 μL, dNTP 2 μL, 逆转录酶1 μL, Oligo dT-Adaptor primer 1 μL, RNase inhibitor 0.5 μL, RNA样品2 μL组成, 30℃ 10 min, 42℃ 60 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min. PCR反应体系由MgCl₂ 1.6 μL, 10×RNA PCR Buffer 2 μL, 灭菌蒸馏水14.05 μL, TaKaRa Taq 0.25 μL, dNTP 0.5 μL, cDNA 1 μL, 上游引物0.3 μL, 下游引物0.3 μL组成, 94℃ 3 min变性, 然后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 72℃ 5 min终止反应. 反应产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, GIS-2800凝胶图像处理系统测定mRNA水平. 引物序列见表1。

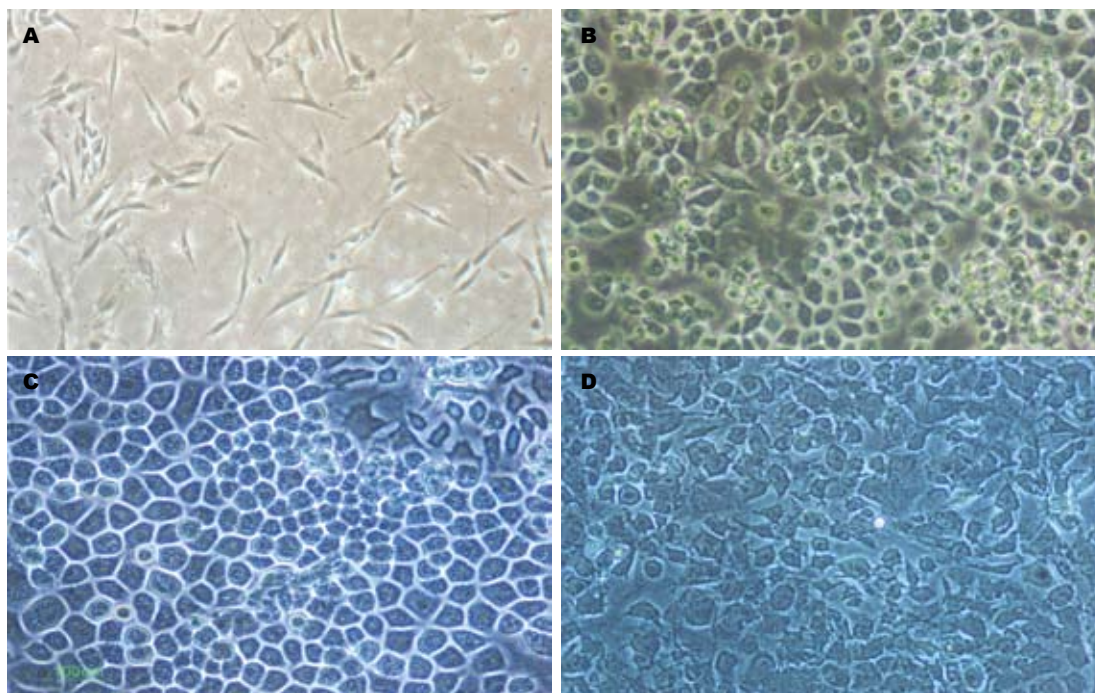
1.2.4 流式细胞仪检测: 制备细胞数量为 0.5×10^6 单细胞悬液, 加入1.5 mL Eppendorf管中, 1 g/L Triton破膜1 min, PBS洗涤, 用100 μL含40 mL/L FCS的PBS重新悬浮, 分别加入CK18, Alb抗体各10 μL, 4℃孵育30 min, PBS冲洗, 沉淀细胞用100 μL含40 mL/L FCS的PBS重新悬浮, 分别加入藻红蛋白(PE)标记的羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗各5 μL, 4℃孵育30 min, PBS冲洗, 流式细胞仪检测. 每组测定3个样本, 取平均值。

统计学处理 数据用mean±SD表示, 双样本等方差t检验进行比较, $P < 0.01$ 为有显著性差异。

表 1 RT-PCR引物序列

基因Gene	正向引物Sense primer	反向引物Reverse primer	产物大小Product size(bp)
Alb	GCATGAAGTTGCCAGAAGACATCC	TCTGCAGTTTGCTGGAGATAGTCG	412
CK18	CGATACAAGGCACAGATGGA	CTTCTCCATCCTCCAGCAAG	177
AFP	GTGAAACAGACTTCCTGGTCCT	GCCCTACAGACCATGAAACAAG	148
TAT	GACGAGGAAGGCTTTGTGAG	CTTCATGGCTTGGGTCAC TT	315
CYP2b9	GATGATGTTGGCTGTGATGC	CTGGCCACCATGAAAGAGTT	152
β -actin	CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC	AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC	587

相关报道
研究表明BMSCs在HGF、OSM、FGF、EGF等细胞因子的作用下,可以向肝细胞分化。但对BMSCs向肝细胞分化效率研究甚少。Shi *et al*的报道显示BMSCs分化的比例只有69.45%,分化效率低。因此,在BMSCs纯度、诱导方案等方面还需进一步研究,以提高诱导效率。

图 1 BMSCs细胞形态学($\times 40$). A: 第一代BMSCs; B: 诱导7 d; C: 诱导14 d; D: 诱导21 d.

2 结果

2.1 细胞形态学 未诱导的对照组第一代BMSCs呈梭形或成纤维样。诱导组第3天,细胞变小,出现多边形细胞;第7天出现类圆形、多角形,形成岛状铺路石;第14天细胞呈典型的铺路卵石状;第21天,细胞排列混乱,局部细胞形态不规则、边界不清(图1)。

2.2 白蛋白免疫荧光细胞化学染色 BMSCs在诱导第7, 14, 21天诱导组细胞Alb染色均为阳性,第21天,可见双细胞核和多细胞核现象。而对照组细胞Alb染色为阴性(图2)。

2.3 逆转录-聚合酶链反应 BMSCs诱导7 d Alb, CK18, AFP等mRNA表达阳性;诱导14, 21 d, Alb, CK18, AFP, TAT, CYP2b9等mRNA表达阳性。未诱导BMSCs除AFP的mRNA弱阳性外,其余的均为阴性;肝组织Alb, CK18, AFP, TAT和CYP2b9等mRNA表达均阳性(图3)。

2.4 流式细胞仪检测诱导细胞 BMSCs诱导组第7, 14, 21天, CK18蛋白表达阳性率分别为 $71.4\% \pm 5.0\%$, $75.9\% \pm 2.2\%$, $80.6\% \pm 2.1\%$; Alb蛋白表达阳性率分别为 $75.0\% \pm 3.3\%$, $79.7\% \pm 3.0\%$, $81.1\% \pm 3.0\%$, 对照组第7天, CK18和Alb蛋白表达阳性率分别为 $2.3\% \pm 1.2\%$, $1.7\% \pm 0.9\%$ 。与诱导组相比, 均 $P < 0.001$ ($P_{CK18} = 1.97 \times 10^{-5}$, $P_{Alb} = 3.08 \times 10^{-6}$, t 检验), 有非常显著的差异。

3 讨论

在肝脏发育过程中,需要经过几个阶段,每个阶段参与的细胞因子不同。哺乳动物从胚胎发育到5-7体节期开始,相当于人类胚胎发育的第4周左右。在邻近的心源中胚层细胞产生的FGF作用下,前肠内胚层末端腹侧壁上皮增生至14-20体节期形成一个向外突出的肝原基,并在其他生长因子(如骨形成蛋白)的共同作用下,

创新盘点

以往相关研究主要以原代的BMSCs为主. 本文利用传代的、经过纯化的BMSCs. 在文献报道HGF, OSM, FGF, EGF联合诱导方案的基础上, 调整了相关诱导因子的用量, 提高了BMSCs向肝细胞分化的诱导效率.

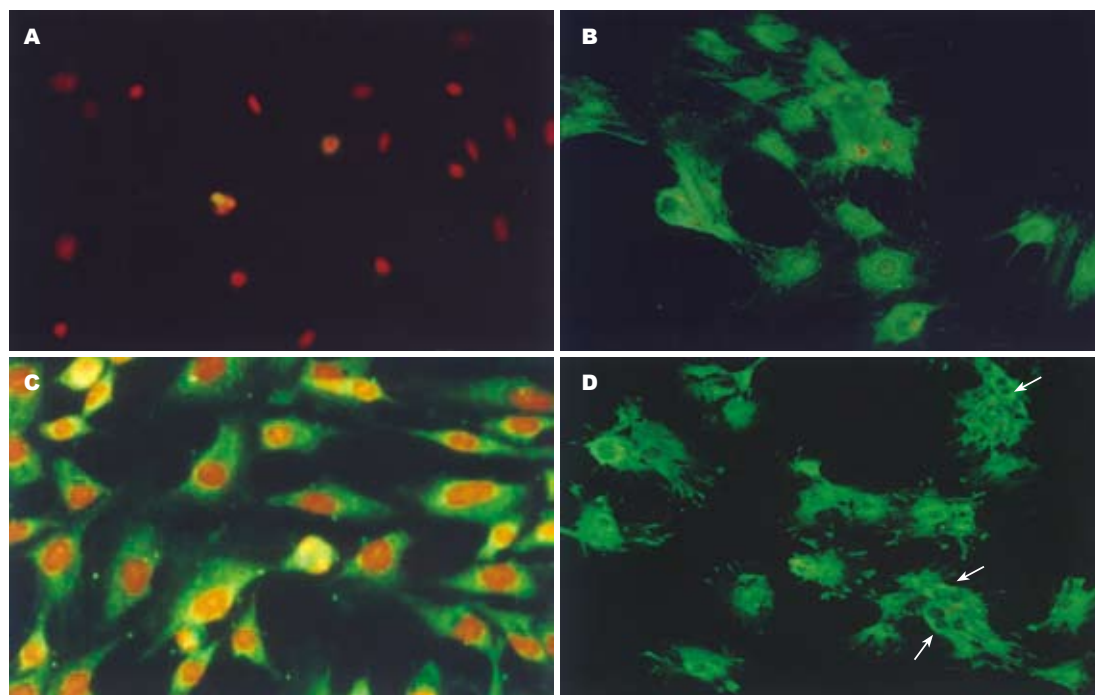


图2 肝样细胞特异性免疫荧光检测($\times 40$). A: 未诱导的BMSCs; B: 诱导7 d; C: 诱导14 d; D: 诱导21 d.

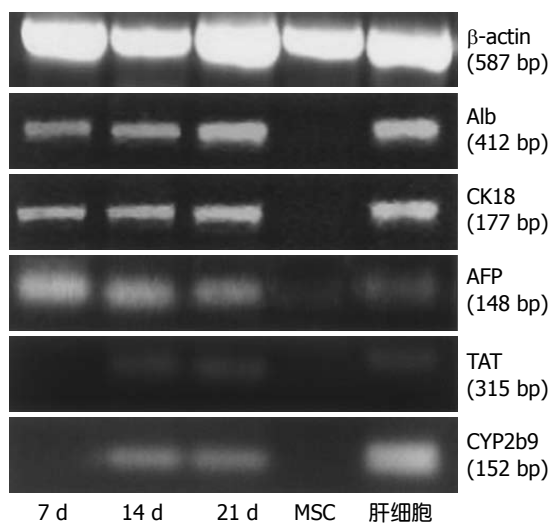


图3 不同时间 β -actin, Alb, CK18, AFP, TAT和CYP2b9 mRNA的表达.

完成肝脏的早期发育决定. FGF不仅能促进细胞生长和分裂, 也是形态发生和分化的诱导因子^[31-34]. 在肝脏成熟和终末分化阶段, HGF, OSM以及糖皮质激素和血管内皮细胞等都起着重要作用^[35-38].

HGF主要由Kupffer细胞和肝窦内皮细胞产生, 是肝细胞最强的促有丝分裂原, 并且在出生后对肝细胞的继续发育成熟发挥作用. 在地塞米松存在情况下, HGF可以促进肝脏葡萄糖6-磷酸酶、酪氨酸氨基转移酶、氨基甲酰磷酸合成

酶等表达及糖原合成^[39]. OSM是肝干细胞分化成熟的强力诱导因子, 能促使肝细胞表达分化标志物酪氨酸氨基转移酶等, 引起细胞形态学变化, 上调肝细胞的特异功能(如氨清除、脂肪合成、糖原合成和解毒功能), 增强同种细胞之间黏附等^[40]. OSM在胎肝中由CD45⁺造血细胞旁分泌, 通过OSM受体激活信号传导和转录激活因子3途径发挥生物学效应^[41]. 糖皮质激素对OSM具有强烈的协同和促进作用. EGF促进上皮细胞增殖和分化, 对肝脏的发育成熟以及再生有明显促进作用^[42].

我们选择肝脏细胞发育成熟过程中发挥关键性作用的细胞因子HGF, FGF4, OSM和EGF等作为诱导因素, 结果表明能够有效诱导BMSCs分化为肝样细胞, 合成Alb, 表达肝细胞的相关标志物AFP, CK18, TAT和CYP2b9.

AFP是内胚层分化和早期胚胎肝细胞的标志性蛋白质, 随着肝脏的发育成熟, 其表达逐渐降低. CK18为肝细胞中间丝细胞骨架, 从胚胎肝细胞开始到分化的肝细胞持续表达. 合成Alb则是肝细胞特有的功能. TAT是围产期和出生后肝细胞特异性分化的一个主要的标志酶, CYP2b9在肝细胞具有相对特异性表达. 两者均为成熟肝细胞的标志. 这些指标能够反映肝细胞的特异性功能和结构成分, 具有良好的代表性^[43-45]. 因此, 我们采用联合检测作为判断诱导

分化为肝细胞的依据. 在诱导分化过程中, 与体内肝脏发育过程相似. 首先检测到AFP等早期标志物的表达, 14 d后再出现TAT, CYP2b9等代表肝细胞成熟期的标志物. 而未诱导的BMSCs只有AFP mRNA表达呈弱阳性, 与文献[46]报道一致.

诱导前及未诱导组BMSCs细胞形态为长梭形, 类似成纤维细胞^[47-48]. 诱导后细胞形态转变为多角形, 生长速度加快, 达到融合时细胞呈典型的铺路石状排列, 并在诱导21 d的时候观察到双细胞核和多细胞核现象, 符合肝细胞在体外培养时的细胞形态变化^[25,49]. 关于这些细胞是否由骨髓中所含的极少量内皮细胞增殖而来, 我们认为基本可以排除, 因为体外内皮细胞的生长以及大量扩增需要特定的内皮细胞培养环境, 而且经联合检测肝细胞特异性的结构和功能标志物均为阳性.

通过流式细胞仪检测CK18和Alb蛋白阳性细胞数, 在诱导第21 d阳性细胞分别为80.6%和81.1%, 高于同类实验^[50]. 这可能与BMSCs经过淋巴分离液密度梯度离心和差速贴壁法培养得到进一步纯化有关^[51-53].

我们采用的诱导方法能够在体外将BMSCs成功地诱导为肝样细胞, 并使诱导率有所提高, 从而为今后进一步开展BMSCs诱导分化为肝细胞以及肝细胞移植奠定了实验基础.

4 参考文献

- 1 Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67-73
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 3 Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 507-520
- 4 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- 5 Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-294
- 6 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395
- 7 Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-316
- 8 Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 209-214
- 9 Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584
- 10 Paunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, Tanasie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Ruster B, Bistran R, Seifried E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 502-508
- 11 Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2397-2402
- 12 Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8407-8411
- 13 Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188
- 14 Kataoka K, Medina RJ, Kageyama T, Miyazaki M, Yoshino T, Makino T, Huh NH. Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. *Am J Pathol* 2003; 163: 1227-1231
- 15 Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasarah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001; 195: 229-235
- 16 Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 519-526
- 17 Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 492-509
- 18 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 19 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 20 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 21 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 22 Li W, Liu SN, Luo DD, Zhao L, Zeng LL, Zhang SL, Li SL. Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bone-marrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4866-4869
- 23 Ong SY, Dai H, Leong KW. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12:

应用要点
本文通过对BMSCs的纯化, 诱导体系的调整, 提高BMSCs诱导成肝样细胞的诱导效率, 提高细胞的纯度, 能为将来肝细胞移植治疗提供科学基础.

同行评价
本文表述清晰, 设计合理, 结果可信, 具有一定的可读性。

- 3477-3485
- 24 Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2394-2397
- 25 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 26 Cai YF, Zhen ZJ, Min J, Fang TL, Chu ZH, Chen JS. Selection, proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3308-3312
- 27 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003; 39: 17-23
- 28 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
- 29 Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56: 405-415
- 30 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 31 周庆军, 邵健忠, 项黎新, 张铭, 陆永良, 姚行, 戴利成. 胚胎干细胞分化为肝细胞的研究进展. *生物工程学报* 2005; 21: 171-176
- 32 Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003
- 33 Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DY. Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development* 2007; 134: 2041-2050
- 34 Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000; 127: 1563-1572
- 35 Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999; 18: 2127-2136
- 36 Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 797-819
- 37 Duncan SA. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev* 2003; 120: 19-33
- 38 Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Luo J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 2003; 11: 55-75
- 39 Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-94
- 40 Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 177-183
- 41 Ito Y, Matsui T, Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 2000; 32: 1370-1376
- 42 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66
- 43 Jin DK, Vacher J, Feuerman MH. alpha-Fetoprotein gene sequences mediating Afr2 regulation during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8767-8772
- 44 Chou JY. Regulators of fetal liver differentiation *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263: 378-386
- 45 Shelly LL, Tynan W, Schmid W, Schutz G, Yeoh GC. Hepatocyte differentiation *in vitro*: initiation of tyrosine aminotransferase expression in cultured fetal rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1989; 109: 3403-3410
- 46 何念海, 赵文利, 王宇明. 人胎儿骨髓间充质干细胞来源的类肝细胞的分子生物学鉴定. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1844-1848
- 47 Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301
- 48 Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274
- 49 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 50 Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res* 2005; 31: 223-231
- 51 金钧, 黄坚, 吴思荣, 惠国桢. 人骨髓间充质干细胞体外优化条件的研究. *苏州大学学报(医学版)* 2006; 26: 182-184
- 52 王俊芳, 罗永湘, 方煌, 陈安民. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外培养及初步鉴定. *实用外科杂志* 2006; 20: 160-162
- 53 胡亮, 董雅娟, 柏学进, 马保华, 杨恕玲, 淡新刚, 董方圆, 王雪红, 李建栋, 程明. 小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)的分离纯化及其定向诱导分化为神经样细胞. *中国兽医学报* 2006; 26: 696-700

编辑 李军亮 电编 马文华

早期胃癌的内镜下治疗

王成文, 金松杰

王成文, 金松杰, 北京大学深圳医院消化内科 广东省深圳市 518036
通讯作者: 王成文, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院消化内科. chengwen_@tom.com
收稿日期: 2007-03-13 修回日期: 2007-10-08

Endoscopic treatment of early gastric cancer

Cheng-Wen Wang, Song-Jie Jin

Cheng-Wen Wang, Song-Jie Jin, Department of Gastroenterology, Beijing University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China
Correspondence to: Cheng-Wen Wang, Department of Gastroenterology, Beijing University Shenzhen Hospital, 1120 Lianhua Road, Futian District, Shenzhen 518036, Guangzhou Province, China. chengwen_@tom.com
Received: 2007-03-13 Revised: 2007-10-08

Abstract

With the development of endoscopic techniques, more and more early gastric cancers can be treated endoscopically. The history of endoscopic treatment of early gastric cancer is introduced simply in this article. The characteristics, adaptations and complications associated with this technique are discussed. The method of endoscopic submucosal dissection (ESD) is described, since it is currently the most advanced method with which to treat early gastric cancer under an endoscope.

Key Words: Early gastric cancer; Endoscopic mucosal resection; Endoscopic submucosal dissection

Wang CW, Jin SJ. Endoscopic treatment of early gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3583-3586

摘要

随着内镜技术的不断进步,越来越多的早期胃癌可经内镜下治疗. 本文简要地介绍了早期胃癌内镜下治疗的发展史. 重点介绍了目前早期胃癌内镜下治疗最先进的方法-黏膜剥离术的特点、适应征、并发症及处理对策.

关键词: 早期胃癌; 内镜下黏膜切除术; 内镜下黏膜

剥离术

王成文, 金松杰. 早期胃癌的内镜下治疗. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3583-3586
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3583.asp>

0 引言

随着内镜诊断及治疗技术的不断提高,越来越多的早期胃癌被发现并在内镜下进行治疗. 由于内镜治疗的微创性,掌握好适应征可取得与开腹手术一样的治疗效果,已经引起人们的高度重视. 内镜治疗技术也从内镜下黏膜切除(endoscopic mucosal resection, EMR)更进一步发展为内镜黏膜下层剥离术^[1-7](endoscopic submucosal dissection, ESD). 可以预测,随着医疗水平的提高,早期胃癌的内镜下治疗将占有更重要的地位. 现将早期胃癌内镜下治疗技术作一综述.

1 内镜下治疗历史

早期胃癌内镜下治疗最初是从息肉切除术开始的. 1968年日本的常冈^[8], 1969年丹羽^[9]分别报告了内镜下胃息肉切除技术. 此后该技术在1960年代后期及1970年代逐渐普及,使隆起性病变可以在内镜下得到治疗,但对平坦型病变却无能为力. 直到1979年水岛 *et al*^[10]报告了激光疗法,使平坦型病变可以进行内镜下治疗. 但激光疗法是一种对组织进行凝固气化的破坏性疗法,因此无法取得病理组织切片,不能确定胃癌浸润深度,同时设备昂贵,术后再发率高. 为了对平坦型病变进行完整切除并取得病理组织切片,1980年代初出现了EMR. 1983年平尾 *et al*^[2]开发了ERHSE(endoscopic resection utilizing local injection of hypertonic saline-epinephrine solution),即用高渗盐水行黏膜下局部注射后,用针状切开刀切开病变周围黏膜,然后用圈套器将病变全部切除. 但因该技术操作困难,未能普及. 紧接着1984年多田 *et al*^[3]开发了黏膜大活检术(strip biopsy),即生理盐水局部黏膜下注射后,

背景资料

在可能的情况下,对患者进行微创治疗是医学的发展方向,也标志着医学发展的水平. 随着内镜技术的进步,越来越多的早期胃癌被发现并可经内镜下治疗. 本文就早期胃癌内镜下治疗的发展作一阐述.

研发前沿
目前本领域中的研究热点是应用IT刀(一种先端带绝缘层的刀)对病灶进行黏膜下剥离术(ESD),较黏膜切除术(EMR)更加进步,亟待研究的问题是内镜下切除适应征的问题。

使用双孔道内镜,一个孔道通过钳子把持提起病变,另一孔道通过圈套器将病变切除。该方法简便易行,很快在日本普及开来。这期间在EMR基础上,出现了多种新技术,如透明帽吸引法^[11-12](EMRC),结扎法^[13](EMRL)等,使这一时代成为EMR时代。但EMR最大的问题也是切除不完全,出现残留及复发。熊井 *et al*^[14]经过长期病例随访,其再发率可以达到5%-15%。同时对于大的病变,虽然可以进行分割切除,但对病理诊断造成困难,也容易残留。对于大病变(直径大于2 cm)能进行彻底治疗的强烈要求,需要新的工具及治疗方法的开发。在这种情况下,1998年细川 *et al*^[4]首先报道了用IT刀进行早期胃癌切除。这种IT刀是在针状切开刀的先端装上绝缘球,使黏膜切开剥离更加安全,为更大病变的治疗提供了有利武器。其后小野 *et al*^[6]应用IT刀进行黏膜下层剥离,确立了目前最先进的早期癌内镜治疗方法-ESD。几乎在同时或先后又开发研制了勾型切开刀(hook knife)^[15-18]及通过snare衍变而来的可伸缩性切开刀(flex knife)^[19-20]等,并产生了相应的ESD法。

2 内镜下早期胃癌治疗适应征

随着内镜治疗方法的不断改进,早期胃癌治疗的适应征也在不断的发生变化。日本于2001年制定了早期胃癌内镜下治疗适应征,并于2004年进行了修订^[21]。其EMR适应征的原则是:(1)几乎没有淋巴结转移可能的病变,(2)病灶能完全切除的病变。具体标准的适应征病变为:(1)病灶在2 cm以下,内镜诊断为m癌的病变,(2)组织分化型为高分化(pap, tub1, tub2),(3)凹陷型病变表面未形成溃疡。以上为标准适应征。

对标准适应征进行的临床观察显示^[21],该标准适应征可能过于严格,导致对一些病例进行了不必要的手术。同时随着ESD技术的开发,适应征不断扩大。不同作者使用不同的ESD技术总结了不尽相同的适应征。石后冈 *et al*^[22]采用S-ERHSE法的适应征为:(1)分化型黏膜内癌。如果表面未形成溃疡,则病变大小不受限制都可切除。(2)一般ERHSE法切除困难的病变(如直径大于2 cm,特殊部位),也是S-ERHSE的适应征。滨中 *et al*^[23]应用IT刀的适应征为:(1)黏膜内癌(内镜下无明显浸润征象)。(2)内镜下如无溃疡存在,则大小不受限制,如有溃疡则病变在3 cm以下。(3)病理为高分化型腺癌者。Gotoda *et al*^[24]对日本国立癌中心及癌研究会附属医院超过5000

例以上的早期胃癌手术资料的分析,确立了目前ESD的适应征为:(1)分化型黏膜内癌。如果表面未形成溃疡,则病变大小不受限制。(2)分化型黏膜内癌,如果表面已经形成溃疡,则病变直径大小在3 cm以下。(3)未分化型黏膜内癌,如果表面未形成溃疡,则病变直径大小在2 cm以下。(4)微小黏膜下浸润癌(500 nm以内)。如果病理组织学为分化型,没有溃疡形成及血管浸润,则病变直径大小在3 cm以下。以上也成为扩大适应征。

虽然比较明确的界定了EMR及ESD的适应征,但在实际的工作中,还要注意很多问题。术前要取得患者充分的理解并同意。术前正确的诊断特别是浸润深度的诊断,对治疗方法的选择尤为重要。并要对EMR及ESD治疗后的残留、复发及淋巴结转移情况做长期追踪研究,并与开腹与腹腔镜手术相对照。在日本多个中心正在对EMR及ESD扩大适应征治疗后的结果进行研究。最近已有日本学者通过内镜、X线等临床资料对内镜治疗适应征的扩大进行了报道^[25-27]。但仍有很多问题还需要进一步探讨:(1)对于适应征的高分化的黏膜内癌,溃疡(-),如果大小不受限制,则必须确定是否有小部分黏膜下浸润。(2)对于适应征的高分化的黏膜内癌,溃疡(+),直径3 cm以下,是否能明确黏膜内癌的诊断。(3)对于低分化型、直径2 cm以下的病变,是否适于ESD。(4)对于黏膜下层癌到底在多大范围可为适应征等。适应征是否适当,需要长期病例的观察。小山 *et al*^[28]通过对111例早期胃癌ESD后3年以上的追踪观察(包括标准适应征68例、扩大适应征43例),结果显示,去除其他病因死亡的病例,其3年生存率为100%。池原 *et al*^[29]对588例ESD后病例也进行了3年以上的观察,其中1例因病变范围大进行分割切除的病例出现局部复发,仍健在。只有3例因出现远处转移而死于胃癌,说明ESD有非常高的治愈率。

3 ESD的优缺点

ESD有以下优点:(1)对范围大的病变可整体切除,使病理诊断容易,可对病变浸润深度及有无血管侵犯做出正确判断。(2)因ESD为黏膜下层的剥离,理论上不会出现病灶残留及局部复发。(3)病变局部注射后不需要牵引、吸引。有溃疡斑痕的病变也可以切除。(4)对于黏膜大活检困难的部位,如小弯、后壁的病变也非常有效。

虽然ESD有很多优点,但缺点也不容忽视。其主要的缺点是操作技术比较复杂,要求熟练

程度高. 手术时间过长, 出血及穿孔率高, 即使经验丰富, 穿孔率也在3%-4%^[30-31].

4 ESD切除困难病例的特征、并发症及处理对策

小野 *et al*^[32]对353例早期胃癌ESD的资料进行分析, 认为病变范围大、伴有溃疡的病例, 以及病变部位位于胃上部及中部的病例, 切除困难. 贝濂满 *et al*^[33]也得出了类似结论. 现就ESD并发症及其处理对策, 分别叙述如下.

4.1 出血 (1)术中出血. ESD术中肯定会发生出血, 但一般都会通过止血处理而不影响手术. Tajiri *et al*^[34]根据胃壁黏膜血管网分布不同, 将出血部位分为胃窦部、胃体小弯及胃体前后壁三大区域. 胃窦部、胃体小弯血管密度低, 不易出血; 而胃体前后壁血管密度高, 则易发生出血. 对于细小血管的出血, 可直接通过IT刀电凝止血; 对于较粗大的血管(直径大于1 mm), 可用活检钳把持血管进行电凝, 可使血管烧灼、消失. 因出血使视野不清时, 先用清水冲洗, 明确出血部位, 一一明确进行止血. (2)术后出血. ESD术后出血多发生在2 wk内, 其发生率比EMR高, 特别是在ESD导入初期. 随着技术的提高, 发生率减少. 对于溃疡底的出血, 可用止血夹子, 也可以电凝止血, 但要注意过度凝固可能导致迟发性穿孔. 一般在行ESD第2天, 常规第二次检查, 对可能出血的部位进行处理.

4.2 穿孔 (1)术中穿孔. 一般都是在进行黏膜下剥离时发生, 黏膜切开时也可以发生. 从技术层面看, ESD初期发生率较高. 对于萎缩明显的大弯及小弯病变, 前切开时也可发生穿孔. 一旦穿孔发生, 应迅速使用银夹闭锁穿孔部位, 尽量少送气. 小的穿孔易闭锁, ESD可继续进行. 但大的穿孔出现大量气腹时, 可能出现生命体征异常, 应根据不同情况中止ESD, 改为EMR分割切除或外科手术^[35]. 在确认穿孔完全闭锁的情况下, 术后禁食2-3 d, 一般预后良好. 也有小的穿孔当时没有发现而形成气腹而出现腹痛、发热的情况^[36]. (2)迟发性穿孔. 主要由于穿透性烧灼、坏死区域脱落引起^[37], 发生率较低.

4.3 术中呼吸循环的管理 ESD治疗时间比较长, 平均时间在1 h左右, 最长可达4-6 h. 需镇静、呼吸循环监测, 保持血压大于80/60 mmHg, 血氧饱和度应在96%以上. 过度镇静血氧饱和度下降时, 应首先呼唤患者, 嘱深呼吸, 必要时吸氧, 使用拮抗剂. 手术时间长及镇静剂的使用偶可引起吸入性肺炎、褥疮、深部静脉血栓形成等.

年龄大合并动脉硬化者要注意脑梗塞及心肌梗塞的发生.

随着诊断技术的不断提高和完善, 健康体检人数的增加, 早期胃癌的发现率会越来越高. 为了患者的QOL, 要选择一个最适合的治疗方法, 即应尽可能地采用微创的治疗方法. 目前在日本国立癌中心, 早期胃癌的内镜下治疗已经超过了外科手术而成为了早期胃癌主要的治疗方法^[38]. 现在已经有将ESD与低创伤外科手术融合的趋势. 通常的做法是先行ESD, 对切除标本行病理组织学检查. 如判定淋巴结转移可能性大, 则再行淋巴结廓清的外科手术(如腹腔镜手术). 随着ESD技术的不断提高, 新的治疗工具的开发研制, 早期胃癌的内镜治疗必将步入一个新的台阶.

5 参考文献

- 1 竹腰隆男, 田尻久雄, 大橋計彦. 胃生検とpolypectomy標本診断の対比検討-Endoscopic double snare polypectomyの有用性について. 日本癌症治療学会雑誌 1980; 16: 395
- 2 平尾雅紀, 小林多加志, 長谷良志男. 胃の腫瘍性病変に対する内視鏡的切除法. *Gastroenterol Endosc* 1983; 25: 1942-1953
- 3 多田正弘, 村田誠, 村上不二夫. Strip-off biopsyの開発. *Gastroenterol Endosc* 1984; 26: 833-837
- 4 細川浩一, 吉田茂昭. 早期胃癌の内視鏡の胃粘膜切除術. 癌と化学療法 1998; 25: 476-483
- 5 長男明道. 早期胃癌EMRにおける切開剥離の位置づけ. 胃と腸 2004; 39: 15-22
- 6 小野裕之, 乾哲也, 山口裕一郎. 胃癌-内視鏡治療最先端. 胃と腸 2003; 38: 67-82
- 7 Hamanaka H, Gotoda T. Endoscopic Resection for Early Gastric Cancer and Future Expectations. *Digestive Endoscopy* 2005; 17: 275-285
- 8 常岡健二. 早期胃癌の内視鏡(1)現況と将来. 日本消化器内視鏡学会雑誌 1968; 57: 1173-1176
- 9 丹羽寛文. 第8回日本内視鏡学会関東地方会追加口演. *Gastroenterol Endosc* 1969; 11: 437
- 10 水島和雄, 原田一道, 奥村毅与志. YAGレーザーの臨床への応用. *Gastroenterol Endosc* 1979; 21: 1289
- 11 井上晴洋, 竹下公矢, 長浜雄志. 早期食道癌に対する内視鏡的切除法粘膜切除の実際. 胃と腸 1993; 28: 161-169
- 12 島居恵雄, 岸本浩之, 木尾山徹. 内視鏡的吸引粘膜切除法の開発-先端フードとスネアガイドチューブを用いた新方法. 日本消化器疾病学会雑誌 1993; 90: 723-728
- 13 増田勝紀, 藤崎順子, 鈴木博昭. Ligating deviceを利用した内視鏡粘膜的切除術(EMRL). 消化器内視鏡 1993; 5: 1215-1219
- 14 熊井浩一郎, 和田則仁, 阿部定範. 遺残. 再発をさせないための適応と手技-一括切除. 消化器内視鏡 1999; 11: 661-666
- 15 小山恒男. 食道EMR手技選択. 消化器内視鏡 2000; 12: 718-719
- 16 小山恒男, 菊池勇一, 宮田佳典. 食道癌に対するEMRの選択方法; 新しいEMR手技-Hooking EMR Methodの有用性. 臨床消化器内科 2001; 16: 1609-1615
- 17 Oyama T, Kikuchi Y. Aggressive endoscopic

应用要点
本文对早期胃癌内镜下治疗的应用有指导作用, 对推动内镜微创治疗有积极意义.

同行评价
本文整体结构较好, 早期胃癌的内镜下治疗叙述全面, 有一定的可读性和参考意义。

- mucosal resection in the upper GI tract-hook knife EMR method. *Min Invas Ther Allied Technol* 2002; 11: 291-295
- 18 小山恒男. Endoscopic Surgery切開剝離EMR-Hook ナイフを中心に. 日本メデイカルセンター出版, 2003
- 19 矢作值久, 藤城光弘, 角島值美. 早期胃癌に対する細径スネアを用いたEMRのコツ. 消化器内視鏡 2002; 14: 1741-1746
- 20 消化管内視鏡治療研究会. 切開剝離法導入マニュアル. 日本メデイカルセンター出版, 2003
- 21 日本胃癌学会. 胃癌治療ガイドライン, 第2版. 東京: 金原出版社, 2004: 6-9
- 22 石後岡正弘, 草間敬二, 内沢政英. 早期胃癌に対する切開剝離法の工夫-私はこうしているS-ERHSE法. 胃と腸 2004; 39: 44-45
- 23 濱中久尚, 後藤田卓志, 横井千寿. 早期胃癌に対する切開剝離法の治療成績と問題点. ITナイフ. 胃と腸 2004; 39: 27-34
- 24 Gotoda T, Yanagisawa A, Sasakom. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer. The estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3: 219-225
- 25 滝沢耕平, 下田忠和, 中西幸浩. 早期胃癌に対する切除の適応拡大. 未分化型腺癌について. 胃と腸 2006; 41: 9-17
- 26 浜田勉, 齊藤聡, 近藤健司. 胃癌治療ガイドラインの適応外病変となる早期胃癌の診断. X線診断. 胃と腸 2006; 41: 19-29
- 27 胃癌治療ガイドラインの適応外病変となる早期胃癌の診断. 胃と腸 2006: 41
- 28 小山恒男, 田中雅樹, 友利彰寿. 早期胃癌に対するESD治療の予後. 術後3年以上の成績. 胃と腸 2006; 41: 87-90
- 29 池原久朝, 後藤田卓志, 小田一郎. 早期胃癌ESD後の長期経過の検討. 胃と腸 2006; 41: 91-98
- 30 矢作值久, 藤城光弘, 角島值美. 早期胃癌に対する切開剝離法の治療成績と問題点. 胃と腸 2004; 39: 39-43
- 31 後藤田卓志, 濱中久尚, 小田一郎. 偶発症とその対策-特に出血と穿孔. 消化器内視鏡 2004; 16: 729-735
- 32 小野裕之, 乾哲也, 蓮池典明. 早期胃癌に対するESD切除成績と切除困難例の特徴. 胃と腸 2006; 41: 37-44
- 33 貝瀬満, 山崎琢士, 仲吉隆. 早期胃癌に対するESD切除成績と切除困難例の特徴. 胃と腸 2006; 41: 45-51
- 34 Tajiri H, Kitano S. Complications associated with endoscopic mucosal resection: Definision of bleeding that can be viewed as accidental. *Digestive Endoscopy* 2004; 16: 5134-5136
- 35 赤松泰次, 横澤秀一, 金子靖典. 続行か, 勇気ある撤退か? 消化器内視鏡 2006; 18: 147-153
- 36 田辺聡, 佐佐木徹, 木道口勝彦. 早期胃癌に対するESDによる偶発症の現状とその対策. 全身管理循環動態も含めて. 胃と腸 2006; 41: 67-74
- 37 豊永高史. 偶発症とその対策-手技的なものを中心に. 消化器内視鏡 2005; 17: 639-649
- 38 Hamanaka H, Gotoda T. Endoscopic resection for early gastric cancer and future expectations. *Digestive Endoscopy* 2005; 17: 275-285

编辑 王晓瑜 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

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

骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究进展

胡国华, 沈来根

胡国华, 沈来根, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普通外科
浙江大学邵逸夫临床医学研究所 浙江省杭州市 310016
通讯作者: 沈来根, 310016, 浙江省杭州市, 浙江大学医学院附
属邵逸夫医院普通外科. huguo2873@163.com
收稿日期: 2007-07-23 修回日期: 2007-11-02

Progress in research of treatment of liver fibrosis with mesenchymal stem cells

Guo-Hua Hu, Lai-Gen Shen

Guo-Hua Hu, Lai-Gen Shen, Sir Run Run Shaw Institute of Clinical Medicine, Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Lai-Gen Shen, Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China. huguo2873@163.com

Received: 2007-07-23 Revised: 2007-11-02

Abstract

Mesenchymal stem cells, a type of multipotent stem cells, can differentiate into hepatocytes. Recently, more and more studies have shown that mesenchymal stem cells are anti-fibrotic and immune-tolerant when transplanted into liver fibrosis models, which brings about a new treatment strategy for liver fibrosis and cirrhosis.

Key Words: Mesenchymal stem cells; Liver fibrosis; Cell therapy; Gene therapy

Hu GH, Shen LG. Progress in research of treatment of liver fibrosis with mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3587-3591

摘要

骨髓间充质干细胞是一种多能干细胞,具有分化成肝细胞的潜力. 近年研究表明,骨髓间充质干细胞还具有很强的抗肝纤维化的作用,并且不发生同种异体移植排斥反应. 这为肝纤维化、肝硬化的治疗带来了新的策略.

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝纤维化; 细胞替代治疗; 基因治疗

胡国华, 沈来根. 骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3587-3591
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3587.asp>

0 引言

肝纤维化、肝硬化是多种慢性肝脏疾病的终末期病理表现,目前传统的治疗手段难以从根本上修复肝脏的不可逆变化^[1-3]. 肝脏原位移植是治疗各种终末期肝病的有效方法,但是由于供体来源不足、操作复杂、移植后免疫排斥、治疗费用昂贵等问题,限制了临床肝移植的发展^[4-5]. 随着细胞移植技术的成熟,肝细胞移植治疗有望从根本上治疗肝脏疾病. 而干细胞方面的研究为解决肝细胞来源问题带来了希望.

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我增殖和分化潜能的多能干细胞. 由于骨髓来源的间充质干细胞易于取材,未涉及伦理,而被广泛应用于实验研究^[6-10]. 现将骨髓来源的间充质干细胞(MSCs)治疗肝纤维化的实验进展及机制研究作一综述.

1 MSCs治疗肝纤维化的可行性

现在认为骨髓含有多种干细胞、祖细胞,包括造血干细胞和间充质干细胞. 早期实验报道造血干细胞能高效植入肝脏,并分化为肝细胞和胆管上皮细胞,但最近发现这种现象发生几率很低. 核酸水平研究显示造血干细胞只表达少量肝细胞mRNA,并不能高效地向肝细胞分化^[11]. 而注入体内的MSCs则可广泛分布于肝脏、骨髓、脂肪组织等,并且可特异地分化成相应的组织细胞^[12-13]. MSCs不仅能分化成中胚层组织,而且越来越多的体内实验表明MSCs也向功能性肝细胞(非中胚层组织)“横向分化”^[14-16]. 这种定位特性和分化潜力为MSCs局部治疗肝脏疾病提供了可行性.

2 MSCs治疗肝纤维化的实验研究

2.1 动物实验研究 通过骨髓MSCs体外培养和体内移植,外源性的MSCs可替代机体骨髓的

背景资料

我国有近10%的人感染肝炎病毒,罹患不同程度的肝脏损害,以致形成肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌. 通过自体干细胞移植阻止和逆转肝纤维化是当前研究的热点,其中以骨髓间充质干细胞的研究最多. 本文就骨髓间充质干细胞抗肝纤维化的实验研究进展、作用机制及亟待解决的问题方面作一综述.

同行评价
本文内容丰富, 语句流畅, 层次清楚, 是一篇较好的综述, 有一定的可读性和参考性。

MSCs的一部分, 进入正常的生物循环, 并且能掺入肝脏组织向该组织细胞分化^[14-18]。这为MSCs细胞治疗和基因治疗肝纤维化提供了细胞基础。

Peterson *et al*^[16]用大鼠先后做了三个用不同细胞标记、性别交叉的骨髓移植实验, 证实移植的大鼠骨髓干细胞能够迁移到受损的肝脏组织中, 并能向肝脏实质细胞分化。但Peterson所用干细胞并未明确为MSCs。Yamamoto *et al*^[19]近年用Liv8-抗体分选骨髓干细胞。由于Liv8-抗体可以结合E11.5小鼠胎肝上的造血祖细胞, 也可以结合骨髓内CD45阳性造血干细胞, 因此可将骨髓干细胞分成造血干细胞和非造血干细胞。然后分别将Liv8-阳性和阴性的骨髓干细胞分别植入肝损伤的小鼠体内。4 wk后, 对照发现Liv8-阴性亚群的骨髓干细胞(非造血干细胞)能更有效地向肝细胞方向分化。

Lee *et al*^[20]采用阴性免疫分选系统高效分离出hMSCs, 并且首次采用HGF和Oncostatin M二步诱导法体外培养hMSCs。4 wk后可以看到细胞呈立方形和肝细胞特异的基因标记, 并且具有正常肝细胞功能特性, 包括合成白蛋白、贮存糖原、分泌尿素、摄取低密度脂蛋白, 具有巴比妥诱导的细胞色素P450活性等。将这些细胞注入肝损伤部位后, 是否也能发挥正常细胞的作用? Oyagi *et al*^[21]在体外将MSCs和HGF共同培养2 wk, 然后将其注入CCl₄致肝损伤的大鼠体内。4 wk后检测到体内白蛋白水平仍稳定, 转氨酶水平和纤维化程度均下降, 实验肯定了HGF诱导后MSCs的治疗作用。

最近, Oe *et al*^[22]应用转染HGF和VEGF基因的重组腺病毒治疗肝损伤, 用*E.coli*的 β -半乳糖苷基因对照。结果与对照组相比, HGF和VEGF组的cyclin E表达增加, 显著加快肝卵圆细胞生成, 提高肝脏修复效率, 促进肝脏再生。Hung *et al*^[23]用增强绿色荧光(EGFP)技术研究显示, 腺病毒(AdV)在hMSCs上具有很高的转导率(>90%), 并且转导AdV的hMSCs保持多向分化潜能, 4 wk后hMSCs亚群甚至分化成特化细胞系仍有转基因表达^[23-25]。可见, 骨髓间充质干细胞在体外传代后仍有多向分化潜力, 且分化后仍能稳定表达目的基因, 还可避免外源性转染载体进入受体产生的不良影响。所以MSCs是理想的治疗基因载体^[23]。

那么是否可应用基因转染技术, 把HGF转染到其他代谢活跃组织让其表达, 以高效诱导

移植的骨髓MSCs向肝细胞分化? 由于MSCs被认为是良好的基因载体, 是否可以把HGF转染给MSCs, 从而发挥两者的修复肝损伤作用? 这些问题还有待进一步实验研究。

2.2 临床实验研究 Theise *et al*^[26]把男性的骨髓移植给2名女性患者, 又把女性的肝脏移植给4名男性患者。结果发现男女患者的肝脏内均有Y染色体阳性的肝细胞和胆管细胞, 首次得出人骨髓干细胞同种移植后也能归巢分化为肝细胞的结论。

最近, Terai *et al*^[27]报道了9名接受从周围静脉输注自体骨髓细胞治疗的肝硬化患者, 在移植24 wk后, 血清白蛋白、总蛋白水平明显改善($P<0.05$), 显著改善Child-Pugh分级($P<0.05$), 并未观察到任何副作用。可见自体骨髓间充质干细胞移植可以作为肝纤维化肝硬化的一种新的治疗方法。但MSCs治疗肝纤维化的临床实验证据颇少, 临床广泛应用尚存距离。

3 MSCs治疗肝纤维化机制

上述实验中MSCs治疗肝纤维化的具体机制尚不清楚, 当前推测主要有以下几个方面。

3.1 MSCs分化形成正常肝细胞, 补充肝细胞数量, 改善肝功能 维持人体正常肝脏功能约需 2.5×10^{10} 个肝细胞。在肝纤维化特别是肝硬化时, 因过量纤维结缔组织增生挤压, 正常功能的肝细胞数量大为减少。MSCs通过体外诱导然后输注体内, 可随循环植入肝脏增殖分化成肝细胞^[20]。Sakaida *et al*^[28]实验也表明, 应用MSCs移植可补充大量的肝细胞和胆管细胞(4%-43%), 从而改善肝功能。

3.2 MSCs分泌细胞因子/生长因子、抑制炎症反应 MSCs分泌多种细胞因子和生长因子, 如HGF、ILs、SCF、SDF-1 α 、TGF- β 、TNF- α 等。其中HGF不但具有诱导MSCs自身向肝细胞分化功能, 还抑制TGF- β 1产生, 阻止肝脏纤维化, 抗肝细胞凋亡的活性, 从而提高存活率^[22,29]。IL-10能破坏TNF的纤维化信号传导通路, 减少纤维化^[30-31]。TGF- β 1却促进肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的纤维化反应^[32], 是肝纤维化最主要的致病因子, 可以激活转录因子NF- κ B, 引起一系列靶基因的激活。而Di *et al*^[33]用骨髓细胞与异体树突状细胞或外周血淋巴细胞共同培养, 结果表达的TGF- β 1和HGF显著抑制CD4⁺和CD8⁺细胞的增殖活性($65\% \pm 5\%$ 、 $75\% \pm 15\%$), 表明MSCs具有很强的抑制免疫排斥和炎症反

应作用。

总之, 在肝损伤环境中MSCs分泌不同水平的细胞因子相互影响^[29-39], 表现出抗纤维化、抗炎反应作用。

3.3 MSCs抑制肝星形细胞活化、阻止细胞外基质的生成 肝星形细胞是正常肝和纤维化时合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要细胞。HSCs的过度激活导致肝纤维化的发生。研究发现, HSCs与MSCs体外共培养后, HSCs增殖活性明显受抑制, 说明MSCs具有分泌细胞因子抑制HSCs增殖活性的潜能, 这在治疗肝纤维化中发挥作用^[40]。Kim *et al*^[34]认为其机制是MSCs可能通过HGF阻断细胞外信号调节激酶的磷酸化作用, 抑制 α -SMA阳性细胞的增殖, 使门脉区成纤维细胞的生长抑制、凋亡增加, 从而缓解肝纤维化进展。

3.4 MSCs激活卵圆细胞, 促进肝细胞再生 卵圆细胞被认为是肝细胞的前体细胞。当肝脏轻微损伤时肝脏可通过自身的肝细胞增殖修复, 严重时则通过卵圆细胞修复再生^[16]。最近发现, TGF- β /INF- α 无论体内外都阻止肝细胞增殖, 而对于卵圆细胞增殖影响不大, 可能TGF/INF- α 作用于两种细胞的信号转导机制不同。实验发现, SDF-1 α 可以激活卵圆细胞, 在肝细胞再生过程中发挥作用。因而MSCs在分泌上述细胞因子时起到激活卵圆细胞、促进肝细胞再生作用。

3.5 MSCs降解肝内过量的ECM 近年认为基质金属蛋白酶(MMPs)具有较强的降解ECM作用^[31]。Zhao *et al*^[41]发现肝纤维化时, MMP-2, MT-MMP-2的mRNA和相关抗原表达均升高, 而MMP-2和MT-MMP-2对肝纤维化的逆转起重要作用, 进一步研究证实MSCs是MMP-2和MT-MMP-2抗原的主要来源, 并且其表达水平与肝纤维化密切相关。Sakaida *et al*^[28]实验表明, 骨髓干细胞通过表达高水平的MMPs特别是MMP-9, 降解胶原纤维, 减少实验小鼠的肝纤维化程度, 从而明显改善生存率。

4 目前MSCs应用中亟待解决的问题

4.1 体内MSCs数量少, 需要体外扩增 实施肝细胞移植的前提和关键在于获得大量功能正常的肝细胞, 并且不引发移植排斥反应。维持人体正常肝脏功能约需 2.5×10^{10} 个肝细胞, 肝细胞的数量和体积约占肝实质的70%-80%。然而MSCs在骨髓中含量极少, 大约每5万个骨髓单个核细胞中才有1个MSC。因此需经过体外扩增才能满足

应用要求。

现在有人提出应用来源丰富的脂肪间充质干细胞^[6], 但这一领域还有待深入研究。

4.2 MSCs特异性表面标志不确定 虽然Dominici *et al*^[42]提出了间充质干细胞的界定标准, 但对其特征性的表面标志还不甚明了。SSEA-4抗原一直被用来鉴定人胚胎干细胞。最近研究^[43]发现他也可作为间充质干细胞的表面标志, 为提高MSCs的分离鉴定效率和特异性提供帮助。正常肝细胞标记包括c-kit, CD34, OV6, CK7, CK19, chromogranineA, CD56等。因为他们并非特异性标记, 所以确定MSCs是否向肝细胞分化仍存困难。

4.3 MSCs分化过程具有癌变可能 干细胞应用于临床治疗的一种风险就是可能导致干细胞的恶性增殖。最近Wu *et al*^[44]认为肝癌可能源自骨髓细胞的转分化。骨髓干细胞可以分化为卵圆细胞, 卵圆细胞可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞, 而不同阶段的肝干细胞的分化谱系都可能有肝癌细胞产生。Russo *et al*^[45]提出MSCs还可能有促进肝纤维化的作用。在他们的肝纤维化模型中, 骨髓间充质干细胞转分化为肝细胞的量很少(0.6%)。相比之下, 大部分转分化为肝星状细胞和肌成纤维细胞(68%, 70%)。所以对于骨髓细胞治疗的临床应用要慎重。

总之, 由于当前对骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的机制在很大程度上未知, 骨髓间充质干细胞的临床治疗存在疑虑和潜在的危险。但是随着生物技术的发展, 利用MSCs的生物学特性, 在分子水平上将外源细胞因子和目的基因用于细胞归巢和定向分化的调控, 有望使骨髓间充质干细胞广泛应用于临床肝纤维化的治疗。

5 参考文献

- 1 Sobaniec-Lotowska ME, Lotowska JM, Lebensztejn DM. Ultrastructure of oval cells in children with chronic hepatitis B, with special emphasis on the stage of liver fibrosis: the first pediatric study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2918-2922
- 2 Marra F, DeFranco R, Robino G, Novo E, Efsen E, Pastacaldi S, Zamara E, Vercelli A, Lottini B, Spirli C, Strazzabosco M, Pinzani M, Parola M. Thiazolidinedione treatment inhibits bile duct proliferation and fibrosis in a rat model of chronic cholestasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4931-4938
- 3 He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 703-706
- 4 Noble-Jamieson G, Valente J, Barnes ND, Friend PJ, Jamieson NV, Rasmussen A, Calne RY. Liver

- transplantation for hepatic cirrhosis in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1994; 71: 349-352
- 5 Ben-Ari Z, Pappo O, Zemel R, Mor E, Tur-Kaspa R. Association of lamivudine resistance in recurrent hepatitis B after liver transplantation with advanced hepatic fibrosis. *Transplantation* 1999; 68: 232-236
- 6 Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5834-5845
- 7 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 8 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3016-3020
- 9 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 10 Moriya K, Yoshikawa M, Saito K, Ouji Y, Nishiofuku M, Hayashi N, Ishizaka S, Fukui H. Embryonic stem cells develop into hepatocytes after intrasplenic transplantation in CCl₄-treated mice. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 866-873
- 11 Lian G, Wang C, Teng C, Zhang C, Du L, Zhong Q, Miao C, Ding M, Deng H. Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes in vitro. *Exp Hematol* 2006; 34: 348-358
- 12 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6: 1282-1286
- 13 Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, Cui D, Zhang M, Xu Y, Liu C. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3342-3349
- 14 Zhang Y, Fan Y, Zhao L, Tang H. Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005; 22: 521-524
- 15 Chen M, Wang GJ, Diao Y, Xu RA, Xie HT, Li XY, Sun JG. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4045-4051
- 16 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 17 Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2394-2397
- 18 Li W, Liu SN, Luo DD, Zhao L, Zeng LL, Zhang SL, Li SL. Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bone-marrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4866-4869
- 19 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118
- 20 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 21 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 22 Oe H, Kaide T, Mori A, Onodera H, Imamura M. Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1393-1397
- 23 Hung SC, Lu CY, Shyue SK, Liu HC, Ho LL. Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Cocksackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1321-1329
- 24 Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6656-6661
- 25 Tsui TY, Lau CK, Ma J, Glockzin G, Obed A, Schlitt HJ, Fan ST. Adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer suppresses the progression of micronodular cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2016-2023
- 26 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 27 Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-2298
- 28 Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- 29 Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2357-2362
- 30 Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Effect of IL-10 on the expression of HSC growth factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4788-4793
- 31 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 32 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC.

- Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 33 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
- 34 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
- 35 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 36 Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-7465
- 37 Song SL, Gong ZJ, Zhang QR, Huang TX. Effects of Chinese traditional compound, JinSanE, on expression of TGF-beta1 and TGF-beta1 type II receptor mRNA, Smad3 and Smad7 on experimental hepatic fibrosis in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2269-2276
- 38 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
- 39 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504
- 40 Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252
- 41 Zhao ZH, Xin SJ, Zhao JM, Wang SS, Liu P, Yin TY, Zhou GD. Dynamic expression of matrix metalloproteinase-2, membrane type-matrix metalloproteinase-2 in experimental hepatic fibrosis and its reversal in rat. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2004; 18: 328-331
- 42 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317
- 43 Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007; 109: 1743-1751
- 44 Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1093-1098
- 45 Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志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。

RNAi在原发性肝癌治疗中的研究进展

黄秋林, 于永政

背景资料
有关肝癌的各方面的研究一直是医学的热点和难点。近年来, 随着分子生物学、基因组学及蛋白质组学的发展, 使得肝癌的研究达到了一个新的高度。RNAi作为一种新的工具, 因其特有的高效性、特异性、低毒性, 在肝癌的基因治疗研究中发挥了重要的作用。

黄秋林, 于永政, 南华大学附属第一医院普腹外科 湖南省衡阳市 421001
湖南省医药卫生科研计划课题资助项目, No. B2005101
通讯作者: 黄秋林, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学附属第一医院普腹外科. hql107@sina.com
电话: 0734-8179062
收稿日期: 2007-08-18 修回日期: 2007-11-05

Progress in treatment of hepatocarcinoma with RNA interference

Qiu-Lin Huang, Yong-Zheng Yu

Qiu-Lin Huang, Yong-Zheng Yu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Supported by: Medical and Healthy Research Project of Hunan Province, No. B2005101
Correspondence to: Qiu-Lin Huang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. hql107@sina.com
Received: 2007-08-18 Revised: 2007-11-05

Abstract

RNA interference (RNAi) is a process that exists widely in eukaryotes. Silencing of a target gene is induced by a double-stranded RNA (dsRNA) at the post-transcription level, partially or fully. This paper is to review the main mechanisms of RNAi and the progress in hepatocarcinoma treatment with RNAi.

Key Words: Primary hepatic carcinoma; RNA interference

Huang QL, Yu YZ. Progress in treatment of hepatocarcinoma with RNA interference. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3592-3597

摘要

RNA干扰(RNA interference), 即RNAi, 是一种在真核生物体中广泛存在的通过双链RNA分子在mRNA水平上诱导特异性序列基因表达部分或完全抑制的过程。本文主要对RNAi的机制及其在肝癌研究治疗中的应用作一综述。

关键词: 原发性肝癌; RNA干扰

黄秋林, 于永政. RNAi在原发性肝癌治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3592-3597
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3592.asp>

0 引言

RNA干扰(RNA interference), 是一种在真核生物体中广泛存在的通过双链RNA分子在mRNA水平上诱导特异性序列基因表达部分或完全抑制的过程^[1-2], 已经成为研究基因功能、新基因筛选、基因治疗和寻找药物靶点的重要工具。原发性肝癌是全世界最高发的恶性肿瘤之一, 是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果, 包括病毒感染、致癌物的作用、癌基因的激活和抑癌基因的失活、细胞的凋亡和增殖调节失控等^[3]。在其癌变增殖转移等一系列过程中伴随着不同阶段的癌基因或抑癌基因变异, 引起相关因子表达的紊乱。针对这些生物学特性, 已经有许多新型技术应用于肝癌的基因治疗。RNAi因其特有的高效性、特异性、低毒性, 为肝癌基因治疗的研究开辟了一条新的途径。

1 RNAi概述

1.1 RNAi现象的发现 1995年美国康奈尔大学Guo *et al*在阻断秀丽新小杆线虫(*C.elegans*)中par-1基因表达时发现, 给对照实验组线虫注射正义RNA不但不增加该基因的表达, 反而产生与反义RNA同样的结果即特异性阻断该基因的表达^[4]。该现象与传统的关于反义RNA的认知出现矛盾。Fire *et al*^[5]证实, 正义RNA抑制基因表达的现象是由于体外转录的RNA中污染了少量dsRNA而引起, 并发现纯化后的dsRNA具有比正义链或反义链更强的基因沉默效应, 故将这一现象首次称为RNAi。随后陆续在植物如拟南芥、烟草和低等无脊椎动物中发现RNAi效应存在^[6], 但在哺乳动物细胞中发现特异性RNAi的过程颇为曲折。早期研究者采用较长序列的dsRNA总是导致基因的非特异性抑制, 以致认为在哺乳动物细胞中不能以RNAi技术诱导特

异性基因抑制^[7-8]。2001年, Elbashir *et al*^[9]将人工合成的19-21 nt的siRNA通过阳离子脂质体转入人胚肾293细胞和HeLa细胞, 成功地在哺乳动物细胞产生了特异性的基因沉默, 解决了长片段dsRNA在哺乳动物细胞内引起非特异性干扰的问题。从此RNAi技术得以广泛应用于哺乳动物和人类细胞研究。

1.2 RNAi的机制 在RNAi过程中, 内源性或外源性dsRNA被dsRNA特异性核酸内切酶(dsRNA specific endonuclease, Dicer)切割成约21-23 nt的由正义序列和反义序列组成的小干扰RNA, 即siRNA。siRNA中的反义序列指导形成一种核蛋白体, 被称为RNA诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)。以此作为模板识别靶mRNA, 然后通过碱基互补配对的原则, mRNA与siRNA进行结合; 同时RISC切割靶mRNA分子中与siRNA反义序列互补的区域, 导致其降解, 阻断相应基因的表达^[10-11]。siRNA还可作为一种特殊引物, 在RNA依赖RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)作用下, 以靶mRNA为模板合成dsRNA。后者再次被Dicer切割成siRNA, 新生成的siRNA又可进入上述循环。这一过程称为RNAi的放大效应。新生成的dsRNA被反复合成与降解, 不断产生大量新的siRNA, 从而使靶mRNA渐进性减少, 有效抑制靶向基因蛋白质或多肽合成, 呈现基因沉默现象^[12]。与其他基因敲除技术相比, RNAi技术因其高度的序列特异性、基因沉默的高效性以及对细胞的低干扰性等优点而成为基因功能研究、肿瘤预防和治疗的重要工具^[13-16]。

2 RNAi在肝癌研究中的进展

肝癌与肝炎病毒感染密切相关。因此采用RNAi技术不仅可以干扰肝炎病毒复制, 也使清除肝炎病毒成为可能, 从而为慢性肝炎向肝癌的演变提供了新的防治手段。

乙型肝炎病毒感染是肝癌病因学的主要因素。Weinberg *et al*^[17]为了进一步研究RNAi对HBV病毒的抑制, 设计了靶向HBV病毒保守开放读码框, 他的能转录长发夹RNA的含有两个U6启动子的载体, 结果显示在转染的细胞中以及体外应用大鼠模型中表达长发夹RNA的载体的减低了70%-90%病毒的复制, 而没有发现干扰素途径。近年来, 人们发现了HBV基因编码17 kDa的多功能蛋白, 命名为x蛋白, 也称为HBx-Ag, 是病毒基因组转录所必需, 经常在人的肝癌

细胞中检测到其表达, 能影响肝癌形成和发展的多个环节, 与慢性HBV感染者发展为肝癌密切相关。Chan *et al*^[18]构建了靶向HBx的小发夹载体并研究了他对PLC/PRF/5肝癌细胞增殖和凋亡的影响。结果显示RNAi可以抑制HBx mRNA及HBx蛋白的表达, 抑制率为50%-95%, 并可以明显的抑制细胞的增殖以及大鼠体内肿瘤的生长。因此认为HBx在肿瘤形成和抗凋亡方面具有重要的作用。

除了乙型病毒性肝炎之外, 还有一些对丙肝的研究^[19-21]。这些研究为我们从病因上预防肝癌的发生有很重要的参考意义。

3 RNA干扰在肝癌治疗中的应用

肝癌的发生、发展是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果, 包括病毒感染、致癌物的作用、癌基因的激活和抑癌基因的失活、细胞的凋亡和增殖调节失控等。通过RNAi技术作用于肝癌的发生、发展的各个相关因素, 多个阶段中其重要作用的物质, 调节各个基因间的相互作用是目前RNAi治疗肝癌的主要方向。根据RNAi作用, 主要有以下几个方面的应用。

3.1 增殖相关基因的RNA 肝癌发生与肝细胞的增殖调节失控有关。肝细胞增殖活性的持续升高是导致肝脏损害并最终发生肝癌的重要危险因素之一。细胞增殖导致的DNA突变得以保留, 并迅速克隆性扩张, 最后导致肝癌的发生^[22]。通过RNAi敲除与肝癌增殖相关的因子, 可在一定程度抑制肝癌细胞的增殖。

Salvi *et al*^[23]通过RNAi方式敲除了尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)在肝癌细胞中的表达后, 能明显抑制荷瘤裸鼠体内肿瘤的生长。因此发现u-PA与细胞的增殖有很重要的关系, 并认为u-PA有可能作为肝癌治疗的分子靶点。sFRP1(secreted frizzled-related proteins)是一种分泌型糖蛋白, 他可能与受体竞争结合Wnt蛋白, 或直接与Wnt蛋白结合, 由此阻断了Wnt信号传导通路, Shih *et al*^[24]在β细胞骨架蛋白缺乏的细胞系中使用RNAi的手段阻断sFRP1的表达从而刺激Wnt信号传导通路, 并促进细胞的增殖, 干扰SFRP1的表达, 来研究其对肝癌细胞增殖的影响。Huang *et al*^[25]使用RNAi抑制HepG2, Hep3B和HuH-7细胞中DLK1(delta-like 1 homolog)的表达, 进而观察到这些肿瘤细胞的生长, 克隆形成和致瘤性也被明显抑制, 并指出DLK1具有促进肿瘤形成

研发前沿
RNAi目前主要处于细胞水平的研究, 也有少数体内研究以及临床研究, 并取得了一定的进展。但是受肿瘤发病机制、基因导入细胞的策略、体外给药, 以及RNAi机制等研究的限制, RNAi目前主要作为一种研究基因的功能及信号传导通路的工具。

相关报道
VEGF是肿瘤治疗一个重要靶点。国内外研究人员已经使用RNAi方法降低了宫颈癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、视网膜母细胞瘤以及乳腺癌等恶性肿瘤中VEGF的表达,并一定程度的抑制了肿瘤的生长。

的作用。因此通过RNAi可以发现促肝癌细胞增殖的基因并抑制其表达,加速肝癌治疗的进程。

3.2 凋亡相关基因的RNAi 细胞凋亡(apoptosis),是在细胞内和细胞外因子的严格控制下,经过多种途径的信号传递,导致体细胞产生一系列形态和生物化学方面的改变而引起的细胞程序性死亡,是细胞衰老和死亡过程的主要形式。凋亡机制失活导致的癌细胞无限制增殖是HCC发生的重要发病机制之一。细胞凋亡的相关调控基因包括促进细胞凋亡的基因和抑制细胞凋亡的基因两大类。凋亡促进基因包括野生型*P53*、*ICE*、*TGF β* 、*Fas*、*C-myc*、*Ced-3*、*Ced-4*、*Bax*等,凋亡抑制基因包括*Bcl-2*、*Rb*、*ced-9*、突变型*P53*等^[26]。而这些基因通过不同的途径控制肝癌细胞的凋亡。通过RNAi技术控制这些基因的功能是重要的研究方向。国内外研究人员通过RNAi手段抑制了在凋亡的信号转导中起重要作用的细胞内外因子,为RNAi调控肝癌细胞的凋亡提供了实验依据。*Bcl-xL*是*Bcl-2*家族成员之一。*Li et al*^[27]在研究IFN- γ /LIGHT介导细胞凋亡信号通路机制的同时,通过RNAi手段阻断Hep3B细胞中*Bcl-XL*的过表达,发现在Hep3B细胞中*Bcl-XL*的过表达能增强对IFN- γ /LIGHT介导凋亡的抵抗,*Bcl-XL*的下调则减弱这种抵抗。基于上述发现,他认为高表达*Bcl-XL*的肝癌可选择更好的治疗策略。*Sirach et al*^[28]使用RNAi的方法在体外明显抑制了*KLF6* (Kruppel-like factor)的表达,并使细胞处于G₁期,并发现*KLF6*的沉默可导致*P53*的上调和*Bcl-xL*的抑制,表明*KLF6*是肝癌细胞逃避凋亡的重要因子。

3.3 侵袭及转移相关基因的RNAi 侵袭及转移是恶性肿瘤的重要生物学特性。遏制恶性肿瘤的侵袭和转移,就可以大大降低肿瘤的恶性程度。一些细胞内外因子与恶性肿瘤细胞的侵袭和转移有着重要的联系。通过RNAi技术来抑制这些因子的表达是肝癌治疗的一个理想方向。

CCR1 (C-C Chemokine receptor 1)在白细胞向炎症处聚集中起重要作用。肿瘤细胞的转移同白细胞的转运有许多相同的地方,而*CCR1*在肝癌细胞和组织内高表达,其具体功能还不明确。*Wu et al*^[29]在研究中发现microRNA介导的RNAi能沉默人肝癌细胞系HCCLM3中*CCR1*的表达,并且检测了沉默掉*CCR1*的HCCLM3细胞的侵袭和增殖能力,发现*CCR1*表达的明显下调能抑制HCCLM3细胞的侵袭力,但是对细胞的

增殖影响不大。这些发现表明*CCR1*在HCCLM3的侵袭中有重要的作用,可能*CCR1*将成为肝癌治疗新的靶点。*MEK/ERK*引起的级联反应是肝癌转移和侵袭的重要机制之一。而事实证明*MAPK*是控制肝癌细胞转移和侵袭的主要信号传导通路。*Bessard et al*^[30]通过使用丝裂霉素c和RNAi介导的*ERK2*的抑制,控制了细胞的转移,并使用RNAi特异地抑制了*uPAR*的表达,完全抑制了肝癌的转移。因此,*Bessard et al*认为*uPAR*和/或*MEK/ERK/S6K*的RNAi是将来治疗肝癌侵袭的重要方法。*Zhu et al*^[31]通过化学合成的siRNA敲除了肝癌细胞内骨桥蛋白的表达,并发现mRNA和蛋白在HCC-LM3细胞的表达分别抑制了79%和81%,且转染了siRNA的HCC-LM3细胞的体外克隆及转移的数目均明显减低。

3.4 癌基因的RNAi 目前,尽管一些肝癌的抑癌基因已经被鉴定,如*P53*和*PI6*(*INK4A*),并明确了他们在肝癌中的特异性失活,但是在肝癌发生中特异性激活的癌基因却少见报道。*Higashitsuji et al*^[32]应用消减杂交法在人肝细胞癌组织高表达的基因中筛选出一条编码重复gankyrin序列的新基因,命名为gankyrin。杨绍旭 *et al*^[33]通过RNAi抑制了肝癌细胞株HepG2中gankyrin的表达,表明在HepG2细胞中抑制gankyrin的表达可有效抑制细胞生长并导致细胞周期的阻滞,认为利用RNAi抑制gankyrin的表达可能会成为一种有效的肝癌基因治疗手段。

3.5 肿瘤相关抗原的RNAi 肿瘤抗原可分为肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原,但肝癌的肿瘤特异性抗原至今仍未发现和分离成功。目前的肿瘤抗原都是肿瘤相关抗原,主要有甲胎蛋白、乙肝病毒表面抗原、黑素瘤抗原等。抑制这些抗原的产生可在一定程度上抑制肿瘤的发生和生长^[34]。

*AFP*是哺乳动物胚胎期由肝及卵黄囊合成的胚胎期血清蛋白。在成年期,主要来源于内胚层恶性肿瘤,如肝癌、胃癌和性腺肿瘤等。*AFP*在HCC组织中的阳性率为44%-70%。*Wang et al*^[35]成功构建了pSilencer3.0-H1-AFP载体并将其转染SMMC-7721细胞。通过实时RT-PCR、免疫检测、MTT以及细胞流式等方法进行了相关检测,发现pSilencer3.0-H1-AFP载体下调了*AFP*的表达,约为34%,并抑制了SMMC-7721细胞的增殖,但是并未引起明显的凋亡。乙肝病毒表面抗原(HBsAg)是乙型肝炎病毒包膜蛋白中的主要蛋白。血液HBsAg阳性者比HBsAg阴性者其肝癌发病率高100

倍,在某种意义上可称之为肝癌的“肿瘤相关抗原”^[36]。HBx的特异敲除能明显抑制细胞的生长和肿瘤模型中肿瘤的发生^[18]。

3.6 生长因子及其受体相关基因的RNAi 细胞生长因子及其受体与肝癌发生、发展有一定的关系。这些生长因子主要有:肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其受体C-met, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体VEGF-R, 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF), 转化生长因子(transforming growth factor, TGF), 胰岛素生长因子(insulin-like growth factor, IG)^[37]。肝细胞生长因子HGF最早是从肝部分切除的大鼠血清中分离得到,并被证实是一种很强的刺激肝细胞增殖的分裂原。其受体c-Met主要在各种上皮细胞中表达, HGF/c-Met信号传导系统在肝细胞癌的侵袭和转移中发挥着重要作用^[38]。Salvi *et al*^[39]通过RNAi抑制了c-Met的表达,进而抑制了SKHep1C3细胞的转移。VEGF是具有强大的刺激血管生成能力的一种生长因子,可增加微血管的通透性,刺激内皮细胞分裂以及增加组织因子和一些蛋白酶的产生,在肝癌的发生、发展、转移中起促进作用^[40]。研究者已经使用RNAi方法降低了宫颈癌^[41]、卵巢癌^[42]、胃癌^[43]、结肠癌^[44]、视网膜母细胞瘤^[45]以及乳腺癌^[46]等恶性肿瘤中VEGF的表达,并在一定程度上抑制了肿瘤的生长。但目前尚无通过RNAi手段抑制肝癌细胞中VEGF及其受体表达的报道。

3.7 MDR相关基因的RNAi 化疗仍是肝癌综合治疗的重要手段之一。但是肿瘤的多药耐药性成为化疗的障碍^[47],其中MDR1基因及其产物的过度表达是多耐药的重要机制之一^[48]。胡礼仪 *et al*^[49]构建了针对多药耐药基因MDR1的pshRNA-MDR1重组质粒,转染肝癌耐药细胞株Bel-7402/R,结果明显地抑制了MDR1 mRNA的表达。

4 结论

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,居我国癌症发病率的第二位^[50],每年约有13万人死于肝癌,并且近些年来其发病率和死亡率有逐年升高的趋势。由于其具有侵袭性强、易复发、转移等生物学特性,目前手术、放疗、化疗等治疗办法虽然不断提高,但效果仍不佳。因此有关

肝癌的各方面的研究一直是医学的热点和难点。近年来,随着分子生物学、基因组学及蛋白质组学的发展,使得肝癌的研究治疗达到了一个新的高度。RNAi作为一种新的工具,因其特有的高效性、特异性、低毒性,在肝癌的基因治疗的研究中发挥了重要的作用。

RNAi目前主要处于细胞水平的研究。也有少数体内研究以及临床研究,并取得了一定的进展。但是受肿瘤发病机制,基因导入细胞的策略,体外给药,以及RNAi机制等研究的限制, RNAi目前主要作为一种研究基因的功能及信号传导通路的工具。相信随着肿瘤发病及RNAi机制的深入研究,基因导入及体外给药策略的完善, RNAi一定会在肿瘤的治疗研究中发挥其重要作用。

5 参考文献

- 1 Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing. *Science* 2001; 293: 1080-1083
- 2 Verma NK, Dey CS. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29: 395-404
- 3 Feitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604
- 4 Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; 81: 611-620
- 5 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 6 Aravin AA, Klenov MS, Vagin VV, Rozovskii IaM, Gvozdev VA. Role of double-stranded RNA in eukaryotic gene silencing. *Mol Biol (Mosk)* 2002; 36: 240-251
- 7 Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-5520
- 8 Myslinski E, Amé JC, Krol A, Carbon P. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2502-2509
- 9 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 10 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 737-747
- 11 Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001; 15: 2654-2659
- 12 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418:

应用要点

本文对RNAi在肝癌研究中的应用进行了简练、全面、细致的叙述,并对其在肝癌研究中最应用进行了较系统的分类,为进行此方面研究的人员提供了较全面的信息。

同行评价
本文具有较好的
科学性、创新性和
可读性。

- 244-251
- 13 Tan FL, Yin JQ. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Res* 2004; 14: 460-466
- 14 Pomerantz RJ. RNA interference: a potential novel therapeutic combating HIV-1 in the central nervous system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 52: 401-409
- 15 Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7721-7726
- 16 Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 500-505
- 17 Weinberg MS, Ely A, Barichievy S, Crowther C, Mufamadi S, Carmona S, Arbuthnot P. Specific inhibition of HBV replication in vitro and in vivo with expressed long hairpin RNA. *Mol Ther* 2007; 15: 534-541
- 18 Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006; 208: 372-380
- 19 Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat* 2007; 14: 447-459
- 20 Chevalier C, Saulnier A, Benureau Y, Fléchet D, Delgrange D, Colbère-Garapin F, Wychowski C, Martin A. Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. *Mol Ther* 2007; 15: 1452-1462
- 21 Smith RM, Smolic R, Volarevic M, Wu GY. Positional effects and strand preference of RNA interference against hepatitis C virus target sequences. *J Viral Hepat* 2007; 14: 194-212
- 22 Park YN, Chae KJ, Kim YB, Park C, Theise N. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. *Cancer* 2001; 92: 2733-2738
- 23 Salvi A, Arici B, Alghisi A, Barlati S, De Petro G. RNA interference against urokinase in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Tumour Biol* 2007; 28: 16-26
- 24 Shih YL, Hsieh CB, Lai HC, Yan MD, Hsieh TY, Chao YC, Lin YW. SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 2007; 121: 1028-1035
- 25 Huang J, Zhang X, Zhang M, Zhu JD, Zhang YL, Lin Y, Wang KS, Qi XF, Zhang Q, Liu GZ, Yu J, Cui Y, Yang PY, Wang ZQ, Han ZG. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1094-1103
- 26 Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427: 148-154
- 27 Li J, Shen F, Wu D, Wei LX, Wang YZ, Shi LH, Zou Y, Wu MC. Expression level of Bcl-XL critically affects sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to LIGHT-enhanced and interferon-gamma-induced apoptosis. *Oncol Rep* 2007; 17: 1067-1075
- 28 Sirach E, Bureau C, Péron JM, Pradayrol L, Vinel JP, Buscail L, Cordelier P. KLF6 transcription factor protects hepatocellular carcinoma-derived cells from apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1202-1210
- 29 Wu X, Fan J, Wang X, Zhou J, Qiu S, Yu Y, Liu Y, Tang Z. Downregulation of CCR1 inhibits human hepatocellular carcinoma cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 866-871
- 30 Bessard A, Fremin C, Ezan F, Coutant A, Baffet G. MEK/ERK-dependent uPAR expression is required for motility via phosphorylation of P70S6K in human hepatocarcinoma cells. *J Cell Physiol* 2007; 212: 526-536
- 31 Zhu XQ, Ye QH, Lei KF, Chen J, Qin LX. Knocking down osteopontin expression by specific siRNA reduces the in vitro invasiveness of human hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 404-407
- 32 Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arii S, Fujita J. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 2000; 6: 96-99
- 33 杨绍旭, 窦科峰, 路凡, 卢兹凡. ShRNA抑制gankyrin基因在肝癌细胞中表达的研究. *中国医师杂志* 2005; 7: 1297-1299
- 34 Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S232-S241
- 35 Wang YS, Ma XL, Qi TG, Liu XD, Meng YS, Guan GJ. Downregulation of alpha-fetoprotein siRNA inhibits proliferation of SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6053-6055
- 36 Gotsman I, Israeli D, Alper R, Rabbani E, Engelhardt D, Ilan Y. Induction of immune tolerance toward tumor-associated-antigens enables growth of human hepatoma in mice. *Int J Cancer* 2002; 97: 52-57
- 37 Mohr L. Hepatocellular carcinoma: novel therapeutic approaches. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2007; 96: 553-562
- 38 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251: 802-804
- 39 Salvi A, Arici B, Portolani N, Giulini SM, De Petro G, Barlati S. In vitro c-met inhibition by antisense RNA and plasmid-based RNAi down-modulates migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007; 31: 451-460
- 40 Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2006; 242: 151-167
- 41 Ng G, Winder D, Muralidhar B, Gooding E, Roberts I, Pett M, Mukherjee G, Huang J, Coleman N. Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol* 2007; 212: 325-334
- 42 Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, Rubin SC, Coukos G. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 1169-1178
- 43 周慧聪, 亢春彦, 张艳, 李继昌. VEGF-C基因靶向RNA干扰重组表达载体的构建和表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1549-1553
- 44 Kim WJ, Christensen LV, Jo S, Yockman JW, Jeong JH, Kim YH, Kim SW. Cholesteryl oligoarginine

- delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther* 2006; 14: 343-350
- 45 Jia RB, Zhang P, Zhou YX, Song X, Liu HY, Wang LZ, Luo M, Lu J, Ge SF, Fan XQ. VEGF-targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 2007; 39: 108-115
- 46 Sun P, Gao J, Liu YL, Wei LW, Wu LP, Liu ZY. RNA interference (RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances Epirubicin sensitivity of breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2007
- 47 Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990; 42: 155-199
- 48 Grudé P, Conti F, Mennezier D, Louvel A, Houssin D, Weill B, Calmus Y. MDR1 gene expression in hepatocellular carcinoma and the peritumoral liver of patients with and without cirrhosis. *Cancer Lett* 2002; 186: 107-113
- 49 胡礼仪, 周新, 张有顺, 戴宗晴, 黄玲, 王菊. 载体介导的RNA干扰技术抑制肝癌耐药细胞MDR1表达的研究. *肿瘤防治杂志* 2004; 11: 1158-1162
- 50 吴孟超. 肝癌外科治疗的近期进展. *中国普外基础与临床杂志* 2006; 13: 125-128

编辑 程剑侠 电编 李军亮

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》报道消化疾病的评论及临床和基础研究,包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容.

《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: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>.

慢性胰腺炎研究进展

王洛伟, 李兆申

背景资料
慢性胰腺炎发病率逐年上升, 其诊断和治疗还存在很多难点。本文检索近期国际上发表的慢性胰腺炎相关报道, 就其研究的进展进行综述, 以期能够全面了解国际上慢性胰腺炎研究情况, 指导进一步开展深入的研究。

王洛伟, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学胰腺疾病研究所 上海市 200433
通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市长海路174号, 上海长海医院
消化内科. zhaoshen.li@gmail.com
电话: 021-25074720
收稿日期: 2007-08-15 修回日期: 2007-11-10

Progress in research of chronic pancreatitis

Luo-Wei Wang, Zhao-Shen Li

Luo-Wei Wang, Zhao-Kun Li, Institute of Pancreatic Disease, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhaoshen.li@gmail.com
Received: 2007-08-15 Revised: 2007-11-10

Abstract

Chronic pancreatitis (CP) is a persistent inflammatory disease characterized by irreversible morphological changes in the pancreas and, typically, by pain and permanent impairment of exocrine and endocrine pancreatic functions. In recent years, the prevalence of CP has increased around the world. Although endoscopy, pancreatic enzyme drugs, pancreas imaging diagnosis and laboratory techniques have developed fast, the etiological factors and pathogenesis of CP remain unclear. There are no common guidelines for the diagnosis and treatment of CP. Thus, further research on the epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of CP must be carried out to understand the development of pancreatic diseases.

Key Words: Chronic pancreatitis; Pancreatic fibrosis; Pancreatic calcification

Wang LW, Li ZS. Progress in research of chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3598-3603

摘要

慢性胰腺炎以胰腺慢性纤维化、钙化、胰管慢性炎症和胰管结石为主要病理改变, 其发

率在国内外有逐年升高的趋势。虽然内镜治疗技术的飞速发展、胰酶替代药物的广泛应用、影像学 and 实验室技术的发展使慢性胰腺炎的内科诊断和治疗措施有了较大的进展, 但确切的病因和发病机制尚不清楚, 其诊断和治疗也尚未达成共识。因此, 迫切需要开展慢性胰腺炎的流行病学、病因学、诊断学和治疗学等相关基础与临床研究, 为慢性胰腺炎的诊治提供理论和实践依据, 并尽快制定出科学、客观的慢性胰腺炎诊治规范, 指导其诊断和治疗。

关键词: 慢性胰腺炎; 胰腺纤维化; 胰腺钙化

王洛伟, 李兆申. 慢性胰腺炎研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3598-3603
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3598.asp>

0 引言

慢性胰腺炎(CP)是由于各种原因引起的以胰腺细胞破坏, 进行性纤维化为主的病变。临床主要表现为反复腹痛, 胰腺内、外分泌功能降低, 从而导致脂肪泻、糖尿病。CP病程迁延, 临床表现多样, 严重影响患者的日常生活。但是, 目前对CP的病因、发病机制尚不甚清楚。并且有报道认为CP是胰腺癌的危险因素之一。因此迫切需

1 慢性胰腺炎病因及发病机制

CP是一种难以确切定义的胰腺慢性炎症性病变。在1963年将胰腺炎症性病变分为急性、急性复发性、慢性复发性及慢性胰腺炎^[1], 1980年起根据内镜下逆行胰胆管造影(ERCP)所见的胰腺形态学表现对CP进行分期(表1)。1984年马赛和剑桥会议上专家达成共识, 即CP是由于进展性炎症而导致的伴有持续性胰腺结构改变和/或功能损害的胰腺慢性疾病。剑桥按照ERCP典型改变把慢性胰腺炎分为: 正常, 主胰管及侧枝正常; 可疑, 侧枝扩张/阻塞少于3个, 主胰管正常; 轻度, 侧枝扩张/阻塞超过3个, 主胰管正常; 中度, 主胰管以外狭窄及扩张; 重度, 主胰管以外重度

表 1 CP流行病学资料

作者	年份	发病率(1/10万)	流行率(1/10万)	男/女
O'Sullivan JN	1940	1.9	未报道	未报道
O'Sullivan JN	1969	3.5	未报道	未报道
Copenhagen pancreatitis study	1981	8.2	27.4	3.0 1
Lin Y	1994	5.4	28.5	3.5 1
Lin Y	1999	5.8	32.9	2.0 1
Lankisch	2002	6.4	未报道	未报道

研发前沿
目前国际上对慢性胰腺炎的研究主要集中在慢性胰腺炎的病因和发病机制, 慢性胰腺炎简便、有效的诊断方法和治疗措施。内镜治疗和外科手术的对比研究是目前研究较多的方面。

阻塞、囊肿、狭窄、钙化。

CP在国外以慢性酒精中毒为主要病因^[1]。而我国CP最常见病因是胆道系统疾病^[2], 其次为酒精性, 部分无明显病因者称为特发性。国外较常见的热带性胰腺炎在我国极少见, 可能与我国地理位置有关。国外学者近期将病因归类为: (1) 毒性代谢产物(如酒精、烟草), (2) 有机毒素, (3) 基因突变, (4) 自身免疫性疾病, (5) 复发性急性胰腺炎、重症胰腺炎, (6) 外伤及术后胰腺损伤。CP的发病机制中, 多数学者倾向于蛋白质分泌过度导致梗阻和坏死-纤维化的假说^[1], 即酒精刺激胰腺分泌, 增加胰腺对胆囊收缩素(CCK)刺激的敏感性, 使胰液中胰酶和蛋白质的含量增加, 导致小胰管内蛋白栓形成, 引起胰管阻塞并发生钙化, 腺泡萎缩, 小导管周围炎症浸润并发展至纤维化。此过程中, 一种生理情况下可防止胰液中碳酸钙沉淀的胰石蛋白(lithostatin)起关键作用, 若分泌不足则导致蛋白栓钙化。然而, 最近认为此假说存在缺陷。如长期摄入酒精者中发生CP比例小于10%^[3], 动物模型中胰腺在大剂量乙醇诱导后形态改变不明显。因此Pandol *et al*^[4]认为酒精只是炎症增敏剂, 可协同其他病因促进炎症发生。

2 慢性胰腺炎的流行病学

CP发病率的地区差异极大, 欧美国家发病率较高, 而我国发病率较低。但近年来有升高的趋势。各国学者报道CP流行病学情况见表1^[5-8]。各国学者报道的CP发病率存在明显地区差异, 原因可能是不同地区或国家酒精摄入量不同。但发病率的不同反映了各国的诊断方法和标准各异。由于缺乏公认的诊断标准, 因此难以比较各国CP的流行病学调查结果。我国目前尚无CP的流行病学调查资料, 对CP的发病率报道很少。北京协和医院统计1952-1989年住院患者中确诊CP132例, 占同期内外科住院患者总数的

0.15%^[2]。而随着开展胰腺外分泌功能检查和多种影像检查, 确诊的病例也逐年增多。2002年上海长海医院王洛伟 *et al*^[9]报道CP262例, 占同期住院总人数的0.63%, 多见于中老年人, 男女比为2.8:1, 诊断时平均年龄55岁。随着人们生活习惯和饮食结构的改变, 今后CP的发病率将不断上升。2007年全国多中心CP临床流行病学调查共收集CP1994例, 我国CP发患者数从1995年的48例逐年上升到2003年的346例, 发病年龄在5-85岁之间, 平均年龄(48.9±15.0)岁, 高峰在60岁, 男女性别比例为1.86:1^[10]。

3 慢性胰腺炎的诊断与鉴别诊断

腹部X线平片发现胰腺钙化即可确诊CP, 但CP的早期诊断则较困难, 临床确诊CP常需数月甚至数年的随访^[11]。目前尚无被广泛接受的CP诊断“金标准”。经皮穿刺胰腺活检危险性大, 不能列为临床常规应用, 因此CP的诊断仍主要依靠影像学检查和胰腺外分泌功能试验。

3.1 影像学检查 腹部超声是了解胰腺的基本方法, 为首选的影像学检查, 但对CP诊断敏感性低, 仅60%-70%^[12]。且由于检查结果过于依赖检查者的经验, 难以作为标准化的检查方法。CT是发现胰腺钙化的最佳影像学手段, 而胰腺钙化是CP的特征性改变, 其敏感性和特异性分别为74%和85%^[12], 但CT难以发现小胰管和胰腺实质早期改变。ERCP被认为是CP影像学检查中的金标准, 也是仅次于组织学检查的最佳标准^[12]。大量研究提示, ERCP的诊断准确性优于腹部超声和CT, 可清晰显示胰管的改变, 但具有侵入性, 可能出现并发症^[13]。磁共振胰腺成像(MRCP)可清晰显示胰管扩张和胰管结石, 但显示胰管侧枝的改变不如ERCP准确, 对CP的早期病变不够敏感。超声内镜(EUS)对晚期CP的诊断准确性与ERCP相同, 对胰管和胰腺实质早期病变有极高敏感性, 已成为当前诊断早期CP的重要手段, 有

创新盘点
本文全面检索了近期国际上慢性胰腺炎的研究报道,内容全面,时限性较新,很多是2007年刚刚发表的文献。

望成为检出早期CP的首选方法^[11,14-17]。EUS引导下穿刺可以获得组织学诊断。虽然目前EUS引导下穿刺获得组织标本量不够多,诊断的准确性尚不够高,但仍不失为重要的诊断方法之一^[18-21]。胰胆管腔内超声(IDUS)可发现胰管壁和实质的改变及结石,胰管镜直接观察胰管腔,对诊断CP均有一定的价值。但两者均为侵入性检查,且设备昂贵,不易普及。

3.2 胰腺外分泌功能测定 胰腺外分泌功能试验分直接试验和间接试验。直接试验包括促胰液素试验和促胰液素-胆囊收缩素(CCK)/铃蟾素刺激试验,通过促胰液素刺激而测定胰液量、 HCO_3^- 浓度和胰蛋白酶浓度,对诊断CP有一定敏感性和特异性。前者对CP诊断的敏感性为75%-90%,特异性为80%-90%;后者的敏感性和特异性均>90%^[12]。但在轻度胰腺外分泌功能障碍时,这两项试验结果均可正常,因此无法作为早期CP的诊断依据。目前日本胰腺学会已将胰腺功能测定作为诊断CP的主要指标之一,其诊断CP的总敏感性为90%,特异性为90%-100%^[22]。但这些侵入性检查操作复杂,费用高,只能在专科中心进行。间接试验有Lundh试餐试验、血、尿苯甲酰-酪氨酰对氨基苯甲酸(BT-PABA)试验、胰月桂基试验(PLT)、粪便试验(苏丹三染色、粪便脂肪定量测定和糜蛋白酶测定)及核素胰腺外分泌功能试验(^{131}I -甘油三脂/油酸吸收试验、双标记Schilling试验及 ^{13}C -呼气试验)。近年来PLT和BT-PABA试验的诊断准确性得到了提高。但由于受小肠疾病、黄疸、胃排空异常或胃大部切除等上消化道解剖及功能异常的影响,不能仅凭PLT和BT-PABA试验的异常结果诊断CP,因此其临床应用受到一定限制。粪便脂肪定量测定的敏感性和特异性较低,糜蛋白酶测定方法简单易行,但诊断准确性有欠缺。目前的研究热点是粪弹性蛋白酶1(E1)的测定。E1是一种具有蛋白分解活性的胰腺分泌的糖蛋白,在消化道内高度稳定,不易失活,粪便中E1浓度是胰液中E1浓度的5倍,因而可极敏感和特异的检测胰腺外分泌功能。其结果不受胃切除术和小肠吸收不良的影响,可在临床上常规进行。但须注意的是,因分泌性腹泻的稀释效应而产生假阳性。最近有学者采用 ^{13}C -呼气试验测定胰腺外分泌功能^[1],发现对早期或中期CP诊断准确性较低,尚待今后的进一步技术改进。以上多种试验在我国均有研究与报道,但目前用于临床的仅有尿BT-PABA试验、粪便苏丹三染色和粪便(48

h)脂肪定量测定^[2]。

3.3 CP的诊断标准 我国CP的诊断一直延用1987年中华内科杂志编委会提出的诊断标准,也有人参考日本的CP临床诊断标准。在最近的亚太地区专家共识会议上确认,符合下列任何一项或一项以上者可诊断为CP: (1)ERCP显示有胰管改变, (2)促胰液素试验阳性, (3)胰腺钙化, (4)提示CP的EUS异常, (5)组织学检查显示CP特征(如进行组织学检查)^[23]。

3.4 CP的鉴别诊断 CP与胰腺癌的临床表现、实验室、影像学检查相似,常规检查难以鉴别。近来,胰腺癌的细胞和分子生物学的研究取得了较大的进展。虽然至今尚无1种标志物检测有足够的敏感性和特异性筛选、发现早期病例,但由于这一方法快速简便,其研究仍在不断深入。CA19-9是目前临床上最有诊断价值也是应用最多的1种肿瘤相关抗原。不少作者报道CA19-9诊断胰腺癌的敏感性超过90%,准确性可达80%,但特异性较低,约75%。近年又研制了一些肿瘤标志物,如CA494、CA242、CAM17.1、胰岛淀粉样肽(islet amyloid polypeptide, IAPP)等均是希望的新的肿瘤标志物^[23],但仍需进一步临床研究。

影像学鉴别诊断也困难重重,腹部超声、CT等检查常缺乏敏感性及特异性。内镜检查在鉴别诊断中的作用日益受到重视。在胰腺癌影像学诊断中,ERCP具有最高的诊断敏感性和准确性。EUS的准确性可与ERCP媲美,明显优于CT和腹部超声。经过改进已能检出小胰腺癌。对直径<2 cm的小胰腺癌,EUS是最敏感的影像学检查方法^[23]。而EUS引导下细针穿刺活检可提供有确定意义的组织学证据。

联合影像学检查可提高胰腺癌诊断率。单独采用B超、CT诊断率较低,但如与ERCP联合可提高诊断敏感性达90%-95%以上。当与胰腺癌难以鉴别时,可做经皮针吸活组织检查,必要时剖腹探查作活组织检查。

4 慢性胰腺炎的治疗

CP的治疗以控制疼痛、糖尿病和脂肪泻为主。疼痛可能是治疗中最为棘手的难题,内科、外科和内镜治疗均可控制疼痛。

4.1 内科治疗 包括戒酒、积极治疗胆道疾病、必要时补充维生素和中、短链脂肪酸等。胰酶替代治疗可反馈抑制胰腺外分泌,可能机制是CCK-释放肽调控CCK释放介导的。对6项随机前

瞻性双盲研究进行荟萃分析发现, 2项应用胰酶片剂的研究显示有效, 而4项应用胰酶肠溶胶囊的研究无效^[24]. 原因可能为肠溶胶囊中的胰酶不能在十二指肠中释放, 以致无法作用于CCK释放肽. 因此, 胰酶治疗可尝试作为CP治疗的起始, 特别适用于有小胰管疾病的患者或特发性胰腺炎者, 尤其是女性.

4.2 外科治疗 具有下列适应征者可考虑手术: (1) 内科治疗无效的严重腹痛, (2) 内科及微创外科治疗无效的胰腺囊肿、胰腺脓肿、胰瘘, (3) 合并梗阻性黄疸, 十二指肠、结肠梗阻, (4) 可能合并胰腺癌, (5) 胰源性门静脉高压症. 外科减压术的前提是主胰管扩张. 侧向胰腺-空肠造口术是应用最广的胰管减压术, 其疗效十分满意^[25]. 循证医学研究表明, 保留十二指肠或幽门的胰十二指肠切除术可缓解90%患者的疼痛, 而且改善患者生活质量^[26]. 然而对于无胰管扩张者, 切除大部分胰头部组织后将导致相当严重的并发症, 并有发生糖尿病和胰腺外分泌不足的长期危险, 手术的效果并不满意. 近期瑞士的一项长期研究显示, 手术与内科治疗的长期结果并无显著差异, 其原因极可能是“胰腺耗竭”^[27]. 但手术仍被视为内科与内镜治疗失败者的有效治疗手段.

4.3 内镜治疗 随着内镜治疗技术的不断发展, 胰腺疾病的内镜治疗也已广泛开展. 与外科治疗相比, 内镜治疗创伤轻, 具有较低的死亡率, 将其作为缓解胰管梗阻引起腹痛的首选方法已被广泛接受. 对胰管狭窄可采用胰管扩约肌切开术(EPs)、气囊扩张术及胰管支架置放术. Jakobs *et al*^[28]对171例CP患者行EPs, 操作成功率为97.7%, 仅7例出现并发症, 无1例死亡. 作者认为EPs对CP伴腹痛患者疗效明显, 安全且成功率高. 胰管狭窄内镜下放置胰管支架治疗疼痛的有效率可达75%-94%, 但是最近的报道认为其有效率没有那么高^[29-34]. 对胰管结石可行内镜下网篮取石、碎石后气囊取石、体外震波碎石和胰管放置内支架引流. 内镜治疗胰管结石的疼痛缓解率短期可达77%-100%, 长期可达54%-86%^[35-37]. Rosch *et al*^[38]对1000余例患者长期随访的多中心研究表明, 内镜治疗可使2/3的腹痛型梗阻性CP疼痛完全或部分缓解, 但必须指出的是只有疼痛型CP患者才适于行内镜治疗. 外科手术引流曾是治疗胰腺假性囊肿的唯一手段. 近几年来, 经EUS腔内引流假性囊肿已成为重要治疗方法, 并取得较好疗效^[39-40]. 一项

400例CP合并胰腺假性囊肿内镜治疗的研究结果显示, 治疗成功率为80%-95%, 并发症发生率低于手术治疗^[41].

总之, 内镜治疗在CP中应用广泛. 严格掌握适应证和选用合适的内镜治疗方法是取得最佳疗效的保证.

5 慢性胰腺炎的研究热点与难点

目前CP研究的集中在以下几点: (1) 基因突变在CP发生中的作用逐渐受到学者关注. Hanck *et al*^[42]发现CFTR(囊性纤维化跨膜转导调节因子)和SPINK1(Kazal 1型丝氨酸蛋白酶抑制剂)基因突变可增加CP发病风险. Mitchell *et al*^[43]认为急性胰腺炎和CP从基因学角度而言是一种病变的连续发展而非两种不同的疾病. 因此患者对CP的遗传易感性日益受到重视. (2) 研究发现胰腺纤维化的原因可能是胰腺损伤后正常修复机制的调节障碍, 如转化生长因子(TGF- β)等细胞因子表达异常与胰腺组织的纤维化程度有关^[44]. 这些细胞因子的异常表达可造成胰腺细胞生理状态下的功能丧失. (3) 在药物治疗方面, 胃肠激素和抗氧化剂是今后开发和研究方向之一. CCK受体拮抗剂的研究正引起人们的关注. Tandon *et al*^[22]的研究显示, 酒精性胰腺炎患者的抗氧化剂水平低于正常, 难以抵御自由基介导的组织损伤. 补充抗氧化剂使患者镇痛剂需求量明显降低.

但是, CP研究仍有许多难点: (1) 我国学者与欧美学者在胆道系统疾病是否是CP主要病因这个问题上一直存在争议. (2) 在缺乏组织学证据时, CP与胰腺癌的鉴别诊断亦较困难, 一些学者致力于寻找可以早期发现胰腺纤维化的血清标记物, 然而研究结果不能令人满意. (3) 对药物治疗无法控制的疼痛和并发症, 常需手术干预或内镜介入治疗, 但两者的长期疗效和实际效果尚待前瞻性随机对照研究予以确认^[45-46].

6 结论

目前我们对CP的病因和发病机制的认识较前有很大进步. 在将来, 我们可能建立理想的动物模型, 取得一些基因研究和细胞因子研究的突破性进展, 使CP的发病机制得以不断阐明. 多种影像学联合胰腺外分泌功能检查有望早期诊断CP和鉴别胰腺癌, 而胃肠激素和抗氧化剂等新一类药物可降低胰管内压力, 减轻胰腺内氧应激, 是将来的治疗策略之一.

应用要点
本文全面综述了慢性胰腺炎的研究的热点和难点, 对进一步开展慢性胰腺炎的相关研究有一定的指导意义.

名词解释

慢性胰腺炎: 慢性胰腺炎(CP)是由于各种原因引起的以胰腺细胞破坏, 进行性纤维化为主的病变。临床主要表现为反复腹痛、胰腺内、外分泌功能降低, 从而导致脂肪泻、糖尿病。CP病程迁延, 临床表现多样, 严重影响患者的日常生活。

7 参考文献

- Strate T, Knoefel WT, Yekebas E, Izbicki JR. Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 97-106
- 钱家鸣. 慢性胰腺炎的病因. *胃肠病学* 2001; 6: 173-174
- Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Jin CX, Kondo T. Clinical evidence of pathogenesis in chronic pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 669-674
- Pandolfi SJ, Gukovsky I, Satoh A, Lugea A, Gukovskaya AS. Emerging concepts for the mechanism of alcoholic pancreatitis from experimental models. *J Gastroenterol* 2003; 38: 623-628
- O'Sullivan JN, Nobrega FT, Morlock CG, Brown AL Jr, Bartholomew LG. Acute and chronic pancreatitis in Rochester, Minnesota, 1940 to 1969. *Gastroenterology* 1972; 62: 373-379
- Dite P, Stary K, Novotny I, Precechtelova M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 749-750
- Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology* 2002; 2: 469-477
- Otsuki M. Chronic pancreatitis in Japan: epidemiology, prognosis, diagnostic criteria, and future problems. *J Gastroenterol* 2003; 38: 315-326
- 王洛伟, 李兆申, 方裕强, 高俊, 许国铭, 孙振兴. 慢性胰腺炎诊断与治疗临床研究(附262例分析). *解放军医学杂志* 2002; 27: 780-781
- 王洛伟, 李兆申, 李淑德, 陈浮. 慢性胰腺炎全国多中心流行病学调查. *胰腺病学* 2007; 7: 1-5
- Glasbrenner B, Kahl S, Malfertheiner P. Modern diagnostics of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 935-941
- Manfredi R, Brizi MG, Masselli G, Gui B, Vecchioli A, Marano P. Imaging of chronic pancreatitis. *Rays* 2001; 26: 143-149
- Schofl R, Haefner M. Diagnostic cholangiopancreatography. *Endoscopy* 2003; 35: 145-155
- Sahai AV. EUS and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: S76-81
- Bruno MJ. Chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005; 15: 55-62, viii
- Wallace MB, Hawes RH, Durkalski V, Chak A, Mallery S, Catalano MF, Wiersma MJ, Bhutani MS, Ciaccia D, Kochman ML, Gress FG, Van Velse A, Hoffman BJ. The reliability of EUS for the diagnosis of chronic pancreatitis: interobserver agreement among experienced endosonographers. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 294-249
- Kahl S, Glasbrenner B, Leodolter A, Pross M, Schulz HU, Malfertheiner P. EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 507-511
- Hollerbach S, Klamann A, Topalidis T, Schmiegell WH. Endoscopic ultrasonography (EUS) and fine-needle aspiration (FNA) cytology for diagnosis of chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2001; 33: 824-831
- DeWitt J, McGreevy K, LeBlanc J, McHenry L, Cummings O, Sherman S. EUS-guided Trucut biopsy of suspected nonfocal chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 76-84
- Deshpande V, Mino-Kenudson M, Brugge WR, Pitman MB, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL, Lauwers GY. Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy of autoimmune pancreatitis: diagnostic criteria and pitfalls. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1464-1471
- Levy MJ, Reddy RP, Wiersma MJ, Smyrk TC, Clain JE, Harewood GC, Pearson RK, Rajan E, Topazian MD, Yusuf TE, Chari ST, Petersen BT. EUS-guided trucut biopsy in establishing autoimmune pancreatitis as the cause of obstructive jaundice. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 467-472
- Tandon RK, Sato N, Garg PK. Chronic pancreatitis: Asia-Pacific consensus report. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 508-518
- Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic approach to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 709-722, xi
- Brown A, Hughes M, Tenner S, Banks PA. Does pancreatic enzyme supplementation reduce pain in patients with chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 2032-2035
- Sakorafas GH, Zobolas B. Lateral pancreaticojejunostomy in the surgical management of chronic pancreatitis. Current concepts and future perspectives. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 187-191
- Hartel M, Tempia-Caliera AA, Wente MN, Z'graggen K, Friess H, Buchler MW. Evidence-based surgery in chronic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388: 132-139
- Ammann RW, Muellhaupt B. The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 1132-1140
- Jakobs R, Benz C, Leonhardt A, Schilling D, Pereira-Lima JC, Riemann JF. Pancreatic endoscopic sphincterotomy in patients with chronic pancreatitis: a single-center experience in 171 consecutive patients. *Endoscopy* 2002; 34: 551-554
- Cremer M, Deviere J, Delhaye M, Balze M, Vandermeeren A. Stenting in severe chronic pancreatitis: results of medium-term follow-up in seventy-six patients. *Bildgebung* 1992; 59 Suppl 1: 20-24
- Binmoeller KF, Jue P, Seifert H, Nam WC, Izbicki J, Soehendra N. Endoscopic pancreatic stent drainage in chronic pancreatitis and a dominant stricture: long-term results. *Endoscopy* 1995; 27: 638-644
- Smits ME, Badiga SM, Rauws EA, Tytgat GN, Huibregtse K. Long-term results of pancreatic stents in chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 461-467
- Ponchon T, Bory RM, Hedelius F, Roubein LD, Paliard P, Napoleon B, Chavaillon A. Endoscopic stenting for pain relief in chronic pancreatitis: results of a standardized protocol. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 452-456
- Topazian M, Aslanian H, Andersen D. Outcome following endoscopic stenting of pancreatic duct strictures in chronic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 908-911
- Morgan DE, Smith JK, Hawkins K, Wilcox CM. Endoscopic stent therapy in advanced chronic pancreatitis: relationships between ductal changes, clinical response, and stent patency. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 821-826
- Lehman GA. Role of ERCP and other endoscopic modalities in chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: S237-240
- Delhaye M, Arvanitakis M, Verset G, Cremer M, Deviere J. Long-term clinical outcome after endoscopic pancreatic ductal drainage for patients

- with painful chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1096-1106
- 37 Bali MA, Sztantics A, Metens T, Arvanitakis M, Delhaye M, Devière J, Matos C. Quantification of pancreatic exocrine function with secretin-enhanced magnetic resonance cholangiopancreatography: normal values and short-term effects of pancreatic duct drainage procedures in chronic pancreatitis. Initial results. *Eur Radiol* 2005; 15: 2110-2121
- 38 Rosch T, Daniel S, Scholz M, Huibregtse K, Smits M, Schneider T, Ell C, Haber G, Riemann JF, Jakobs R, Hintze R, Adler A, Neuhaus H, Zavoral M, Zavada F, Schusdziarra V, Soehendra N. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: a multicenter study of 1000 patients with long-term follow-up. *Endoscopy* 2002; 34: 765-771
- 39 Jacobson BC, Baron TH, Adler DG, Davila RE, Egan J, Hirota WK, Leighton JA, Qureshi W, Rajan E, Zuckerman MJ, Fanelli R, Wheeler-Harbaugh J, Faigel DO. ASGE guideline: The role of endoscopy in the diagnosis and the management of cystic lesions and inflammatory fluid collections of the pancreas. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 363-370
- 40 Brugge WR. Approaches to the drainage of pancreatic pseudocysts. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 488-492
- 41 Laugier R, Grandval P. Interventional treatment of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 951-955
- 42 Hanck C, Schneider A, Whitcomb DC. Genetic polymorphisms in alcoholic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 613-623
- 43 Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361: 1447-1455
- 44 Menke A, Adler G. TGFbeta-induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 31: 41-46
- 45 Delhaye M, Matos C, Deviere J. Endoscopic management of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13: 717-742
- 46 Copenhagen pancreatitis study. An interim report from a prospective epidemiological multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 1981; 16: 305-312

同行评价
本文内容全面, 应用参考文献较新, 有较好的学术价值。

编辑 何燕 电编 李军亮

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(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611, 影响因子为0.460, 5年影响因子为0.482, 即年指标为0.148, 他引总引比为0.80, 被引期刊数为585, 被引半衰期为4.6, 2006载文量为696, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为17.7. [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].

胰腺肿瘤标志物的研究进展

王 伟, 张飞雄, 李兆申

背景资料
胰腺癌是一种凶险的恶性肿瘤, 早期诊断困难, 预后差, 给患者及其家庭造成了巨大创伤。胰腺肿瘤标志物在胰腺癌的诊断、治疗中发挥了重要作用。本文就目前肿瘤标志物在胰腺癌的诊断、治疗中的研究进展作一综述。

王伟, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
张飞雄, 宁夏医学院附属医院消化内科 宁夏回族自治区银川市 750004
通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. zhsl@81890.net
电话: 021-25070552
收稿日期: 2007-06-30 修回日期: 2007-11-20

Progress in research of pancreatic tumor markers

Wei Wang, Fei-Xiong Zhang, Zhao-Shen Li

Wei Wang, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Fei-Xiong Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, Ningxia Hui zu Autonomous Region, China
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net
Received: 2007-06-30 Revised: 2007-11-20

Abstract

Pancreatic carcinoma is an almost uniformly lethal disease of humans and is associated with the lowest survival rate for any solid cancer, with only 5% of patients surviving 5 years after the diagnosis of pancreatic cancer. However, few effective methods can detect this kind of cancer at its early stage. The term "tumor marker" has been defined as "a naturally occurring molecule that is measured in serum or plasma, or other body fluids or in tissue extracts or in paraffin-embedded tissue to identify the presence of cancer, to assess patient prognosis, or to monitor a patient's response to therapy with the overall goal of improving the clinical management of the patient." The greatest limitation of most studies of serum markers is that they fail to limit their analyses to patients with small, potentially curable pancreatic cancers. Therefore, it appears to be particularly urgent to explore new markers and establish novel diagnostic methods so as to achieve sufficient sensitivity and specificity. We discuss the advantages and disadvantages of different pancreatic tumor markers in improving

the the diagnosis and treatment of pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Tumor marker

Wang W, Zhang FX, Li ZS. Progress in research of pancreatic tumor markers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3604-3610

摘要

胰腺癌早期诊断困难, 预后差, 患者5年生存率小于5%。新近研究报道, 早期发现并切除的胰腺癌患者5年生存率为15%-40%, 因此早期诊断胰腺癌能够有效挽救患者生命。目前一些常用的肿瘤标志物在胰腺癌的诊断、治疗监测及预后评估中起到了重要作用, 但这些指标的特异性和敏感性尚不能满足临床的需要。因此迫切需要寻找新的肿瘤标志物并建立联合诊断的方法来提高胰腺癌的诊疗水平。

关键词: 胰腺炎; 肿瘤标志物

王伟, 张飞雄, 李兆申. 胰腺肿瘤标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3604-3610
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3604.asp>

0 引言

肿瘤标志物(tumor markers, TM)是细胞在肿瘤发生、发展、浸润及转移过程中分泌产生的活性物质。通过检测其在血清、血浆或其他体液、组织提取物以及石蜡切片中的存在或量变可以提示肿瘤的性质, 借以了解肿瘤的组织发生、细胞分化、细胞功能, 以帮助肿瘤的诊断、分类, 进而有效评估患者的预后或监测患者的治疗达到提高临床诊疗水平的总体目标^[1]。目前胰腺癌相关肿瘤标志物主要可以分为3类: A类: 已经进入临床应用并被广泛接受, 有确凿证据表明该标志物具有临床实用价值。B类: 有大量研究肯定其在肿瘤诊断中的作用, 但目前还没有明确的证据提示其临床实用价值。C类: 主要指已经公布的尚处于研究阶段, 仍需要进一步大规模对照研究才能确定其应用价值。本

文就近年来胰腺癌肿瘤标志物的研究进展作一综述.

1 胰腺肿瘤标志物在临床诊疗中的应用价值

1.1 A类标志物

1.1.1 血清分子标志物: 主要包括肿瘤相关抗原CA19-9、CA50(34-40)、CA195^[2], 胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide, IAPP)^[3], 肿瘤相关胰蛋白酶抑制剂(TATI)^[4], 胰腺癌抗原(POA)^[5]、YKL-40^[6], 肿瘤型M2丙酮酸激酶(TUM2-PK)^[7], HIP/PAP^[8]. 诊断价值尚不确定的指标包括癌胚抗原(CEA)^[9], CA72-4^[10], DUPAN-2^[11]和Span-1^[12]. 这些指标将不再进一步讨论.

CA19-9仍是目前诊断胰腺癌的标准血清肿瘤标志物. 欧洲肿瘤标志物组织(EGTM)与美国胃肠病协会(AGA)^[13-14]推荐将其用于胰腺癌的处理, 美国食品暨药物管理局(FDA)已批准CA19-9测定用于胰腺癌患者治疗监测. CA19-9在胰腺癌临床诊断、筛查、预后判断及治疗监测中的实用性价值如下.

诊断: 大量回顾性与前瞻性研究已对CA19-9在胰腺癌诊断中的应用进行了广泛的调查^[15-16], 并评估了其最佳诊断临界值. 一项大样本研究检测了胰腺疾病患者160例(胰腺癌90例, 良性病变70例), 胆道疾病患者322例(胆道癌152例, 良性病变170例)和无症状对照志愿者20035例血清的CA19-9水平, 发现无症状人群CA19-9的血清浓度平均值在 9.42 ± 9.95 U/L, 37 U/L的临界值可准确区分胰腺癌和胰腺良性疾病(灵敏度和特异度值分别为77%和87%)^[17]. 在胰腺癌可疑人群中CA19-9的诊断价值有所提高, 但仍只有适度的灵敏度. 在一项对261例胰腺癌可疑患者的研究中, 血清CA19-9的敏感度为70%, 特异度为87%, 阳性预测值为59%, 阴性预测值为92%^[18]. 1994年一个Meta分析研究报道, 血清CA19-9的平均灵敏度为81%(范围69%-93%), 特异性为91%(范围76%-99%), 诊断临界值采用37 U/L水平^[15]. 有关研究报道, 采用100 U/L水平时CA19-9的诊断特异度为97%^[19], 采用1000 U/L水平时其特异度接近100%^[15,20]. 另外, CA19-9的抗原决定簇为唾液酸化的血型抗原Lewis(a-b-), 他只对分子的非还原端含唾液酸化的Lea结构起特异反应, 而Lewis红细胞表型Le(a-b-)者糖链的合成多停留在CA19-9的前体CA50的阶段. 缺乏这样的非还原端, 因而肿瘤患者中的Le(a-b-)

血清会表现为CA19-9阴性而CA50阳性. Le(a-b-)的人群占白种人口的5%-10%左右, 而有关中国人Le(a-b-)型的比例报道较少, 约在5.9%-23.1%之间^[21]. 在这类人群中可能产生CA19-9的假阴性, 但如果将Lewis(a-b-)抗原因素考虑进去, CA19-9在有症状的胰腺癌患者中的整体诊断灵敏度可达92%^[21]. 结合影像学检查(腹部超声和CT)可提高血清CA19-9的阳性预测值^[19].

CA19-9在胰腺癌诊断中的局限性表现在以下方面. 首先, CA19-9的诊断性与患者胰腺癌的进展程度有关^[9,15]. 对于直径<3 cm的胰腺肿瘤CA19-9的诊断灵敏度显著降低(约55%)^[15]. 因此CA19-9不能满足对小的可治愈肿瘤的早期发现. 其次, CA19-9在其他非胰腺的胃肠道恶性肿瘤以及多种良性疾病中也可升高. 例如梗阻性黄疸, 胆囊炎, 胆管炎, 肝硬化, 急性和慢性胰腺炎等都是CA19-9升高的常见原因^[15]. 鉴于上述原因美国临床生物化学学会(NACB)不主张血清CA19-9检测用于诊断胰腺癌, 欧洲肿瘤标志物组织(EGTM)认为CA19-9检测可以作为胰腺癌影像学诊断的补充手段^[13-14].

筛查: 胰腺癌发病率低, 在无症状者人群中大规模使用高灵敏度的肿瘤标志物进行胰腺癌筛查, 将产生大量的假阳性反应. 最近的一份研究报告中, 70 940例无症状受试者接受CA19-9筛查, 筛选出4例胰腺癌患者的同时出现了1059例假阳性反应, CA19-9阳性预测值仅为0.9%^[22]. 在高危人群筛查中, 许多影像学上发现癌前病灶的患者其血清CA19-9往往处于正常水平^[23]. 例如, 在一项研究中, 14例高风险受检者影像学发现异常并进行全胰腺切除术, 病理提示不典型增生, 但其CA19-9浓度均在正常范围内^[24]. 大量研究证明, 胰腺导管腺癌起源于癌前病变胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN), 而影像学及血清肿瘤标志物都不能及时发现这种微小病变^[25]. 但血清肿瘤标记检测对早期无症状的浸润性胰腺癌的诊断仍非常有价值.

预后判断: 血清CA19-9检测可作为胰腺癌手术选择^[9,20]及预后判断^[23]的独立预测指标. 在一项队列研究中($n = 347$), 肿瘤分期相同的患者经手术治疗后, CA19-9正常组的中位生存期长于非正常组^[21]. 另一项研究提示, 治疗前CA19-9水平是判断生存期一个独立的、显著的指标, 远优于治后的CA19-9反应值($P = 0.0497$)^[26]. 最近研究表明, 术前低CA19-9水平(测不出)预示胰腺癌患者术后较长的生存期. 因此潜在的可手术切除

研发前沿
胰腺癌中存在许多蛋白质的差异表达. 目前, 基因表达谱分析, 以及液相质谱等新研究工具的出现, 为发掘新的胰腺肿瘤标志物开辟了广阔空间. 新的肿瘤标志物可能具有更高的灵敏度、特异度.

创新盘点
本文讨论内容充分, 肿瘤标志物涵盖范围广, 阐述深入, 从科研及临床应用等不同层面讨论了各自的应用价值.

的胰腺癌患者伴有低CA19-9水平(测不出)时, 不论分期应考虑手术治疗^[27]. 欧洲肿瘤标志物组织(EGTM)提出, CA19-9具有评估胰腺癌预后的潜在价值, 但其临床实用价值还未被证实^[14].

治疗监测: 大量研究表明, CA19-9可作为评估胰腺癌姑息化疗的监测指标. 最近的两项研究($n = 89$, 2个研究合并)发现, 化疗8 wk(2个周期)后CA19-9跌幅>20%相对影像学能更好的反应化疗疗效^[28]. 在其他化疗药物的姑息治疗研究中, 也将连续检测CA19-9水平作为判断预后的独立指标^[29]. 相关研究中, 4例行胰腺全切的患者采用吉西他滨和顺铂治疗后得到完全缓解, 其CA19-9水平回降至正常范围; 而4例胰腺部分切除的患者达到部分缓解, 其CA19-9水平下降^[30]. 连续检测CA19-9水平的变化相对单次检测具有更好的灵敏度和特异度. 有研究报道, 连续下降的CA19-9水平反应疗效的敏感度为67%, 预测病程进展的灵敏度为86%^[30]. 另一项研究结果表明, 吉西他滨化疗期间CA19-9水平下降提示肿瘤进展停滞、治疗有效, 应继续治疗; 而CA19-9水平升高提示预后很差, 化疗效果不明显, 进一步化疗值得商榷^[28]. 类似的研究也见于预测胰腺癌放射治疗的疗效反应^[31]. 但由于放射治疗疗程短, 连续检测CA19-9水平不太可行. 当用于跟踪患者放化疗的预后时, 连续检测CA19-9预测疾病复发的灵敏度和特异度较高分别为100%和88%^[31], 但现行准则不主张连续检测CA19-9作为胰腺癌疗效的监测指标. 美国临床生物化学学会(NACB)建议CA19-9连续检测结合影像学检查用于监测患者的治疗反应.

1.1.2 基因分子标志物: 个体遗传易感基因突变是进展为遗传性胰腺癌的高危因素, 常常表现为BRCA2、STK11p(Peutz-Jeghers综合征)、16基因(家族性非典型性多痣性黑色素瘤)、阳离子胰蛋白酶基因PRSSI(遗传性胰腺炎)、FANCC、FANCG以及DNA配修复基因等的缺陷(如遗传性非息肉性结肠癌)^[32-34]. 约10%的家族性胰腺癌患者与BRCA2基因的生殖系突变(germ-line mutation)有关^[35]. 因此, 许多专家建议对有较强胰腺癌家族史特别是其家族中胰腺癌患者存在BRCA2突变的成员要进行BRCA2的生殖系突变检测^[35]. 这样不但可以预防乳腺癌和卵巢癌, 也可通过检测预防胰腺肿瘤的发生^[36]. 有极少数的家族性胰腺癌以及家族性非典型性多痣性黑色素瘤的患者可能存在PI6基因生殖系突变, 但目前尚没有足够证据支持对此类患者

进行PI6基因的检测^[37].

1.1.3 组织分子标志物: 监测胰腺癌中异常表达的特异性分子标志物有助于胰腺癌的诊断. 如胰腺癌细胞均能表达细胞角蛋白cytokeratin(CK), 其中CK7、CK8、CK18、CK19可表达于70%-100%的胰腺癌组织^[37]; 而CK17表达阳性率仅为50%-70%, CK20<20%^[38]. 此外, 大部分腺瘤特别是高分化的内分泌腺瘤不表达CK7. 因此, CK表达谱可有助于胰腺肿瘤类型的诊断. 胰腺导管腺癌(PDAC)也表达上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)和多种肿瘤抗原, 包括癌胚抗原(CEA)、癌抗原19-9(19-9)、CA125和DuPan2等^[38-40]. 约30%的胰腺癌血清CEA升高, 故CEA可作为胰腺癌术后复发和转移的预测指标. 另外, 胰腺组织还表达几种黏蛋白(Mucins), 包括MUC1(相当于胰腺上皮膜抗原EMA), MUC3, MUC4和MUC5AC(胃小凹黏蛋白)^[41]. 1/4的胰腺癌还表达MUC6(幽门腺黏蛋白), 少于10%的胰腺癌表达MUC2. 黏蛋白表达谱有助于区分胰腺导管腺癌和其他类型的胰腺肿瘤. 比如, 导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMNs)表达MUC2而不表达MUC1^[41-42]. MUC4表达目前正处于研究中, 他在胰腺上皮内瘤变PanIN中随瘤变级别的升高而增强^[43], 可有助于鉴别胰腺癌和慢性胰腺炎组织^[44]. 抑癌基因DPC4基因失活可见于55%的胰腺癌而少见于其他肿瘤. Smad4的异常表达提示胰腺癌预后较差^[45-46].

1.2 B类标志物

1.2.1 CA242: CA242是一种唾液酸化的糖脂类抗原, CA242抗原决定簇在唾液酸化的路易氏抗原的Sialy lewis(sLea)黏蛋白上表达. 正常人体胆管细胞、胰管细胞中含少量CA242. CA242主要存在于胰腺和结肠的恶性肿瘤细胞中, 胰腺肿瘤细胞CA242免疫荧光明显强于邻近正常胰腺细胞. 总之, 其在胰腺癌中的诊断价值与CA19-9相似^[47-48]. 有研究报道, CA242检测诊断胰腺癌的敏感度为41%-75%, 特异度为85-95%^[47,49]. 一项对42例胰腺癌患者的研究中, CA19-9(诊断临界值为37 kU/L)和CA242(诊断临界值为20 kU/L)表现出相似的性能, CA242具有更高的特异度(>90%), 而CA19-9具有更好的敏感度(>70%)^[50]. CA242水平检测还可判断预后. 在一项研究中, 排除手术方式和CA19-9水平两个因素后发现, 术前CA242<25 kU/L的患者术后疗效优于术前CA242高水平患者^[51]. CA242与CA19-9相比, 其

优势在于CA242表达不受Lewis抗原和胆汁分泌的影响。总之, CA242已被证明具有类似但不优于CA19-9的诊断性能。在某些情况下如易出现CA19-9假阴性的Le(a-b-)肿瘤患者可采用CA242。

1.2.2 CAM 17.1: CAM 17.1是最近研制的一种IgM抗体, 它是一种黏液型标志物, 对胰液中的黏液糖蛋白有很高的特异性。相关研究报道, CAM17.1诊断胰腺癌的敏感度为67%-78%, 特异度为76%-91%, 其诊断灵敏度与CA19-9相似但可能有较高的特异性(未得到证实)^[52-53]。另一项大型的前瞻性研究($n = 250$)发现, CAM 17.1诊断胰腺癌的敏感度和特异度分别为86%和91%, 在无黄疸的患者中其敏感度和特异度分别为89%和94%^[54], 结合腹部超声其敏感度可进一步增加至94%。还发现高水平CAM17.1, 提示肿瘤晚期而不能手术切除, 因CAM17.1的表达受Lewis抗原的影响^[55], 与CA19-9相似, 但其在7%-10% Le(a-b-)肿瘤患者中的作用受限。

1.2.3 组织多肽特异性抗原: 组织多肽特异性抗原(tissue polypeptide specific antigen, TPS)是细胞角蛋白18片段上的M3抗原决定簇。血清中TPS含量的高低是衡量肿瘤细胞分裂和增殖活性的1个较为特异的指标。研究表明, TPS在肿瘤的早期诊断、预示复发和转移和评价预后方面有独特的价值。有两项回顾性队列研究探讨了TPS在晚期胰腺癌姑息治疗中的作用。其中一项研究显示, TPS相比CA19-9具有更高的敏感性^[56], 但其样本例数较少。另一项研究检测122例怀疑胰腺肿瘤或慢性胰腺炎的患者血清TPS、CA19-9的水平, 发现46例胰腺癌患者100%(46/46)TPS升高(>100 U/L), 而70% (32/46) CA19-9升高(>37 kU/L)。74例慢性胰腺炎患者中TPS和CA19-9升高, 阳性率分别为22%和19%。如果TPS采用200 U/L的临界值, 其在鉴别胰腺癌和慢性胰腺炎时的敏感性为97%, 特异性为98%^[57]。这些数据表明, TPS可能在检测早期胰腺癌和监测治疗反应中发挥作用, 但需进一步研究加以明确。

1.3 C类标志物

1.3.1 巨噬细胞抑制因子1: 巨噬细胞抑制因子1(MIC-1)可在胰腺癌、大肠癌、前列腺癌等肿瘤中过度表达。血清MIC-1水平检测可反映大肠癌的进展及预后^[58]。最近, 一项研究采用ELISA方法检测326例患者(可切除的胰腺癌患者80例, 可切除的壶腹与胆管癌患者30例, 其他胰腺肿瘤患者42例, 慢性胰腺炎77例和正常对照97例)

血清标本中MIC-1、CA19-9水平, 发现MIC-1在胰腺肿瘤诊断中的敏感度为71%, 特异度为78%(诊断临界值为1070 ng/L), 而CA19-9有相似的性能(受试者工作特征曲线, ROC; ROC曲线下的面积, AUC: MIC-1为0.81, CA19-9为0.77)。结合MIC-1和CA19-9可显著提高诊断的准确性(ROC为0.87)。改良后的MIC-1与CA19-9及其他指标相比较, MIC-1升高在可切除的胰腺癌患者中阳性率为96%, 在慢性胰腺炎患者中为42%。ROC曲线分析其诊断的准确性显著优于CA19-9(Koopmann *et al*, 未发表)。

1.3.2 骨桥蛋白: 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种具有多种生物学活性的分泌型磷酸化糖蛋白, 分子量为41.5 kDa。OPN基因的表达具有组织细胞特异性并且受多种激素、生长因子、原癌基因表达产物的调控。骨桥蛋白可以促进肿瘤细胞的趋化、黏附和迁移。近年来, 大量研究发现OPN在肿瘤的复发与转移过程中起重要作用, 被认为是肿瘤早期诊断、复发和预后判断的1个新指标^[59]。骨桥蛋白在肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、食道癌和卵巢癌中高表达^[60]。基因表达谱芯片技术发现胰腺癌中OPN基因在mRNA水平高表达^[61]。作为分泌型蛋白, ELISA可检测患者血清中OPN蛋白。一项针对50例胰腺癌和22例正常对照的研究发现, OPN蛋白对胰腺癌的诊断作用优于CA19-9, 敏感度为80%, 特异度为97%(临界值为334 μ g/L)。

1.3.3 金属蛋白酶抑制剂-1: 血浆1型组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)在胰腺癌组织中过度表达, 被认为是胰腺癌的潜在分子标志物^[62]。血浆TIMP-1水平升高在判断大肠癌和乳腺癌患者预后上有重要作用。ELISA检测胰腺癌患者($n = 85$)和正常人($n = 98$)血清TIMP-1水平发现, TIMP-1的诊断性能并不优于CA19-9。相关研究联合检测血清TIMP-1、CA19-9和CEA水平发现, TIMP-1诊断特异度为100%时其敏感度仅为60%(特异性优化临界值), 特异度为95%时的敏感度为81%(灵敏度优化临界值), 提示TIMP-1为潜在的联合检测指标^[62]。TIMP-1在不同体液中的检测(血浆与血清)及其在胰腺癌诊断中的价值仍需进一步研究。

2 胰腺肿瘤标志物的研究现状

胰腺癌中存在许多蛋白质的差异表达。如间皮素(mesothelin)在将近100%胰腺癌中表达, 被证明是一个有效的肿瘤抗原^[63]。其他在胰腺癌

应用要点
本文以相关研究为基础, 评价了不同类型肿瘤标志物在胰腺癌及胰腺炎临床实际应用的价值, 对临床实际工作具有较好的参考价值。

同行评价
本文选题新颖, 内容丰富, 条理清楚, 思路清晰, 分析全面, 有一定的科学性和较强的可读性.

中过表达的蛋白包括前列腺干细胞抗原PSCA, Fascin蛋白(95%), Claudin-4蛋白, 14-3-3 σ 蛋白, 谷氨酰胺转移酶2(transglutaminase), CDC25B, ADAM9, cdc2/p34, 热休克蛋白HSP47, 三叶因子2(trefoil factor 2, TFF2)^[64]和DNA拓扑异构酶II α (Topo II α) (95%)^[65]. 若干S100蛋白家族成员^[66-67]和有丝分裂激酶Aurora家族成员以及2个kallikreins基因家族成员KLK6和KLK10在胰腺癌中的表达均大幅上调^[68]. 这些指标的临床实用性还没有得到证实. 目前, 基因表达谱分析已成为发掘判断胰腺癌预后指标的工具, 但由于胰腺癌预后极差, 并没有被广泛研究. 有些标志物可以用于预测, 如术前检测Claudin-4蛋白, S100A4, Mesothelin可以预测IPMN的良恶性^[68], 有助于手术方式的选择. COX-2是Hedgehog通路的调节分子, 在大多胰腺癌中过表达, 被认为胰腺癌治疗的潜在靶标^[67-68].

确定新的分子靶标来建立胰腺癌诊疗的新方法日趋重要. 例如, 研究发现范科尼贫血通路中的基因在一小部分胰腺癌细胞中失活, 而這些细胞对特定的化疗药物, 如丝裂霉素高敏感, 这也许可以解释临床上丝裂霉素治疗的间断反应^[69]. 预计随着更多治疗方案的出现, 我们需要发掘更加准确的分子标志物来评估不同信号通路的状态, 进而帮助确定某一特定疗法是否适合胰腺癌的个体化治疗.

总之, 虽然CA19-9仍是目前最常用的胰腺肿瘤标志物, 但多个新的指标正处于研究中. 这些标志物将不仅方便胰腺癌的早期诊断而且还有助于诊断胰腺癌的癌前病变. 随着我们对胰腺肿瘤发病机制认识的逐渐深入, 发掘新的分子标志物并结合影像学检查定能帮助我们突破胰腺癌的诊治难关.

3 参考文献

- Fleisher M, A.M. D, Sturgeon CM, Lamerz R, Witliff JL. Tumor markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications. Chicago: AACC press; 2002. 32
- Hyoty M, Hyoty H, Aaran RK, Airo I, Nordback I. Tumour antigens CA 195 and CA 19-9 in pancreatic juice and serum for the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Eur J Surg* 1992; 158: 173-179
- Chari ST, Klee GG, Miller LJ, Raimondo M, DiMagno EP. Islet amyloid polypeptide is not a satisfactory marker for detecting pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 640-645
- Pasanen PA, Eskelinen M, Partanen K, Pikkarainen P, Penttilä I, Alhava E. Tumour-associated trypsin inhibitor in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 494-497
- Shahangian S, Fritsche HA Jr, Hughes JL, Gelder FB. Pancreatic oncofetal antigen and carbohydrate antigen 19-9 in sera of patients with cancer of the pancreas. *Clin Chem* 1989; 35: 405-408
- Fukushima N, Koopmann J, Sato N, Prasad N, Carvalho R, Leach SD, Hruban RH, Goggins M. Gene expression alterations in the non-neoplastic parenchyma adjacent to infiltrating pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 779-787
- Schneider J, Schulze G. Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 5089-5093
- Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- Schlieman MG, Ho HS, Bold RJ. Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg* 2003; 138: 951-955; discussion 955-956
- Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22: 2311-2316
- Kawa S, Oguchi H, Kobayashi T, Tokoo M, Furuta S, Kanai M, Homma T. Elevated serum levels of Dupan-2 in pancreatic cancer patients negative for Lewis blood group phenotype. *Br J Cancer* 1991; 64: 899-902
- Frena A. SPan-1 and exocrine pancreatic carcinoma. The clinical role of a new tumor marker. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 189-197
- DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 1999; 117: 1464-1484
- Tumour markers in gastrointestinal cancers--EGTM recommendations. European Group on Tumour Markers. *Anticancer Res* 1999; 19: 2811-2815
- Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 350-355
- Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2004; 28: 263-267
- Kim HJ, Kim MH, Myung SJ, Lim BC, Park ET, Yoo KS, Seo DW, Lee SK, Min YI. A new strategy for the application of CA19-9 in the differentiation of pancreaticobiliary cancer: analysis using a receiver operating characteristic curve. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1941-1946
- Pleskow DK, Berger HJ, Gyves J, Allen E, McLean A, Podolsky DK. Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1989; 110: 704-709
- Ritts RE Jr, Nagorney DM, Jacobsen DJ, Talbot RW, Zurawski VR Jr. Comparison of preoperative serum CA19-9 levels with results of diagnostic imaging modalities in patients undergoing laparotomy for suspected pancreatic or gallbladder disease.

- Pancreas* 1994; 9: 707-716
- 20 Forsmark CE, Lambiase L, Vogel SB. Diagnosis of pancreatic cancer and prediction of unresectability using the tumor-associated antigen CA19-9. *Pancreas* 1994; 9: 731-734
 - 21 Safi F, Schlosser W, Falkenreck S, Beger HG. CA 19-9 serum course and prognosis of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1996; 20: 155-161
 - 22 Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 182-186
 - 23 Canto MI, Goggins M, Hruban RH, Petersen GM, Giardiello FM, Yeo C, Fishman EK, Brune K, Axilbund J, Griffin C, Ali S, Richman J, Jagannath S, Kantsevov SV, Kalloo AN. Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 766-781; quiz 665
 - 24 Brentnall TA, Bronner MP, Byrd DR, Haggitt RC, Kimmey MB. Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1999; 131: 247-255
 - 25 Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 977-987
 - 26 Saad ED, Machado MC, Wajsbrot D, Abramoff R, Hoff PM, Tabacof J, Katz A, Simon SD, Gansl RC. Pretreatment CA 19-9 level as a prognostic factor in patients with advanced pancreatic cancer treated with gemcitabine. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 32: 35-41
 - 27 Berger AC, Meszoely IM, Ross EA, Watson JC, Hoffman JP. Undetectable preoperative levels of serum CA 19-9 correlate with improved survival for patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 644-649
 - 28 Ziske C, Schlie C, Gorschluter M, Glasmacher A, Mey U, Strehl J, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with inoperable adenocarcinoma of the pancreas treated with gemcitabine. *Br J Cancer* 2003; 89: 1413-1417
 - 29 Stemmler J, Stieber P, Szymala AM, Schalhorn A, Schermuly MM, Wilkowski R, Helmberger T, Lamerz R, Stoffregen C, Niebler K, Garbrecht M, Heinemann V. Are serial CA 19-9 kinetics helpful in predicting survival in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer treated with gemcitabine and cisplatin? *Onkologie* 2003; 26: 462-467
 - 30 Heinemann V, Schermuly MM, Stieber P, Schulz L, Jungst D, Wilkowski R, Schalhorn A. CA19-9: a predictor of response in pancreatic cancer treated with gemcitabine and cisplatin. *Anticancer Res* 1999; 19: 2433-2435
 - 31 Micke O, Bruns F, Kurowski R, Horst E, deVries AF, Hausler JW, Willich N, Schafer U. Predictive value of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer treated with radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 90-97
 - 32 Klein AP, Beaty TH, Bailey-Wilson JE, Brune KA, Hruban RH, Petersen GM. Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. *Genet Epidemiol* 2002; 23: 133-149
 - 33 van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2585-2588
 - 34 Petersen GM, Hruban RH. Familial pancreatic cancer: where are we in 2003? *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 180-181
 - 35 Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campa D, Grutzmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP, Bartsch DK. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 214-221
 - 36 Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, Griffin C, Axilbund JE, Brune K, Ali SZ, Jagannath S, Petersen GM, Fishman EK, Piantadosi S, Giardiello FM, Hruban RH. Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 606-621
 - 37 Rutter JL, Bromley CM, Goldstein AM, Elder DE, Holly EA, Guerry D 4th, Hartge P, Struewing JP, Hogg D, Halpern A, Sagebiel RW, Tucker MA. Heterogeneity of risk for melanoma and pancreatic and digestive malignancies: a melanoma case-control study. *Cancer* 2004; 101: 2809-2816
 - 38 Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, Griffin C, Axilbund JE, Brune K, Ali SZ, Jagannath S, Petersen GM, Fishman EK, Piantadosi S, Giardiello FM, Hruban RH. Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 606-621
 - 39 Balague C, Audie JP, Porchet N, Real FX. In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues. *Gastroenterology* 1995; 109: 953-964
 - 40 Shimizu M, Saitoh Y, Ohyanagi H, Itoh H. Immunohistochemical staining of pancreatic cancer with CA19-9, KM01, unabsorbed CEA, and absorbed CEA. A comparison with normal pancreas and chronic pancreatitis. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 195-200
 - 41 Luttges J, Zamboni G, Longnecker D, Kloppel G. The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous noncystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 942-948
 - 42 Adsay NV, Merati K, Andea A, Sarkar F, Hruban RH, Wilentz RE, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Longnecker DS, Klimstra DS. The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Mod Pathol* 2002; 15: 1087-1095
 - 43 Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, Wilentz RE, Hruban RH, Argani P. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 791-796
 - 44 Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Buchler MW, Aubert JP, Batra SK. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res*

- 2001; 7: 4033-4040
- 45 Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4115-4121
- 46 Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000; 60: 2002-2006
- 47 Haglund C, Lundin J, Kuusela P, Roberts PJ. CA 242, a new tumour marker for pancreatic cancer: a comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA. *Br J Cancer* 1994; 70: 487-492
- 48 Plebani M, Basso D, Navaglia F, D'Angeli F, Panozzo MP, Del Giudice G, Battistel M, Meggiato T, Del Favero G. Is CA242 really a new tumour marker for pancreatic adenocarcinoma? *Oncology* 1995; 52: 19-23
- 49 Ventrucchi M, Ubalducci GM, Cipolla A, Panella MA, Ligabue A. Serum CA 242: the search for a valid marker of pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 179-184
- 50 Banfi G, Bravi S, Ardemagni A, Zerbi A. CA 19-9, CA 242 and CEA in the diagnosis and follow-up of pancreatic cancer. *Int J Biol Markers* 1996; 11: 77-81
- 51 Lundin J, Roberts PJ, Kuusela P, Haglund C. Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA 19-9. *Anticancer Res* 1995; 15: 2181-2186
- 52 Gansauge F, Gansauge S, Parker N, Beger H, Poch B, Link KH, Safi F, Beger HG. CAM 17.1--a new diagnostic marker in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 1997-2002
- 53 Parker N, Makin CA, Ching CK, Eccleston D, Taylor OM, Milton JD, Rhodes JM. A new enzyme-linked lectin/mucin antibody sandwich assay (CAM 17.1/WGA) assessed in combination with CA 19-9 and peanut lectin binding assay for the diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer* 1992; 70: 1062-1068
- 54 Yiannakou JY, Newland P, Calder F, Kingsnorth AN, Rhodes JM. Prospective study of CAM 17.1/WGA mucin assay for serological diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet* 1997; 349: 389-392
- 55 Eccleston DW, Milton JD, Hoffman J, Bara J, Rhodes JM. Pancreatic tumour marker anti-mucin antibody CAM 17.1 reacts with a sialyl blood group antigen, probably I, which is expressed throughout the human gastrointestinal tract. *Digestion* 1998; 59: 665-670
- 56 Glimelius B, Hoffman K, Einarsson R, Pahlman L, Graf W. Monitoring palliative chemotherapy in advanced gastrointestinal cancer using serial tissue polypeptide specific antigen (TPS) measurements. *Acta Oncol* 1996; 35: 141-148
- 57 Slesak B, Harlozinska-Szmyrka A, Knast W, Sedlaczek P, van Dalen A, Einarsson R. Tissue polypeptide specific antigen (TPS), a marker for differentiation between pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis. A comparative study with CA 19-9. *Cancer* 2000; 89: 83-88
- 58 Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, Bauskin AR, Kinzler KW, Vogelstein B, Breit SN. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2642-2650
- 59 Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004; 90: 1877-1881
- 60 Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001; 1: 621-632
- 61 Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, Walter K, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2002; 160: 1239-1249
- 62 Zhou W, Sokoll LJ, Bruzek DJ, Zhang L, Velculescu VE, Goldin SB, Hruban RH, Kern SE, Hamilton SR, Chan DW, Vogelstein B, Kinzler KW. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 109-112
- 63 Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 2004; 200: 297-306
- 64 Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruzsniowski P, Sauvanet A, Lemoine NR. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1745-1754
- 65 Guo J, Kleeff J, Li J, Ding J, Hammer J, Zhao Y, Giese T, Korc M, Buchler MW, Friess H. Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2004; 23: 71-81
- 66 Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 2004; 164: 903-914
- 67 Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, Rahman A, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Hruban RH, Wilentz RE. Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 194-201
- 68 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851
- 69 van der Heijden MS, Brody JR, Gallmeier E, Cunningham SC, Dezentje DA, Shen D, Hruban RH, Kern SE. Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2004; 165: 651-657

VEGF/VEGFR2信号转导通路在抗肿瘤血管生成中的作用

杨军, 陈明清, 董坚

杨军, 陈明清, 董坚, 昆明医学院第一附属医院 云南省昆明市 650032
云南省自然科学基金资助课题, No. 2005C0073M
昆明医学院创新群体基金资助课题, No. KMC2005DG01
通讯作者: 陈明清, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院肿瘤科. yougjen@yahoo.com.cn
电话: 0871-5361621 传真: 0871-5361621
收稿日期: 2007-08-13 修回日期: 2007-10-25

Progress in anti-tumor angiogenesis research with VEGF/VEGFR2 pathway as a target

Jun Yang, Ming-Qing Chen, Jian Dong

Jun Yang, Ming-Qing Chen, Jian Dong, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Supported by: the Natural Science Fund of Yunnan Province, No. 2005C0073M and the Inaugurate Colony Research Fund of Kunming Medical College, No. KMC2005DG01
Correspondence to: Dr. Ming-Qing Chen, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. yougjen@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-13 Revised: 2007-10-25

Abstract

The strategy of inhibiting angiogenesis by targeting tumor vascular endothelial cells, thereby blocking the blood supply to tumors, has become a hot topic in the field of anti-tumor growth and metastasis. The VEGF/VEGFR2 pathway plays a central role in tumor vasculature. Blocking it may achieve the purpose of inhibiting the growth and metastasis of cancer. This paper reviews the progress in studies of the VEGF/VEGFR2 signaling pathway in terms of anti-tumor growth and metastasis.

Key Words: Vascular endothelial growth factor/Vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway; Anti-tumor angiogenesis

Yang J, Chen MQ, Dong J. Progress in anti-tumor angiogenesis research with VEGF/VEGFR2 pathway as a target. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3611-3616

摘要

以肿瘤血管内皮细胞为靶点抑制肿瘤血管生成从而阻断肿瘤血液供应已成为当前抗肿瘤生长和转移的研究热点. 其中, VEGF/VEGFR2信号转导通路在肿瘤周围血管生成起主要作用. 阻断该信号通路, 能够抑制实体瘤的生长和转移. 本文就VEGF/VEGFR2信号通路在抗肿瘤生长和转移中的研究进展作一概述.

关键词: 血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体信号通路; 抗肿瘤血管生成

杨军, 陈明清, 董坚. VEGF/VEGFR2信号转导通路在抗肿瘤血管生成中的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3611-3616
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3611.asp>

0 引言

肿瘤的生长和转移依赖其周围新生血管的形成, 阻断肿瘤组织的血液供应以达到抑制实体瘤的生长和转移的方法由folkman首先提出, 这为肿瘤的治疗提供了一条新的思路. 已有研究表明, 血管内皮细胞生长因子(VEGF)受体信号转导途径参与肿瘤周围新生内皮细胞的迁移、增殖、生存, 在肿瘤周围血管新生过程中具有重要的作用. 因此, VEGF受体信号转导途径可作为抗肿瘤治疗方案的理想靶点, 本文针对血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)及其信号转导途径与肿瘤治疗的研究现状予以综述.

1 血管生成与肿瘤

早期肿瘤在很长一段时间内处于休眠期, 仅仅依靠周围组织液渗透维持其生长^[1-3]. 当肿瘤生长到1.0-2.0 mm³时, 周围组织已经不能满足肿瘤生长需要的氧供, 营养物质供应和代谢物的清除. 在肿瘤组织缺氧的情况下, 缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)表达增强, 促进自身促血管生长因子如VEGF等的表达上调, 刺激内皮细胞活化, 分泌出其他血管生成所需要的

背景资料

血管生成对于肿瘤的生长及转移具有极重要的作用. 研究证实可以通过抑制肿瘤周围新生血管生成以达到抗肿瘤的目的. 血管内皮细胞生长因子受体信号转导途径在肿瘤周围新生内皮细胞的迁移、增殖、生存以及肿瘤周围血管新生过程中具有重要的作用. 因此, VEGF受体信号转导途径可作为抗肿瘤治疗方案的理想靶点.

研发前沿

当前,以肿瘤周围新生血管生成的各个环节及其发生过程中的生化改变为靶点,研制血管生成抑制剂,控制肿瘤生长和转移。针对VEGF/VEGFR2信号转导通路的各类新药的研制以及临床前期应用研究是当前研究热点。虽然应用此类新药进行治疗性血管生成的研究已取得了可喜的成果,但仍有许多问题亟待解决,如运用VEGF及VEGFR2进行基因治疗的疗效对比、局部用药和全身用药的比较、用药剂量的确定以及如何提高疗效的同时降低潜在的风险等问题都还有待进一步研究。

蛋白酶以降解基底膜和细胞外基质,使内皮细胞呈游离状态,游离的内皮细胞向刺激因子迁移,在迁移过程中,破坏前进端的基底膜,并开始形成血管的雏形,同时,内皮细胞在VEGF等刺激因子作用下增殖,大量增殖的内皮细胞重新排列形成条索状,刺激成纤维细胞分泌细胞外基质,形成新的血管。

2 VEGF/VEGFR2信号通路

迄今为止,已发现两种信号转导途径的VEGF受体:酪氨酸激酶受体和非酪氨酸激酶受体。前者包括血管内皮生长因子受体-1(VEGFR1, Flt-1)、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2, KDR)及血管内皮生长因子受体-3(VEGFR3),后者包括肝素样分子、神经纤毛蛋白-1受体和神经纤毛蛋白2受体^[4-6]。研究证实,VEGFR2在VEGF的信号转导及血管内皮生成中起主导作用。因此,VEGFR2成为当前抗肿瘤血管生成研究中的热点。

VEGFR2是VEGF的主要功能受体,人的VEGFR2称为KDR(kinase inserted domain-containing receptor),鼠的VEGFR2称为flk-1(fetal liver kinase-1)。VEGFR2作为一种酪氨酸激酶受体,由一个胞外结构域,一个跨膜结构域和一个胞质内酪氨酸激酶结构域组成,其胞外结构域含7个免疫球蛋白样域^[7]。研究证实,VEGFR2胞外段是VEGFR2与其配体VEGF相结合的部位,VEGFR2胞外第1个样域是与VEGF结合的必要部位,第2-3样域是与VEGF紧密结合的主要部位,受体通过第4个Ig样区形成同源二聚体的活性形式,而第5-7样域与VEGF结合的关系不密切^[8]。

VEGFR2与VEGF结合,形成二聚体及酪氨酸发生自身磷酸化,激活并将细胞膜/细胞质激酶级联反应信号传递到细胞核,可引发内皮细胞的一系列变化,包括钙离子内流、IP₃的增加、VonWillebrand因子的释放以及胎儿血管内皮金属蛋白酶、凝血酶的产生,诱导整合素的表达,调节与纤维蛋白溶解和凝固相关的因子在内皮上的表达,如Vwf、组织因子。这些级联反应通过抗凋亡等机制调节内皮细胞的存活,促进新生血管形成并维持其完整性。另外,VEGF刺激VEGFR2,介导肿瘤血管内皮细胞DNA合成和增殖。VEGF诱导内皮细胞的增殖、迁移。此外,VEGFR2还参与由VEGF介导的血管通透性改变^[9-11]。

3 针对VEGF/VEGFR2信号转导通路的抗肿瘤策略

肿瘤特有的微环境刺激VEGF和VEGFR2在肿瘤细胞和肿瘤周围内皮细胞特异性表达,使之较正常组织中VEGF和VEGFR2的表达明显增加。而很多抗肿瘤药物如奥曲肽、干扰素、中草药及其衍生物等也具有抑制VEGF、抗血管生成的作用^[12-15]。这提示,通过阻断VEGF/VEGFR2信号转导通路抑制肿瘤新生血管生成是一种有效的抗癌治疗方案。目前开展的阻断VEGF/VEGFR2信号转导通路的抗肿瘤研究策略如下。

3.1 在基因水平下调VEGF的表达 在基因水平上降低体内VEGF的表达水平,可以减少VEGF对于肿瘤周围新生血管的刺激,以达到降低新生血管生成的目的,目前常用以下几种方法。

3.1.1 反义核苷酸抑制VEGF基因的表达: 在肿瘤基因治疗方案中反义核酸技术是很有吸引力的手段之一。VEGF反义核苷酸(VEGF-ODN)是根据VEGF mRNA碱基序列第3个外显子单链区互补设计而成,VEGF-ODN通过与VEGF mRNA上特定的靶序列结合阻断VEGF mRNA翻译以抑制或阻断肿瘤细胞VEGF蛋白质的表达从而抑制肿瘤血管的生成^[16]。王宏光 *et al*^[17]采用人工合成反义核苷酸导入能表达VEGF的人肝癌细胞系7721。结果证实,VEGF反义核苷酸能有效抑制VEGF的表达。VEGF-ODN进入细胞后与VEGFR mRNA特异性结合后产生空间位阻效应,从而阻止mRNA的翻译并激活体内RNase酶降解mRNA,最终阻断VEGF和VEGFR的结合从而下调VEGF。任娟 *et al*^[18]用KDR反义核苷酸作用于人胃腺癌细胞,观察发现KDR反义核苷酸能够抑制细胞内KDR基因的表达,并显著抑制胃癌细胞的增殖。

3.1.2 利用核酶降低VEGF的表达: 核酶(ribozyme, Rz)是一类具有生物催化活性的RNA分子,能够定点切割特定的mRNA靶分子,从而有效地阻断特定基因的表达,发挥其生物学作用。研究发现核酶可特异作用于VEGF mRNA的某些位点,使其断裂成核苷酸片段,从而降低VEGF的表达^[19]。Gong *et al*^[20]检测了抗VEGF核酶对VEGF基因外显子的作用。将其导入HLF细胞系后,发现该核酶不仅能降低VEGF mRNA的水平,还导致VEGF蛋白合成减少。

3.1.3 利用抑癌基因调控VEGF的表达: 抑癌基因P53在调控肿瘤血管生成中具有重要作用^[21]。Blagosklonny *et al*^[22]证实,抑癌基因产物P53通过

结合HIF2-A/P300和促进MDM2介导的HIF-1A的泛素化和失活, 最终导致VEGF表达量下降, 说明抑癌基因在肿瘤从无血管期向血管期过渡的关键环节中发挥作用, 且这一作用与VEGF表达显著相关^[23].

3.2 在蛋白水平阻断VEGF/VEGFR2的结合

3.2.1 中和抗体阻断VEGF/VEGFR2的结合:

VEGF抗体与VEGFR2具有高亲和力, 可以阻碍VEGF与VEGFR2的结合而抑制VEGF的活性. Borgstrom *et al*^[24]将人横纹肌肉瘤细胞A673种植于小鼠, 肿瘤细胞用荧光染料VITAL标记, 然后ip VEGF mAb, 观察VEGF抗体对小鼠肿瘤新生血管及生长状况的作用. 结果发现肿瘤新生血管完全被抑制, 肿瘤体积<1 mm³, 处于休眠状态, 表明VEGF mAb对肿瘤新生血管的抑制作用很明显. 杨治华 *et al*^[25]用具有中和活性的抗VEGF mAb进行抑瘤动物实验, 观察发现VEGF mAb能阻断肿瘤血管的形成, 显著抑制乳腺癌的生长和转移.

抗VEGFR2抗体是通过阻止VEGF与受体的结合而发挥作用. 实验研究表明, 直接针对VEGF受体的mAb可以抑制肿瘤的生长和转移^[26-28]. 由美国纽约ImClone研制出的针对鼠flk-1的mAb DC101^[29], 可以与受体的细胞外结构域结合, 强有力地拮抗VEGF与VEGFR-2的结合以及产生的信号传导, 还能在体外拮抗VEGF诱导的内皮细胞生长. 鉴于DC101在动物实验中所显现的抗癌疗效^[30-33], 人KDR mAb的研制工作也被大大推进. IMC-1C11^[34]便是具有高亲和力的抗KDR二聚体, 能够特异性阻断VEGF和KDR的相互作用, 中和VEGFR的活性, 抑制血管内皮细胞有丝分裂^[35].

3.2.2 可溶性受体阻断VEGF与VEGFR2的结合:

研究发现, 采用基因重组的方法可以诱导可溶性受体的产生. 由于可溶性受体(soluble VEGFR, sVEGFR)仅具有与VEGF结合的能力, 而无信号传导功能, 因此可用sVEGFR竞争性结合VEGF. sVEGFR与VEGF结合后, 耗竭肿瘤细胞产生的VEGF, 从而抑制VEGF诱导的生物学活性, 阻断VEGF与VEGFR2的结合, 达到抑制肿瘤生长的目的. Niethammer *et al*^[36]将VEGFR2全长cDNA序列插入真核载体pcDNA3.1(+)构建重组质粒, 再将重组质粒转化减毒鼠沙门氏菌SL7207, 通过胃饲小鼠, 发现其对于实体瘤血管生成以及肿瘤生长有明显抑制作用. Lu *et al*^[37]

将VEGFR2胞外1-3片段扩增以后插入真核载体pcDNA3.1(+), 通过肌注观察其抗皮下小鼠肝癌模型作用, 结果发现其对小鼠皮下肿瘤有明显的抑制作用.

3.2.3 阻断VEGF与VEGFR2结合后的信号传导:

由于VEGFR2为酪氨酸激酶受体, 当VEGF与VEGFR2结合后, 受体首先自身磷酸化, 继而激活磷脂酰肌醇代谢的信号转导通路和丝裂原活化的蛋白激酶, 表现出VEGF的有丝分裂原特性, 诱导血管内皮细胞的增殖^[38]. 因此, 通过抑制酪氨酸激酶的活性来阻断肿瘤血管生成因子的信号传导途径成为人们研究的热点, 而酪氨酸激酶受体抑制物也相继进入临床实验^[39-41]. 由Sugen公司开发的SU5416是第一个进行临床试验的VEGFR激酶抑制剂, 是针对KDR/Flk-1受体酪氨酸激酶信号途径的小分子抑制物, 在I/II期临床试验中分别与顺铂和健择联合. 但由于该药易出现意外的严重血栓栓塞并发症, 导致试验终止^[42]. 随后, Sugeng公司开发了另一种以KDR/Flk-1, PDGF受体和FGF受体为靶点的广泛RTK抑制剂SU6668. I期临床试验中每天一次的剂量具有良好的耐受性, 但每天两次的剂量却发生严重不良反应如乏力、呼吸困难、胸痛、心包积液, 且没有显示出临床疗效^[43]. 此后, 新一代广谱的口服酪氨酸激酶抑制剂SU11248问世, 它能够抑制VEGF, PDGF, c-Kit和Flt-3的激酶活性, 并在临床前的模型中显示出显著疗效, 目前已进入III期临床试验^[44].

此外, 在VEGF/VEGFR2信号转导通路中的关键蛋白质如接头蛋白PLC- γ ^[45-46], Sck^[47-48]及信号分子PI3K, p38MAPK和DAG等^[49-50]在肿瘤血管生成中也发挥重要作用. 阻断肿瘤组织中这些分子可下调血管内皮细胞体外血管生成, 有可能起到抗肿瘤作用.

3.3 导向治疗以破坏血管内皮细胞

将VEGF与小分子毒性物质结合或将VEGFR mAb与药物交联, 进行内皮细胞导向治疗, 从而杀伤或抑制表达VEGFR的血管内皮细胞生长. Wild *et al*^[51]将白喉毒素DT385与VEGF121结合形成共价复合体, 实验表明该复合体在体外可抑制内皮细胞株的生长, 在体内能特异性抑制肿瘤细胞的血管生成, 明显抑制裸鼠移植瘤的生长. 且这种抑制作用呈现剂量依赖性, 同时在瘤内还可发挥毒素的杀伤作用, 直接破坏肿瘤细胞和肿瘤局部的血管床, 现已进入I期临床试验.

应用要点
本文比较全面的综述了近年来对于VEGF及其信号转导途径在抗肿瘤基础研究以及临床实验方面的最新研究成果, 并且对其进行了归类介绍. 针对VEGF/VEGFR2信号通路抗血管生成研究是当前抗肿瘤研究热点, 很多针对VEGF以及VEGFR2的药物已经进入临床试验甚至进入市场.

名词解释

VEGF/VEGFR2信号通路: VEGF的主要生物学功能都是通过VEGFR2实现的。VEGFR2和VEGF结合后发生二聚体化, 并且胞内的酪氨酸残基自身磷酸化, 从而激活并将细胞膜/细胞质激酶级联反应信号传递到细胞核, 可引发内皮细胞的一系列变化, 包括血管内皮细胞增殖、存活、细胞骨架重排、细胞迁移以及基因表达等, 并最终引起血管增生。

4 结论

肿瘤微生态系统理论认为, 肿瘤细胞的生物学行为是肿瘤微生态系统重建其系统内营养联系的结果, 而肿瘤的血管化是其重建营养联系的一种表现。因此, 干扰肿瘤的血管化过程是抑制肿瘤的有效途径。而开发血管生成抑制剂治疗肿瘤已经成为当前抗肿瘤研究领域的一大热点。随着人们对血管生成调节因子及其功能认识的不断深入, VEGF/VEGFR2及其介导的信号转导通路在肿瘤发生、发展中的关键作用逐渐被人们所认识, 并在该领域取得较大的研究进展。尽管如此, 许多问题仍有待于进一步的阐明。如VEGFR2除了在血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞表达外, 也在造血干细胞和巨核细胞中表达。对于其在两者中分布的生物学意义及相关信号转导通路尚欠了解。VEGF与VEGFR2结合后, VEGFR2的激活涉及一系列复杂的信号转导和程序性基因表达。其中, 他们如何衔接并相互作用, 最终介导VEGF引起血管新生仍需进一步研究。但我们相信, 随着蛋白质组学和基因芯片等高通量筛选技术的逐步完善, 对于发现信号转导中新的调控蛋白及其基因, 为最终解决以上问题并发现新的药物靶点可提供大量信息。同时, 以VEGFR2及其信号转导通路作为抗肿瘤靶点, 与直接杀伤肿瘤细胞相比, 他们更倾向于阻滞肿瘤的生长及转移。故可将其与细胞毒性化疗药物或放疗联合使用, 从不同治疗策略出发, 有可能起到高效的抗肿瘤作用。

5 参考文献

- Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 35-40
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410
- Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004; 5: 13-17
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114: 853-865
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003; 94: 751-756
- Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-

containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 31283-31288

- Li B, Fuh G, Meng G, Xin X, Gerritsen ME, Cunningham B, de Vos AM. Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. Generation and characterization. *J Biol Chem* 2000; 275: 29823-29828
- Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230
- Larrivee B, Karsan A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med* 2000; 5: 447-456
- 王榕生, 束永前, 黄普文, 刘凌霄, 顾艳宏, 卢凯华, 殷咏梅, 刘平. 奥曲肽治疗晚期肝胰肿瘤对血清VEGF的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2206-2207
- Dinney CP, Bielenberg DR, Perrotte P, Reich R, Eve BY, Bucana CD, Fidler IJ. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res* 1998; 58: 808-814
- Chen HH, Zhou HJ. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis. *Yaoxue Xuebao* 2004; 39: 29-33
- 李庆明, 余谦, 曾敬, 吴伟康. 胃康宁对大鼠胃癌VEGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 359-360
- Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, Hirata S, Watanabe H. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 1998; 58: 5565-5569
- 王宏光, 李开宗, 窦科峰. 反义寡核苷酸抑制肝癌细胞血管内皮生长因子的表达. *第四军医大学学报* 2000; 21: 1327-1329
- 任娟, 董蕾, 徐仓宝, 潘伯荣, 李明众, 王晖, 王晓丽, 王梅. KDR反义寡核苷酸对胃癌细胞的作用. *第四军医大学学报* 2002; 23: 333-336
- Parry TJ, Cushman C, Gallegos AM, Agrawal AB, Richardson M, Andrews LE, Maloney L, Mokler VR, Wincott FE, Pavco PA. Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2569-2577
- Gong BD, Luo W, Du FT, Ye RM, Liu JM, Yu CG, Zou YQ, Zhang JX. Inhibitory effects of antisense oligonucleotides on VEGF gene expression by human hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 35-37
- Tian Y, Ding RY, Zhi YH, Guo RX, Wu SD. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for the determination of tumor vascularity. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 415-419
- Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 1998; 273: 11995-11998
- Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997; 14: 1495-1502
- Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramaraio P, Ferrara N.

- Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res* 1996; 56: 4032-4039
- 25 杨治华, 王贵齐, 杨房生, 冉宇靓, 石瑜琳, 董志伟. 抗人VEGF的单克隆抗体对乳腺癌生长及转移的影响. *中华微生物学和免疫学杂志* 1999; 19: 282-285
 - 26 Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Tatenos M, Bohlen P, Moore MA, Rafii S. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10857-10862
 - 27 Ria R, Vacca A, Russo F, Cirulli T, Massaia M, Tosi P, Cavo M, Guidolin D, Ribatti D, Dammacco F. A VEGF-dependent autocrine loop mediates proliferation and capillarogenesis in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Thromb Haemost* 2004; 92: 1438-1445
 - 28 Zhang H, Li Y, Li H, Bassi R, Jimenez X, Witte L, Bohlen P, Hicklin D, Zhu Z. Inhibition of both the autocrine and the paracrine growth of human leukemia with a fully human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1887-1897
 - 29 Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Bohlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 155-161
 - 30 Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 5209-5218
 - 31 Bruns CJ, Shrader M, Harbison MT, Portera C, Solorzano CC, Jauch KW, Hicklin DJ, Radinsky R, Ellis LM. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int J Cancer* 2002; 102: 101-108
 - 32 Bruns CJ, Liu W, Davis DW, Shaheen RM, McConkey DJ, Wilson MR, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2000; 89: 488-499
 - 33 Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Kedar D, Mian B, Huang S, Baker C, Fan Z, Hicklin DJ, Pettaway CA, Dinney CP. Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2714-2724
 - 34 Hunt S. Technology evaluation: IMC-1C11, ImClone Systems. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 418-424
 - 35 Hasan J, Jayson GC. VEGF antagonists. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 703-718
 - 36 Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* 2002; 8: 1369-1375
 - 37 Lu F, Qin ZY, Yang WB, Qi YX, Li YM. A DNA vaccine against extracellular domains 1-3 of flk-1 and its immune preventive and therapeutic effects against H22 tumor cell *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2039-2044
 - 38 Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life* 2001; 52: 61-66
 - 39 Gingrich DE, Reddy DR, Iqbal MA, Singh J, Aimone LD, Angeles TS, Albom M, Yang S, Ator MA, Meyer SL, Robinson C, Ruggeri BA, Dionne CA, Vaught JL, Mallamo JP, Hudkins RL. A new class of potent vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: structure-activity relationships for a series of 9-alkoxymethyl-12-(3-hydroxypropyl)indeno[2,1-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones and the identification of CEP-5214 and its dimethylglycine ester prodrug clinical candidate CEP-7055. *J Med Chem* 2003; 46: 5375-5388
 - 40 Laird AD, Cherrington JM. Small molecule tyrosine kinase inhibitors: clinical development of anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 51-64
 - 41 Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 2002; 1: 117-123
 - 42 Kuenen BC, Rosen L, Smit EF, Parson MR, Levi M, Ruijter R, Huisman H, Kedde MA, Noordhuis P, van der Vijgh WJ, Peters GJ, Cropp GF, Scigalla P, Hoekman K, Pinedo HM, Giaccone G. Dose-finding and pharmacokinetic study of cisplatin, gemcitabine, and SU5416 in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1657-1667
 - 43 Sridhar SS, Shepherd FA. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 42 Suppl 1: S81-S91
 - 44 Sistla A, Sunga A, Phung K, Koparkar A, Shenoy N. Powder-in-bottle formulation of SU011248. Enabling rapid progression into human clinical trials. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 19-25
 - 45 Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1997; 14: 2079-2089
 - 46 Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001; 20: 2768-2778
 - 47 Warner AJ, Lopez-Dee J, Knight EL, Feramisco JR, Prigent SA. The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells. *Biochem J* 2000; 347: 501-509
 - 48 Igarashi K, Shigeta K, Isohara T, Yamano T, Uno I. Sck interacts with KDR and Flt-1 via its SH2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 77-82
 - 49 Igarashi K, Isohara T, Kato T, Takigawa K, Shigeta K, Yamano T, Uno I. 8-(3-oxo-4,5,6-trihydroxy-3h-xanthen-9-yl)-1-naphthoic acid inhibits MAPK

同行评价
本文内容新颖, 书写流畅, 科学性较强, 具有一定的可读性。

- phosphorylation in endothelial cells induced by VEGF and bFGF. *Int J Mol Med* 1998; 2: 211-215
- 50 Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, Huot J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2000; 275: 10661-10672
- 51 Wild R, Dhanabal M, Olson TA, Ramakrishnan S. Inhibition of angiogenesis and tumour growth by VEGF121-toxin conjugate: differential effect on proliferating endothelial cells. *Br J Cancer* 2000; 83: 1077-1083

编辑 何燕 电编 马文华

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求,解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难,自2007年开始,世界华人消化杂志(WCJD),推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 WCJD电子杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 WCJD网络版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2007-11-30).

Ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响及机制

邱文才, 王维刚, 王志刚, 郑起

邱文才, 王维刚, 王志刚, 郑起, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科 上海市 200233
国家自然科学基金资助项目, No. 30400429
通讯作者: 郑起, 200233, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科. sh6_zhengqi@126.com
电话: 021-64369181
收稿日期: 2007-05-25 修回日期: 2007-10-03

Effect of ghrelin on gastric emptying in diabetic mice and its mechanism

Wen-Cai Qiu, Wei-Gang Wang, Zhi-Gang Wang, Qi Zheng

Wen-Cai Qiu, Wei-Gang Wang, Zhi-Gang Wang, Qi Zheng, Department of General Surgery, the Sixth Affiliated Hospital of Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30400429

Correspondence to: Qi Zheng, Department of General Surgery, the Sixth Affiliated Hospital of Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. sh6_zhengqi@126.com

Received: 2007-05-25 Revised: 2007-10-03

Abstract

AIM: To investigate the gastroprokinetic effect of ghrelin in diabetic mice and its mechanism.

METHODS: The effects of ghrelin (50, 100 and 200 $\mu\text{g/kg}$) on gastric emptying in diabetic mice were after intragastric application of phenol red *in vivo*. The effects of ghrelin on the spontaneous contraction of fundic stomach muscle strips in the presence of ghrelin on the spontaneous contraction of fundic muscle strips from the stomachs of diabetic mice were studied *in vitro*. The effects of atropine and N^G -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) were also investigated.

RESULTS: Ghrelin accelerated gastric emptying in diabetic mice with a significant dose-response relationship. Administration of ghrelin to tissue increased the spontaneous contraction of fundic stomach muscle strips from diabetic mice (1.11 ± 0.03 , 1.22 ± 0.02 , 1.36 ± 0.04 vs 1.00, all $P < 0.05$). In the presence of atropine or L-NAME, ghrelin failed to

increase the spontaneous contraction of these strips.

CONCLUSION: Ghrelin can accelerate gastric emptying in diabetic mice, perhaps by activating the GHS-R cholinergic excitatory pathways and nitrergic nervous pathways in the enteric nervous system.

Key Words: Gastric emptying; Ghrelin; L-NAME; Growth hormone secretagogue receptor; Diabetic mice

Qiu WC, Wang WG, Wang ZG, Zheng Q. Effect of ghrelin on gastric emptying in diabetic mice and its mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(34): 3617-3620

摘要

目的: 探讨ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响及其作用机制。

方法: 采用四氧嘧啶建立糖尿病小鼠模型, 用灌食phenol red的方法研究糖尿病小鼠胃排空的改变, 并观察注射不同剂量ghrelin(50, 100和200 $\mu\text{g/kg}$)对糖尿病小鼠胃动力的影响。糖尿病小鼠胃底环形平滑肌条安置在恒温灌流肌槽中并用SMUP-E生物信号处理系统记录肌条的自发收缩活动, 观察不同浓度ghrelin(0.1, 1和10 $\mu\text{mol/L}$)对肌条自发收缩活动的影响, 并研究其作用机制。

结果: 糖尿病小鼠的胃排空率显著低于正常小鼠的胃排空率($22.90\% \pm 1.42\%$ vs $28.10\% \pm 1.28\%$, $P < 0.05$)。ghrelin能显著提高糖尿病小鼠的胃排空, 具有明显的量效关系。Ghrelin在0.1, 1和10 $\mu\text{mol/L}$ 均能显著增加糖尿病小鼠离体胃底环形平滑肌肌条的自发收缩幅度(1.11 ± 0.03 , 1.22 ± 0.02 , 1.36 ± 0.04 vs 1.00, 均 $P < 0.05$), 而atropine和L-NAME均能抑制ghrelin增加糖尿病小鼠肌条自发收缩幅度的效应。

结论: Ghrelin能提高糖尿病小鼠的胃排空能力, 作用机制可能是通过肌间丛神经系统的硝基能神经和胆碱能神经上的受体而起作用。

关键词: 胃排空; Ghrelin; N^G -硝基-L-精氨酸甲酯; 生长激素促分泌素受体; 糖尿病小鼠

背景资料

Ghrelin作为生长激素促分泌素受体(GHS-R)的第一个被发现的内源性配体, 研究发现其除在摄食与能量代谢、心血管功能等方面具有调节作用外, 还具有控制胃酸分泌、调节胃肠动力和胃黏膜保护作用。糖尿病胃轻瘫概念提出已近半世纪, 其研究工作取得了很大的进展, 但对于糖尿病胃轻瘫的治疗, 仍无较好办法, 本研究探讨了ghrelin对糖尿病小鼠胃轻瘫的治疗作用及机制。

研发前沿
进一步从组织水平上研究ghrelin对胃肠动力的影响及其机制,仍是目前研究的热点。

邱文才, 王维刚, 王志刚, 郑起. Ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响及机制. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3617-3620
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3617.asp>

0 引言

Ghrelin作为生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)的第一个被发现的内源性配体, 除在摄食与能量代谢、心血管功能等方面具有调节作用外, 还具有控制胃酸分泌、调节胃肠动力和胃黏膜保护作用. 糖尿病胃轻瘫概念提出已近半世纪, 其研究工作取得了很大的进展, 但对于糖尿病胃轻瘫的治疗, 仍无较好办法. 本实验旨在研究不同浓度ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响及作用机制. 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 C57小鼠, ♀ ♂不拘, 体质量 25 ± 5 g, 购自上海中国科学院实验动物中心. 大鼠ghrelin、一氧化氮合酶抑制剂 N^G -硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)购自Tocris公司, 阿托品、四氧嘧啶购自Sigma公司. 小鼠胃排空生理试验及离体肌条试验均在上海交通大学医学院生理学教研室完成.

1.2 方法

1.2.1 糖尿病小鼠模型的建立: 小鼠禁食12 h后, 腹腔注射(ip)四氧嘧啶200 mg/kg, 72 h后取血测血糖. 选取血糖值在11.1 mmol/L以上的小鼠, 不予胰岛素控制血糖, 饲养4 wk, 作为糖尿病小鼠模型进行后续研究.

1.2.2 各组小鼠胃排空率的检测: 糖尿病小鼠20只禁食不禁自由饮水12 h后随机平均分为4组, 每组5只, 分别ip生理盐水1 mL, ghrelin(50 μ g/kg), ghrelin(100 μ g/kg)和ghrelin(200 μ g/kg). 5只正常小鼠禁食不禁自由饮水12 h后, ip生理盐水1 mL. 每只小鼠注射全部完成后立即以15 mg/kg酚红溶液(0.5 g/L, 双蒸水溶解)ig. ig 20 min后将小鼠脱臼法处死, 立即结扎贲门和幽门, 抽取胃液置离心管中, 再用0.1 mol/L NaOH溶液2.5 mL分5次冲洗胃内容物. 将冲洗液一并转移至离心管中, 量取体积后800 g离心10 min. 取上清液在分光光度计 $\lambda = 546$ nm处读取光密度, 由酚红标准曲线求出酚红含量, 按下式计算胃排空率: 酚红胃排空率(%) = (注入量-胃内剩余量)/注入量 $\times 100\%$.

1.2.3 各组小鼠离体胃底环形平滑肌肌条自发收缩活动的检测: 将小鼠断颈处死, 平

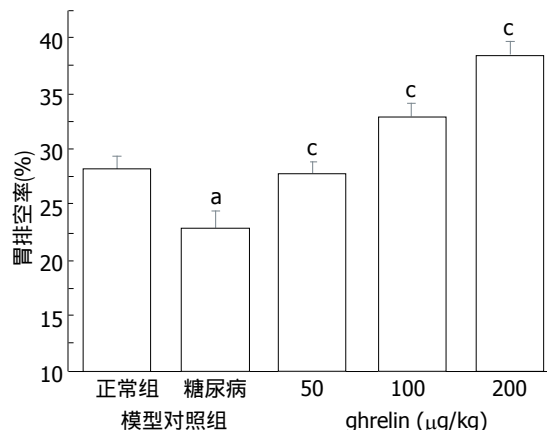


图1 Ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响. ^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 糖尿病模型对照组.

铺于实验台上, 沿腹中线开腹取出胃. 放入台氏缓冲液中清洗后, 移入氧饱和的台氏缓冲液中, 在解剖显微镜下仔细去除胃底黏膜层, 显露出肌层, 沿环行肌走向剪取宽2.0 mm, 长8.0 mm的肌条, 置于含有950 mL/L氧和50 mL/L二氧化碳饱和台氏液的垂直灌流槽内. 灌流槽内的液体通过恒温装置(WC/09-05)使温度保持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. 肌条一端固定于玻璃小钩上, 另一端同SMUP-E生物信号处理系统连接的张力换能器相连, 记录肌条自发收缩幅度. 肌条自发收缩活动平稳后, 灌流槽内分别通入不同浓度的ghrelin(0.1, 1和10 μ mol/L), 药理机制实验是分别加入阻断剂阿托品(5 μ mol/L), L-NAME(300 μ mol/L)后2 min, 再通入不同浓度ghrelin(0.1, 1和10 μ mol/L), 记录自发收缩幅度的变化. 更换药物浓度或药物种类时, 用台式液充分冲洗. 待肌条自发收缩活动平稳后, 再加入另外1组浓度或另外1种药物. 胃底肌条加药后收缩幅度变化以不加药物情况下, 肌条自发收缩活动稳定后的收缩幅度为对照表示.

统计学处理 所有数据采用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示, 实验结果采用同体对照的 t 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结果

2.1 ghrelin对糖尿病小鼠胃排空的影响 与正常小鼠胃排空率 $(28.10 \pm 1.28)\%$ 相比较, 糖尿病小鼠胃排空显著降低为 $(22.90 \pm 1.42)\%$ (图1, $P < 0.05$). ghrelin注射剂量为50, 100和200 μ g/kg时, 糖尿病小鼠胃排空率与未给药糖尿病小鼠相比显著提高, 分别为 $(27.80 \pm 0.97)\%$, $(32.90$

表 1 ghrelin对糖尿病小鼠胃底平滑肌条自发收缩幅度的影响($n = 5$)

分组	胃底平滑肌条自发收缩幅度				
	正常	拮抗剂	0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
ghrelin	1.00		1.11 \pm 0.03 ^a	1.22 \pm 0.02 ^a	1.36 \pm 0.04 ^a
ghrelin+阿托品(5 $\mu\text{mol/L}$)	1.00	1.02 \pm 0.02	1.05 \pm 0.07	1.09 \pm 0.11	1.07 \pm 0.08
ghrelin+L-NAME(300 $\mu\text{mol/L}$)	1.00	1.03 \pm 0.04	1.12 \pm 0.16	1.07 \pm 0.12	1.09 \pm 0.09

^a $P < 0.05$ vs 正常组.

$\pm 1.20\%$ 和 $(38.50 \pm 1.10)\%$, 有明显量效关系($P < 0.05$).

2.2 ghrelin对糖尿病小鼠离体胃底环形平滑肌条自发收缩活动的影响 在糖尿病小鼠胃底肌条出现稳定的自发性收缩后, 分别给予0.1, 1和10 $\mu\text{mol/L}$ 的ghrelin均可显著增加小鼠胃底肌条的自发收缩的幅度, 分别增加为 1.11 ± 0.03 , 1.22 ± 0.02 和 1.36 ± 0.04 (表1, $n = 5$, $P < 0.05$). 在预先用5 $\mu\text{mol/L}$ 的atropine或300 $\mu\text{mol/L}$ 的L-NAME预处理孵育肌条后, 与相应的正常组相比, 各浓度ghrelin均不能显著增加肌条的自发收缩幅度(表1, $P > 0.05$).

3 讨论

胃轻瘫作为糖尿病的一种慢性并发症, 多见于长期血糖控制欠佳的糖尿病患者^[1]. 目前认为与植物神经病变和代谢^[2]、激素异常^[3-4](高血糖, 胆囊收缩素)有关. ghrelin是1999年Kojima *et al*^[5]发现的第一个生长激素促分泌素受体的内源性配体, 由28个氨基酸组成的小分子多肽. 研究表明, ghrelin除在摄食与能量代谢、心血管功能等方面具有调节作用外, 还具有控制胃酸分泌、调节胃肠动力和胃黏膜保护作用. GHS-R主要分布在中枢神经系统中, 胃、小肠、胰腺、甲状腺、性腺、肾上腺、肾、心脏、脉管系统、内分泌器官、内分泌肿瘤^[6]和免疫细胞^[7]中也有分布. ghrelin功能的广泛性可能与其受体分布的组织广泛性有关^[8]. 我们通过建立糖尿病小鼠模型, 研究ghrelin对糖尿病小鼠胃轻瘫的治疗意义, 结果表明ghrelin能显著增加糖尿病小鼠的胃排空能力, 有明显的量效关系. 通过对糖尿病小鼠胃离体肌条的进一步研究表明, ghrelin可能是通过作用于胃肌间神经丛的硝基能神经和胆碱能神经上的受体而起作用.

Dass *et al*^[9]发现, GHS-R免疫反应阳性在大鼠胃和结肠的神经细胞上表达, 在平滑肌细胞和上皮细胞无表达, 提示在大鼠ghrelin可能通过

肠神经系统发挥作用. Xu *et al*^[10]将豚鼠的肠神经元分离出来, 发现并证实有motilin、ghrelin及其受体的存在. Fukuda *et al*^[11]发现辣椒辣素能阻断ghrelin的促大鼠胃肠运动作用, 提示ghrelin通过肠神经通路将辣椒辣素敏感的感觉传入神经元, 调节胃肠运动. Murray *et al*^[12]观察了外源性ghrelin对糖尿病胃轻瘫患者胃排空的影响. 在ghrelin注入90 min时, 血浆ghrelin水平达到峰值, 且与生长激素血浆峰值相对应. 在10例患者中, ghrelin使7例患者胃排空增快($P < 0.05$), 受损的迷走神经张力与餐后胰多糖峰值呈负相关, 但与胃排空率无明显关联. 因而认为ghrelin促进糖尿病胃轻瘫患者的胃排空, 不依赖于迷走神经张力. 但也有相反的研究结果. De Smet *et al*^[13]应用ghrelin基因敲除小鼠ghrelin(-/-)模型, 观察到ghrelin存在对胃排空无影响, 外源性ghrelin引起胃排空加速的效应曲线在ghrelin(+/+)和ghrelin(-/-)小鼠并无变化. 因而认为ghrelin并不是一种必须的胃排空调节因素. Masuda *et al*^[14]发现小鼠静脉注射ghrelin可增加胃酸分泌和增强胃动力. 此效应被阿托品或双侧迷走神经切除所阻断, 因此认为ghrelin也通过迷走神经影响胃动力.

Ghrelin可以通过中枢和外周神经促进胃肠动力, 所以ghrelin将是极具潜力的治疗胃动力的药物. 发现GHS-R及其内源性配体ghrelin后, 其对胃肠运动影响及机制的研究给胃肠道动力相关性疾病的治疗开拓了新的研究方向, 提供了极具潜力的应用前景.

4 参考文献

- 1 吴波, 郑长青, 林连捷, 周卓. 糖尿病性胃肠病变患者血浆P物质和胃动素的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003; 11: 367-368
- 2 林琳, 计敏, 张红杰, 林征, 赵志泉. 红霉素对糖尿病结肠运动障碍和四种胃肠激素的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 650-653
- 3 Tougas G, Hunt RH, Fitzpatrick D, Upton AR. Evidence of impaired afferent vagal function in patients with diabetes gastroparesis. *Pacing Clin Electrophysiol* 1992; 15: 1597-1602
- 4 Mitsukawa T, Takemura J, Ohgo S, Mizuta M, Ii T,

应用要点
本研究为治疗糖尿病胃轻瘫的药物选择提供依据.

同行评价
文章选题新颖、
设计合理、手段
先进, 结论有一定
先进性.

- 5 Kuribayashi T, Matsukura S. Gallbladder function and plasma cholecystokinin levels in diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 981-985
- 6 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 7 Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 1-17
- 8 Dixit VD, Taub DD. Ghrelin and immunity: a young player in an old field. *Exp Gerontol* 2005; 40: 900-910
- 9 Locatelli V, Bresciani E, Bulgarelli I, Rapetti D, Torsello A, Rindi G, Sibilia V, Netti C. Ghrelin in gastroenteric pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 843-848
- 10 Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 2003; 120: 443-453
- 11 Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, Zandeck M, Tang M, Timmermans JP, Peeters TL. Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. *Regul Pept* 2005; 124: 119-125
- 12 Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Ohnita K, Ohba K, Omagari K, Taniyama K, Kohno S. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1209-1214
- 13 Murray CD, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA, Johnston C, Bloom SR, Emmanuel AV. Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut* 2005; 54: 1693-1698
- 14 De Smet B, Depoortere I, Moechars D, Swennen Q, Moreaux B, Cryns K, Tack J, Buyse J, Coulie B, Peeters TL. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 431-439
- 15 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908

编辑 何燕 电编 李海寅

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

• 消息 •

中国科技期刊引证报告 (核心版) 发布 WJG 2006 年影响因子 0.834

本刊讯 2006年 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 的总被引频次为3576, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第19位, 内科医学类28种期刊的第1位. 2006年WJG的影响因子为0.834, 内科医学类28种期刊的第7位. 即年指标0.134, 他引率0.77, 地区数26, 基金论文比0.40, 海外论文比0.78, 学科影响指标0.75. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

丹参对重症急性胰腺炎大鼠腹腔器官血流的影响

宋应平, 王成果, 鲁建国

宋应平, 张掖医学高等专科学校基础部解剖学教研室 甘肃省张掖市 734000

王成果, 鲁建国, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科 陕西省西安市 710032

通讯作者: 宋应平, 734000, 甘肃省张掖市甘州区西环路6号, 张掖医学高等专科学校基础部解剖学教研室, heatzl@sohu.com

电话: 0936-8232401 传真: 0936-8232401

收稿日期: 2007-08-29 修回日期: 2007-10-25

Effects of *Salviae miltiorrhizae* on the splanchnic blood flow in rats with severe acute pancreatitis

Ying-Ping Song, Cheng-Guo Wang, Jian-Guo Lu

Ying-Ping Song, Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Zhangye Medical College, Zhangye 734000, Gansu Province, China

Cheng-Guo Wang, Jian-Guo Lu, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Ying-Ping Song, Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Zhangye Medical College, 6 Xihuan Road, Zhangye 734000, Gansu Province, China. heatzl@sohu.com

Received: 2007-08-29 Revised: 2007-10-25

Abstract

AIM: To observe the effects of *Salviae miltiorrhizae* (SM) on the splanchnic blood flow in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to elucidate the underlying mechanism.

METHODS: Thirty-two rats were randomly divided into SM group ($n = 16$) and SAP group ($n = 16$). Jejunotomy was performed in all. The SM group received indomethacin and the SAP group received saline. Another 8 normal rats were used as controls. At 12 and 24 hours after the induction of SAP, 8 rats in each group were sacrificed. Serum amylase was measured. The regional pancreatic blood flow was measured by Doppler ultrasound. The blood flow in the portal vein, spleen artery and superior mesenteric artery was also measured.

RESULTS: The levels of serum amylase at 12 and 24 hours after the induction of SAP were lower in the SM group than in the SAP group

(8091.2 ± 1574.9 vs $15\ 142.8 \pm 2900.5$, 8312.5 ± 981.1 vs $16\ 987.1 \pm 1584.6$, $P < 0.01$). The regional pancreatic blood flow, and the blood flow in the portal vein, spleen artery and superior mesenteric artery were decreased significantly in the SAP and SM groups compared with the control group ($P < 0.01$), and continued to decrease after 24 hours. There were significant differences in blood flow levels in the portal vein, spleen artery and superior mesenteric artery between 12 and 24 hours. The blood flow levels in the regional pancreatic artery portal vein, spleen artery and superior mesenteric artery at 12 and 24 hours were also decreased in the SM group compared with the SAP group (12 hours: 0.49 ± 0.04 vs 0.33 ± 0.06 , 0.60 ± 0.04 vs 0.39 ± 0.08 , 0.53 ± 0.04 vs 0.42 ± 0.08 ; 24 hours: 0.38 ± 0.04 vs 0.29 ± 0.04 , 0.59 ± 0.04 vs 0.41 ± 0.01 , 0.54 ± 0.06 vs 0.32 ± 0.02 , 0.49 ± 0.05 vs 0.38 ± 0.04 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Enteral administration of SM might increase splanchnic blood flow in SAP rats.

Key Words: Severe acute pancreatitis; *Salviae miltiorrhizae*; Blood flow; Rat; Doppler ultrasound

Song YP, Wang CG, Lu JG. Effects of *Salviae miltiorrhizae* on the splanchnic blood flow in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3621-3624

摘要

目的: 研究丹参对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠腹腔器官血流, 特别是胰腺血流的影响及其作用机制。

方法: 将大鼠随机分成丹参治疗组(SM)和重症急性胰腺炎组(SAP)。各组分别有数只大鼠于术后12、24 h处死, 观察血浆淀粉酶的变化。另设正常对照组。运用多普勒超声测定胰腺局部动脉(相当于胰头、体交界处)、门静脉血流、脾动脉及肠系膜上动脉血流。

结果: 丹参组12、24 h的血浆淀粉酶明显低于相同时点的SAP组(8091.2 ± 1574.9 vs $15\ 142.8 \pm 2900.5$, 8312.5 ± 981.1 vs $16\ 987.1 \pm 1584.6$,

背景资料

目前对重症急性胰腺炎的发病机制和治疗研究很多, 但发病机制至今未能完全阐明, 本文利用丹参对该病的发病机制等进行初步的研究。

研发前沿
目前重症急性胰腺炎的发病机制是研究热点,其机制非常复杂急需研究清楚,而对SAP的治疗是重点,但疗效好的药物尚未发现。

$P<0.01$)。丹参组和SAP组大鼠胰腺局部动脉、门静脉、脾动脉及肠系膜上动脉中的血流在术后12 h时与对照组相比明显下降($P<0.01$)。随胰腺炎的病程进展,其24 h局部血流相比12 h时的下降更趋严重。丹参组12、24 h大鼠胰腺局部动脉、门静脉、脾动脉和肠系膜上动脉的血流量与SAP组相同时点相比明显增加(12 h: 0.49 ± 0.04 vs 0.33 ± 0.06 , 0.60 ± 0.04 vs 0.39 ± 0.08 , 0.53 ± 0.04 vs 0.42 ± 0.08 ; 0.57±0.08 vs 0.42 ± 0.06 ; 24 h: 0.38 ± 0.04 vs 0.29 ± 0.04 , 0.59 ± 0.04 vs 0.41 ± 0.01 , 0.54 ± 0.06 vs 0.32 ± 0.02 , 0.49 ± 0.05 vs 0.38 ± 0.04 , $P<0.01$)。

结论: 丹参能促使SAP大鼠胰腺血流量增加。

关键词: 急性胰腺炎; 丹参; 血流动力学; 大鼠; 多普勒超声

宋应平, 王成果, 鲁建国. 丹参对重症急性胰腺炎大鼠腹腔器官血流的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3621-3624
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3621.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种并发症较多,病死率很高的急腹症。他发展迅速,病理生理表现复杂多变^[1-3]。研究证实,其病理过程突出地表现为以组织缺血为特征的胰腺血液循环障碍,持续的局部组织的血液循环障碍可使胰腺水肿转化为坏死^[4-7]。而丹参(*salviae miltiorrhizae*, SM)对SAP大鼠胰腺血流影响的研究^[8-11],目前尚未见相关报道。本实验通过应用丹参,观察其对SAP大鼠胰腺血流的影响,并探讨其作用机制,为进一步探讨临床上应用该药治疗SAP的可能性提供了理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley(SD)大鼠47只,清洁级2级,体质量200-280 g,由第四军医大学实验动物中心提供。适应性喂养24 h后用于实验。丹参(北京大学药学院),牛磺胆酸钠(Sigma公司),淀粉酶试剂盒(Roche公司),Imexlab 9100多普勒超声诊断仪(美国Imex公司),多普勒超声诊断仪专用的8 MHz探头(产品号X1-M008)(美国Imex公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作: 大鼠术前禁食12 h,盐酸氯胺酮(80 mg/kg)ip麻醉,常规消毒,上腹部正中切口进腹,找到胰腺,分离后用小号平针头于

胰腺包膜下广泛多点注射40 g/L牛磺胆酸钠约1 mL(200 mg/kg)。于近端空肠造瘘,置入空肠造瘘管,隧道式包埋,腹壁固定。将其经皮下隧道由背部肩胛区引出体外,以弹簧螺旋保护装置固定^[12-13],并保护导管,置大鼠于代谢笼内。大鼠可自由活动,术后禁食,但可饮水。造模后的32只SAP大鼠采用随机数字表法分为丹参组($n=16$)和SAP组($n=16$)。各组又分为2个亚组,分别于术后12, 24 h处死。另设不进行任何手术操作的正常对照组($n=8$)。所有动物术后可自由饮水,术后24 h进颗粒饮食。丹参组大鼠术后3 h经空肠造瘘管给药,剂量为10 mg/kg, 1次/6 h, 1-2次。配制时,药物溶于生理盐水中,即刻使用。SAP组大鼠经空肠造瘘管给予等量的DMSO,对照组动物仅作开腹手术。

1.2.2 血浆淀粉酶的测定: 取血3 mL, 4℃, 3500 r/min离心20 min, 取上清液, -70℃冰箱保存。使用Reflotron仪器测定淀粉酶,按试剂盒说明书,结果以U/L表示。

1.2.3 胰腺局部动脉、门静脉、脾动脉和肠系膜上动脉血流的测定: 大鼠麻醉下剖腹,在相当于胰头、胰体交界处相对固定的位置找到与胰管平行之胰腺血管,涂少量耦合剂,以多普勒超声诊断仪专用的8 MHz探头正对血流方向,与血管成30度-45度夹角,探查胰腺血流,记录波形并测量波幅。同法分别于SAP术后12, 24 h测定胰腺局部动脉血流、门静脉、脾动脉和肠系膜上动脉的血流。

统计学处理 由本校统计教研室采用SPSS 12.0统计软件分析完成。所有数据以mean±SD表示,行ANOVA方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

实验共纳入47只动物,对40只进行了结果分析,并无脱落情况发生。

2.1 血浆淀粉酶测定结果 SAP组血浆淀粉酶在各时点与对照组相比均显著升高($P<0.01$),并随时间延长继续升高($P<0.05$)。各实验组较对照组均显著升高($P<0.01$)。SAP组血浆淀粉酶明显高于丹参组,各时点相比有极显著差异($P<0.01$, 表1)。

2.2 胰腺局部动脉血流、门静脉血流、脾动脉血流及肠系膜上动脉血流测定结果 丹参组、SAP组各时点胰腺局部动脉、肠系膜上动脉、门静脉和脾动脉血流较对照组均明显下降($P<0.01$)。

创新盘点
本文第一次使用检测腹腔血管的血流变化情况来观察丹参治疗SAP的疗效,并取得较好的结果。

表 1 各组大鼠血浆淀粉酶和胰腺、门静脉、脾动脉、肠系膜上动脉血流指标(mean ± SD)

分组	n	血浆淀粉酶(U/L)	胰腺局部动脉血流(kHz)	肠系膜上动脉血流(kHz)	门静脉血流(kHz)	脾动脉血流(kHz)
SAP组						
12 h	8	15 142.8 ± 2900.5 ^b	0.33 ± 0.06 ^b	0.42 ± 0.06 ^b	0.39 ± 0.08 ^b	0.42 ± 0.08 ^b
24 h	8	16 987.1 ± 1584.6 ^{bf}	0.29 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.04 ^b	0.41 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.02 ^b
丹参组						
12 h	8	8091.2 ± 1574.9 ^{bd}	0.49 ± 0.04 ^{bd}	0.57 ± 0.08 ^{bd}	0.60 ± 0.04 ^{bd}	0.53 ± 0.04 ^{bd}
24 h	8	8312.5 ± 981.1 ^{bd}	0.38 ± 0.04 ^{bd}	0.49 ± 0.05 ^{bd}	0.59 ± 0.04 ^{bd}	0.54 ± 0.06 ^{bd}
对照组	8	4021.7 ± 467.8	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.07	0.66 ± 0.03	0.71 ± 0.08

^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs SAP相应组; ^fP<0.01 vs SAP 12 h组。

丹参组各时点胰腺局部动脉、肠系膜上动脉、门静脉和脾动脉血流较相应时点SAP组均明显升高($P<0.01$)。在丹参组, 随胰腺炎病程进展, 胰腺局部血流的下降更明显($P<0.05$, 表1)。

3 讨论

SAP的发病机制至今未能完全阐明。以往研究认为除了胰腺内胰酶激活后引起自身消化外, 多项研究还发现SAP时胰腺血流和胰腺微循环灌注量减少, 胰腺微循环障碍可使轻症水肿型急性胰腺炎转化为SAP^[1-5,14-17]。SAP时的微循环障碍又成为病情恶化的一个重要因素。目前观察胰腺微循环常用的方法有: (1)红细胞标记后体内显微术: 该方法虽能直接观察微循环变化, 生动直观, 但技术设备的要求很高^[18]。(2)多普勒超声测定: 是通过测定血管血流来间接反映微循环状况, 该方法简单、有效^[19]。我们通过Imexlab 9100多普勒超声诊断仪测定大鼠胰腺血管显示有良好的敏感性。研究发现, SAP大鼠模型建立后12 h, 胰腺局部血流明显下降, 同时伴肠道、门静脉和脾动脉血流量明显下降, 提示在SAP早期就存在着内脏器官血流下降。本实验发现SAP时24 h血流量明显低于12 h, 提示胰腺血液循环障碍是SAP发展过程中加剧胰腺损伤的一个重要因素。对于SAP发展的不同阶段, 均有不同程度的胰腺缺血和组织灌注不足或微循环淤滞, 特别是红细胞的强烈聚集可加重病情^[6,20]。

丹参是我国具有代表性的活血化淤中药, 具有扩张血管、改善血液循环的作用, 价格低廉、应用广泛。据文献报道, 丹参有效成分丹参酮II A、丹参素和丹酚酸, 经体内外试验证明均是有效的抗氧化剂, 尤其以丹酚酸的抗氧化作用最强^[21-23]。丹参水溶性成分能显著抑制动物的

心、脑、肝、肾、睾丸的脂质过氧化^[6-7]。本研究结果显示, 丹参能在SAP时扩张内脏血管, 增加内脏血流量^[6-7], 减轻胰腺的病理损害, 阻止病变的继续发展。本实验应用丹参来治疗SAP, 是第一次系统的在微循环系统变化上了解丹参对SAP的影响, 还有进一步研究的必要。

4 参考文献

- Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymiecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res* 2005; 54: 363-368
- Komatsu K, Shimosegawa T, Uchi M, Maruhama Y, Toyota T. Erythropoietic protoporphyria with severe liver dysfunction and acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 391-395
- Zhang XP, Tian H. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 134-140
- Besselink MG, van Santvoort HC, Witteman BJ, Gooszen HG. Management of severe acute pancreatitis: it's all about timing. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 200-206
- Vege SS, Chari ST, Petersen BT, Baron TH, Munukuti N, Bollineni S, Rea JR. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography-induced severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2006; 6: 527-530
- Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351
- Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Nakajima T, Kuroda Y. Role of toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice. *Surg Today* 2007; 37: 867-873
- 赵浩亮, 武小勇, 李士骏, 陈孝平, 裘法祖. 氧自由基在肝脏保存再灌注损伤中的作用及丹参的保护作用. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 237
- 雷伟, 周江桥, 王玲珑, 金化民. 丹参与CsA对移植肾缺血再灌注损伤防治作用的对比研究. *临床外科杂志* 2005; 13: 366-368
- Hu P, Luo GA, Zhao Z, Jiang ZH. Quality assessment of radix salviae miltiorrhizae. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005; 53: 481-486
- Leung KS, Chan K, Chan CL, Lu GH. Systematic

应用要点
本文的结果提示在以后临床治疗SAP时, 可采用丹参进行积极治疗。

同行评价
本文选题新颖, 语句通顺, 对研究急性胰腺炎有参考意义。

- evaluation of organochlorine pesticide residues in Chinese materia medica. *Phytother Res* 2005; 19: 514-518
- 12 王单松, 靳大勇, 吴肇汉, 杨幼明. 急性出血坏死型胰腺炎大鼠模型. *上海实验动物科学* 2002; 22: 23-26
- 13 Goldenberg A, Romeo AC, Moreira MB, Apodaca FR, Linhares MM, Matone J. Experimental model of severe acute pancreatitis in rabbits. *Acta Cir Bras* 2007; 22: 366-371
- 14 Laveda R, Martinez J, Munoz C, Penalva JC, Saez J, Belda G, Navarro S, Feu F, Mas A, Palazon JM, Sanchez-Paya J, Such J, Perez-Mateo M. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5309-5313
- 15 Arndt H, Kullmann F, Reuss F, Scholmerich J, Palitzsch KD. Glutamine attenuates leukocyte-endothelial cell adhesion in indomethacin-induced intestinal inflammation in the rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: 12-18
- 16 Zhang XP, Chen L, Hu QF, Tian H, Xu RJ, Wang ZW, Wang KY, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5506-5511
- 17 黄勋, 吕新生. 重症急性胰腺炎的抗菌药物应用. *中国普通外科杂志* 2007; 16: 488-490
- 18 Nakajima M, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Jin C, Ito O, Hayakawa T. Role of cholecystokinin in the intestinal phase of pancreatic circulation in dogs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G614-G620
- 19 王自法, 潘承恩, 刘绍诰. 重症急性胰腺炎发病机理研究进展. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 144-146
- 20 Matsuda K, Mikami Y, Takeda K, Fukuyama S, Egawa S, Sunamura M, Maruyama I, Matsuno S. The cannabinoid 1 receptor antagonist, AM251, prolongs the survival of rats with severe acute pancreatitis. *Tohoku J Exp Med* 2005; 207: 99-107
- 21 冷建春. 中医药治疗重症急性胰腺炎研究进展. *中国中医药信息杂志* 2005; 12: 99-101
- 22 许继文, 付春梅. 丹参的药理作用研究进展. *医学综述* 2006; 12: 1467-1468
- 23 李琛, 刘晓辉, 裴少伟. 老年慢性阻塞性肺疾病血液流变学特性及复方丹参的作用. *中国厂矿医学* 2006; 19: 368-369

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 •

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)

人肠三叶因子酵母双杂交载体的构建及其自激活作用鉴定

卢雅丕, 董菁, 周飞, 王琳, 陈美娅, 廉亚美, 张波, 任建林

卢雅丕, 董菁, 周飞, 王琳, 陈美娅, 廉亚美, 张波, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化疾病中心 福建省厦门市 361004
福建省自然科学基金资助项目, No. 2006J0380
福建省卫生厅青年科研基金资助, No. 2004-2-6和No. 2006-1-53
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科. jianlin.ren@xmzsh.com
电话: 0592-2993170 传真: 0592-2993170
收稿日期: 2007-09-09 修回日期: 2007-11-02

Construction of a human intestinal trefoil factor yeast two-hybrid vector and identification of its self-activation in yeast cells

Ya-Pi Lu, Jing Dong, Fei Zhou, Lin Wang, Mei-Ya Chen, Ya-Mei Lian, Bo Zhang, Jian-Lin Ren

Ya-Pi Lu, Jing Dong, Fei Zhou, Lin Wang, Mei-Ya Chen, Ya-Mei Lian, Bo Zhang, Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University, Gastroenterology Center of Xiamen, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2006J0380 and Science Fund for Young Scholars of Department of Health Fujian Province, No. 2004-2-6, No. 2006-1-53

Correspondence to: Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. jianlin.ren@xmzsh.com

Received: 2007-09-09 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To construct a yeast two-hybrid bait vector of intestinal trefoil factor (ITF/TFF3) and identify its self-activation.

METHODS: The open reading frame of ITF gene containing *Nco* and *Xho* endonuclease sites was obtained by RT-PCR from normal human intestinal mucosa and ligated into pGEMT vector from a TA clone. The hTFF3 gene was then transferred into the vector pENTR11 by enzyme digestion and ligation to obtain the entry clone pENTR11-hTFF3. Subsequently, pDEST32-hTFF3, the yeast two-hybrid bait vector of hTFF3, was constructed by the LR reaction. Finally, pDEST32-hTFF3 and pDEST22

were transfected into MaV203 yeast and amplified by yeast in 3AT plates with SC/-leu/-trp/-his.

RESULTS: The fragment of the hTFF3 gene was found in the reconstituted plasmid pDEST32-hTFF3 by sequencing. Yeast two-hybrid tests showed that MaV203 transfected with pDEST32-hTFF3 and pDEST22 did not grow in SC/-leu/-trp/-his plates with 3AT concentrations higher than 30 mmol/L.

CONCLUSION: The constructed plasmid pDEST32-hTFF3 is competent for yeast two-hybrid experiments.

Key Words: Trefoil factor 3; Yeast two-hybrid vector; Self-activation

Lu YP, Dong J, Zhou F, Wang L, Chen MY, Lian YM, Zhang B, Ren JL. Construction of a human intestinal trefoil factor yeast two-hybrid vector and identification of its self-activation in yeast cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3625-3628

摘要

目的: 构建人肠三叶因子(hITF/hTFF3)酵母双杂交诱饵载体并鉴定其自激活作用。

方法: 从人结肠黏膜提取总RNA. RT-PCR制备总cDNA, PCR扩增hTFF3基因, TA克隆至pGEMT载体并测序鉴定. 经*Nco* /*Xho* 双酶切, 连接到pENTR11质粒构建入门克隆. LR反应获得酵母双杂交诱饵载体pDEST32-hTFF3, 测序正确后与酵母双杂交空猎物载体pDEST22共同转化Mav203酵母细胞, SD/-Leu/-Trp固体培养基上生长. 挑取单克隆划线接种到分别含有不同浓度氨基三唑(3AT)的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上, 观察重组诱饵载体的自激活情况。

结果: 从人正常结肠黏膜成功克隆了hTFF3基因, 构建了pDEST32-hTFF3酵母表达质粒. 转化pDEST32-hTFF3和pDEST22的Mav203酵母细胞可在3AT浓度为30 mmol/L以下的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上生长, 在3AT浓度为30

背景资料

TFF3是胃肠黏膜保护和胃肠道肿瘤研究领域中的一种重要的蛋白质, 但其具体作用机制迄今尚不清楚. 为进一步研究人肠三叶因子3(hTFF3)的功能、作用机制和相互作用蛋白, 本文构建了hTFF3酵母双杂交诱饵载体以用于筛选hTFF3相互作用蛋白。

研发前沿

近年来, 国外很多学者在寻找三叶因子结合蛋白方面做了大量的工作, 也获得了一些TFF3结合蛋白, 但一致性差. 若能筛选到真正的TFF3结合蛋白, 将有利于进一步揭示TFF3的作用机制. 这也是目前TFF3研究中亟待解决的问题。

相关报道

Chinery *et al*用重组rTFF3分别与入乳腺癌细胞系MCF-7及结肠直肠腺癌细胞系Colony-29的细胞膜蛋白及大鼠小肠组织细胞膜蛋白进行交联。经免疫共沉淀及免疫印迹技术获得一种分子质量约为45 kDa的复合物,考虑这是TFF3及其结合蛋白的复合物。假设TFF3与其结合蛋白以1:1的比例结合,那么,rTFF3的结合蛋白分子质量应为38 kDa。Tan *et al*使用配体印迹技术,从小肠细胞膜成分中鉴定出了一种结合于TFF3的分子质量为50 kDa的糖基化蛋白质,考虑其可能是TFF3在胃肠道中的受体。这些研究都证实了TFF3结合蛋白或受体的存在,但未进一步明确TFF3结合蛋白的结构及氨基酸序列。

mmol/L以上的培养基上则未见酵母细胞生长。

结论: 所构建的pDEST32-hTFF3可作为酵母双杂交的诱饵质粒。

关键词: 肠三叶因子; 酵母双杂交载体; 自激活作用

卢雅杰, 董菁, 周飞, 王琳, 陈美娅, 廉亚美, 张波, 任建林. 人肠三叶因子酵母双杂交载体的构建及其自激活作用鉴定. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3625-3628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3625.asp>

0 引言

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF/TFF3)是三叶因子家族(trefoil factor family, TFF)成员之一,分子质量约6.7 kDa,1991年由Suemori *et al*^[1]在大鼠空肠黏膜中发现。生理条件下,TFF3在胃肠道呈细胞特异性表达,主要由小肠和结肠的杯状细胞分泌。但在病理条件下,这种特异性消失,TFF3可出现于胃肠道的任一病变部位^[2]。TFF3可通过促进细胞增殖、移行和抗细胞凋亡而促进胃肠损伤黏膜的重建修复,是一种胃肠黏膜保护因子。体外实验显示,重组TFF3能刺激肠道上皮细胞的迁移,促进伤口愈合,改变上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)的表达和细胞定位^[3],但这一特性同时促进肿瘤的侵袭扩散^[4]。有学者甚至提出,TFF3可作为胃癌预后不良的标志物^[5]。因此,TFF3是胃肠黏膜保护和胃肠道肿瘤研究领域中的一种重要的蛋白质,但其具体作用机制迄今尚不清楚。为进一步研究人肠三叶因子3(hTFF3)的功能、作用机制和相互作用蛋白,我们构建了hTFF3酵母双杂交诱饵载体以用于筛选hTFF3相互作用蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料 Proquest2酵母双杂交系统(含Mav203酵母感受态细胞、pDEST32质粒、pDEST22质粒、pEXP32/Krev1质粒和pEXP22/RalGDS-wt质粒等)、pENTR11质粒、LR反应试剂盒和TRIzol Reagent为Invitrogen公司产品,pMD 19T载体和RT-PCR试剂盒为TakaRa公司产品,限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq酶、dNTP和DNA marker为TakaRa公司产品,DNA凝胶回收试剂盒为厦门鹭隆生物技术有限公司产品,小量质粒DNA提取试剂盒为博大泰克公司产品,PCR引物由上海英骏公司合成。本研究所取标本已告知被采取人,并知情同意签字。

1.2 方法

1.2.1 人结肠黏膜总RNA提取: 经结肠镜检查钳取人正常肠黏膜组织一块(约10 mg),立即置于液氮中保存。将肠黏膜组织置于研钵中研成粉末,随后严格按TRIzolTM试剂说明书提取组织总RNA,溶于DEPC水中,-80℃保存。

1.2.2 RT-PCR获得hTFF3基因: 取1 μg总RNA进行逆转录,取4 uL总逆转录产物(总cDNA)进行PCR扩增。根据已知的hTFF3基因序列(GenBank: NM_003226)来设计合成hTFF3 ORF引物,上、下游引物分别添加了Nco I和Xho I酶切位点。上游引物: 5'-ACCATGGTCA TGCTGGGGCTGGTCCTG-3',下游引物: 5'-TC TCGAGTGGGAAGGTGCATTCTGCTTCCTG-3',扩增片段长度预计为237 bp。反应体系25 uL,94℃预变性2 min,94℃,58℃,72℃各30 s,共35个循环,延伸10 min。扩增产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳后切胶,按DNA凝胶回收试剂盒说明书纯化回收目的基因。

1.2.3 TA克隆及重组质粒鉴定: 按照pMD19T载体及T4 DNA连接酶说明书进行TA克隆,获得重组质粒pMD19T-hTFF3。CaCl₂法小量制备大肠杆菌DH5a感受态细胞,将重组质粒转化DH5a,采用蓝白筛选法及氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆,按照博大泰克小量质粒DNA提取试剂盒说明书提取质粒,采用原引物PCR法和DNA序列测定法鉴定阳性克隆。DNA测序送上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2.4 酵母双杂交载体的构建和鉴定: 分别将pMD19T-hTFF3重组质粒及pENTR11质粒用Nco I和Xho I双酶切。酶切产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收,用T4 DNA连接酶16℃连接过夜,连接产物称为pENTR11-hTFF3。经测序验证后将其转化DH5a感受态细胞,提取质粒,分别经Nco I/Xho I酶切鉴定和PCR鉴定。按照LR反应试剂盒说明书,将pENTR11-hTFF3和酵母双杂交空诱饵质粒pDEST32进行LR反应,将hTFF3克隆至含有DNA结合域(DBD)的pDEST32中。重组质粒送上海英骏生物技术有限公司进行DNA测序。

1.2.5 pDEST32-hTFF3自激活作用的鉴定: 按照Invitrogen公司酵母双杂交说明,将pDEST32-hTFF3及酵母双杂交猎物质粒pDEST22共同转化到Mav203酵母感受态细胞中,转化菌液于SD/-Leu/-Trp固体培养基上生长3 d。挑取生长出的单克隆,接种到含有0, 5, 10, 15, 20,

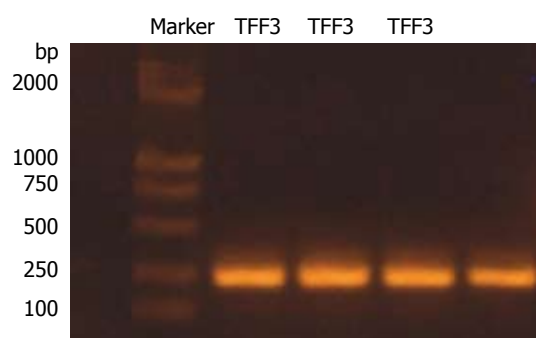


图1 RT-PCR扩增人TFF3.

25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 mmol/L氨基三唑(3-Aminotriazole, 3AT)的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上, 观察Mav203细胞的生长情况. 分别以pEXP32/Krev1+pDEST32和pEXP22/RalGDS-wt+pDEST22转化Mav203细胞作为阴性对照及阳性对照.

2 结果

2.1 RT-PCR获得hTFF3基因 RT-PCR反应产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 在近250 bp处可见特异性扩增条带, 与预期相符(图1).

2.2 TA克隆阳性重组子的筛选和鉴定 TA克隆后, 以重组质粒pMD19T-hTFF3为模板进行原引物PCR. 产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 在近250 bp处出现特异性条带. 重组质粒经测序, 得到的序列为: ATGCTGGGGCTGGTCTCTGGCC TTGCTGTCCTCCAGCTCTGCTGAGGAGTAC GTGGGCTGTCTGCAAACCAAGTGTGCCGT GCCAGCCAAGGACAGGGTGGACTGCGGC TACCCCATGTACCCCAAGGAGTGCAA CAACCGGGGCTGCTGCTTTGACTCCAGGA TCCCTGGGGTGCCTTGGTGTTTCAAGCCC CTGCAGGAAGCAGAATGCACCTTCTGA. 该序列与已知的hTFF3基因ORF序列(GenBank: NM_003226)完全一致, 证实hTFF3基因成功克隆到pMD19T质粒中.

2.3 pDEST32-DBD-hTFF3酵母表达载体的构建和阳性重组子的鉴定 经Nco I/Xho I双酶切, 电泳回收, T4连接酶连接, 将靶片段定向克隆入pENTR11质粒中. 经DNA测序鉴定验证, 将重组质粒命名为pENTR11-hTFF3. 按照Invitrogen公司指南, 通过LR反应将pENTR11-hTFF3中的靶片段转移到pDEST32中. 提取重组质粒用原引物进行PCR鉴定, 阳性重组质粒送上海英骏生物技术有限公司行DNA测序鉴定. 测序结果与TA

克隆阳性重组子测序结果一致, 提示pDEST32-hTFF3酵母表达载体构建成功.

2.4 pDEST32-DBD-hTFF3自激活作用的鉴定

按照Invitrogen公司操作指南, 将共同转化了pDEST32-hTFF3与空猎物载体pDEST22的酵母细胞MaV203, 经过梯度浓度3AT培养基培养, 发现共转化的酵母细胞MaV203可在3AT浓度为30 mmol/L以下的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上生长, 在3AT浓度为30 mmol/L以上的培养基上则未见生长. 阴性对照在所有3AT浓度培养基上均不能生长, 阳性对照在所有3AT浓度培养基上均能正常生长.

3 讨论

三叶因子家族是一群主要由胃肠道细胞分泌的小分子多肽. 目前在哺乳动物体内发现的三叶因子有3种, 即乳癌相关肽(pS2/TFF1)、解痉多肽(SP/TFF2)和肠三叶因子(ITF/TFF3), 均含一特殊的P结构域, 由38-39个氨基酸通过6个高度保守的半胱氨酸残基经由3个分子内的二硫键相互联接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶状结构^[6]. 这一家族在胃肠道黏膜完整性和持续性的维护方面具有重要的作用^[7]. hTFF3是胃肠黏膜保护和胃肠道肿瘤研究领域中的一种重要蛋白质, 但其作用机制迄今尚不清楚. 其结合蛋白或受体及在细胞中的信号转导途径尚未明确, 仍需进一步深入研究.

为了避免病理条件下基因变异的可能性, 我们采用RT-PCR技术从人正常结肠黏膜中获得了生理条件下的hTFF3基因. 我们采用TA克隆技术对PCR产物进行TA克隆, 先构建pMD19T-hTFF3重组质粒, 经测序鉴定后进行Nco I/Xho I双酶切, 定向克隆予质粒pENTR11中, 再经由LR反应将靶基因克隆到质粒pDEST32中. 为保证实验结果的可靠性, 分别对pMD19T-hTFF3, pENTR11-hTFF3和pDEST32-hTFF3的插入部分进行了测序. 结果提示三者的插入序列与GenBank中的hTFF3序列(NM_003226)完全一致.

本实验采用的Proquest2酵母双杂交系统中的诱饵载体pDEST32和入门克隆载体pENTR11中均含有ccdB基因, 其表达产物为一种可干扰大肠杆菌促旋酶从而对大肠杆菌具有致死性效应的蛋白^[8-9]. 转化了该载体的大肠杆菌将无法存活. 当pENTR11与携带目的基因的载体进行LR反应后, 携带有ccdB基因的片段可被目的基因片段取代. 因此, 只有正确插入目的基因

应用要点
本文所构建的酵母双杂交诱饵载体可进一步用于进行酵母双杂交实验, 筛选人肠三叶因子结合蛋白.

同行评价
本文研究内容新颖, 设计合理, 具有一定的可读性.

的pENTR11-hTFF3及和DEST32-hTFF3才可导致大肠杆菌存活. 携带有ccdB基因的未反应载体或保留有ccdB基因副产品的细胞将不会生长, 这个特点有利于阳性克隆的筛选. 构建诱饵质粒过程中经过pENTR11和pDEST32两次筛选, 且该系统含有组氨酸(His)、尿嘧啶(Ura)和LacZ三种报道基因, 进一步有利于阳性相互作用克隆的筛选, 使这一系统可以最大限度的减少酵母双杂交实验的假阳性结果. Gateway克隆技术^[10-12]是为了快速有效地在载体之间进行高通量DNA转移而采用的一种基因重组技术, 能够克隆一个或多个基因进入到任何蛋白表达系统, 包括LR反应和BP反应两种反应. 这项强大的体外技术大大地简化了基因克隆和亚克隆的步骤, 典型的克隆效率高达95%或更高. 当基因在目的表达载体之间快速简便的穿梭时, 还可以保证正确的方向和阅读框, 因而反应后不必再进行新的表达克隆的测序. LR反应操作简便快速、效率高、对位准确, 是Gateway克隆技术中的一种重要反应. 本实验采用了这种方法, 获得了满意的结果.

诱饵蛋白常对报道基因具有一定的自激活作用, 这将影响阳性相互作用克隆的筛选, 导致假阳性结果. 诱饵载体pDEST32含有亮氨酸基因, 猎物载体pDEST22含有色氨酸基因, 同时转化了这两种载体的酵母细胞可在缺乏亮氨酸与色氨酸的SD/-Leu/-Trp培养基上生长. 若两者存在相互作用, 可启动报道基因转录及表达. 因此, 阳性相互作用克隆可在SD/-Leu/-Trp/-His培养基上正常生长. 本实验构建的pDEST32-hTFF3与空猎物载体pDEST22共同转化Mav203酵母细胞, 发现阳性转化子可在SD/-Leu/-Trp/-His培养基上生长, 提示hTFF3具有自激活报道基因His的作用. 为了消除这种自激活作用, 我们将转化子接种到含不同浓度3AT的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上, 发现其可在3AT浓度30 mmol/L以下的培养基上生长, 在含30 mmol/L及以上浓度3AT的培养基上则未见生长, 提示hTFF3的自激活报道基因作用可被30 mmol/L浓度的3AT所抑制. 因此, 所构建的pDEST32-hTFF3可作为酵母

双杂交的诱饵载体可用于进一步的研究, 筛选hTFF3相互作用蛋白.

本研究初步构建了pDEST32-hTFF3酵母表达载体, 拟进一步行酵母双杂交筛选其相互作用蛋白, 为阐明hTFF3的作用机制奠定基础.

4 参考文献

- 1 Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11017-11021
- 2 Wong WM, Poulsom R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999; 44: 890-895
- 3 Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94: 376-383
- 4 Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 2004; 25: 885-898
- 5 Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A, Itzkowitz S. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1092-1099
- 6 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 2019-2021
- 7 Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 721-732
- 8 Smith AB, Maxwell A. A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 4667-4676
- 9 Bernard P, Kezdy KE, Van Melder L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* 1993; 234: 534-541
- 10 Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 2000; 10: 1788-1795
- 11 Sasaki Y, Sone T, Yoshida S, Yahata K, Hotta J, Chesnut JD, Honda T, Imamoto F. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J Biotechnol* 2004; 107: 233-243
- 12 Thomason PA, Brazill DT, Cox EC. A series of Dictyostelium expression vectors for recombination cloning. *Plasmid* 2006; 56: 145-152

编辑 李军亮 电编 马文华

肝素对大鼠肝星状细胞中转化生长因子 β 1和I型胶原的影响

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海矾, 狄军波

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海矾, 狄军波, 温州医学院附属育英儿童医院感染科 浙江省温州市 325027
温州市科技局基金资助项目, No. Y2004A071
通讯作者: 陈益平, 325027, 温州市学院西路183号, 温州医学院附属育英儿童医院感染科. ccyp@163.com
电话: 0577-88816153
收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-11-07

Effects of heparin on the expression of type I collagen and transforming growth factor β 1 in rat hepatic stellate cells

Yi-Ping Chen, Chao-Sheng Lu, Hong-Jiao Wang, Zhi-Wei Xu, Jun-Ya Chen, Hai-Fan Shi, Jun-Bo Di

Yi-Ping Chen, Chao-Sheng Lu, Hong-Jiao Wang, Zhi-Wei Xu, Jun-Ya Chen, Hai-Fan Shi, Jun-Bo Di, Department of Pediatrics Infectious Diseases, Yuying Affiliated Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325027, Zhejiang Province, China
Supported by: the Science and Technology Project of Wenzhou City, No. Y2004A071

Correspondence to: Yi-Ping Chen, Department of Pediatrics Infectious Diseases, Yuying Affiliated Children's Hospital of Wenzhou Medical College, 183 Xueyuan West Road, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. ccyp@163.com

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-11-07

Abstract

AIM: To explore the effects of heparin on the expression of transforming growth factor β 1 and type collagen in rat hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: HSCs were seeded at a density of 1×10^5 cells/L per well in 96-well plates, and grouped as follows: heparin group (10 mg/L), group (100 mg/L), group (1000 mg/L), and NS control group. The incubation liquid was extracted after cells were cultured for 48 hours, and frozen until later use. Type collagen and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and HSC proliferation was measured by MTT assay.

RESULTS: The mean levels of TGF- β 1 in the

heparin and groups were significantly lower than those in the control group (4.59 ± 1.27 ng/L, 3.34 ± 1.13 ng/L vs 5.95 ± 1.72 ng/L, $P < 0.01$). The mean levels of type collagen in groups, and were significantly lower than those in the control group (87.20 ± 9.30 ng/L, 73.17 ± 12.04 ng/L, 63.31 ± 10.93 ng/L vs 95.61 ± 12.55 ng/L, $P < 0.05$). The mean absorbency of cells in heparin group was significantly lower than that in heparin group and the control group (0.29 ± 0.07 vs 0.42 ± 0.12 , 0.46 ± 0.17 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The heparin can decrease expression of type I collagen and TGF- β 1 in HSCs, and inhibit the proliferation of HSCs.

Key Words: Heparin; Hepatic stellate cell; Transforming growth factor β 1; Type collagen; Enzyme-linked immunosorbent assay

Chen YP, Lu CS, Wang HJ, Xu ZW, Chen JY, Shi HF, Di JB. Effects of heparin on the expression of type I collagen and transforming growth factor β 1 in rat hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3629-3632

摘要

目的: 研究肝素与大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)作用后转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)和I型胶原表达的变化及意义。

方法: 大鼠肝星状细胞以 1×10^5 /L浓度接种于96孔培养板, 每孔100 μ L。实验分组为肝素组、肝素组、肝素组, 加入肝素使各组培养液中肝素浓度分别是10, 100, 1000 mg/L, 加生理盐水为对照组(每组6孔重复3次)培养48 h。培养终止后吸取上清液-20℃冰冻保存, ELISA法检测其上清液TGF- β 1和I型胶原水平, MTT法观察细胞增殖情况。

结果: 肝素组和组HSC培养上清液TGF- β 1水平均显著低于对照组(4.59 ± 1.27 ng/L, 3.34 ± 1.13 ng/L vs 5.95 ± 1.72 ng/L, P 均

背景资料
肝星状细胞(HSC)活化并合成大量的细胞外基质(ECM)在肝内沉积是肝纤维化形成、发展的核心环节, TGF- β 1是肝纤维化病理形成中具有重要意义的细胞因子, 型胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 抗纤维化治疗的主要靶点是活化的HSC及其密切相关的细胞因子。

研发前沿
在抗纤维化的实验研究中 TGF- β 1、细胞外基质的变化及相关机制仍是学者们探讨和研究的重点。

创新盘点
肝素在抗肝纤维化作用在临床与动物实验研究得到证实, 本实验是通过肝素作用体外培养的星状细胞观察相应变化, 进一步探讨分子生物学机制。

<0.01), 肝素各组 I 型胶原水平均低于对照组 (87.20±9.30 ng/L, 73.17±12.04 ng/L vs 95.61±12.55 ng/L, 63.31±10.93 ng/L vs 95.61±12.55 ng/L, P 均<0.05), 肝素 I 组平均吸光度低于肝素 II 组和对照组 (0.29±0.07 vs 0.42±0.12, 0.46±0.17, P 均<0.05)。

结论: 大鼠肝星状细胞在肝素作用下 TGF- β 1 和 I 型胶原分泌受抑制, 其增殖减少。

关键词: 肝素; 肝星状细胞; 转化生长因子 β 1; I 型胶原; 酶联免疫吸附测定

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海帆, 狄军波. 肝素对大鼠肝星状细胞中转化生长因子 β 1和 I 型胶原的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3629-3632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3629.asp>

0 引言

近年研究证实, 肝素除了公认的抗凝血和抗血栓作用外, 还具有抗炎、免疫调节、调节多肽生长因子和抑制细胞增殖等多种生物学活性, 并在抗肝纤维化方面有一定作用^[1-2]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化并合成大量的细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 在肝内沉积导致肝纤维化形成。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 是肝纤维化病理形成中具有重要意义的细胞因子, I 型胶原蛋白是细胞外基质的主要成分。我们用肝素作用于大鼠 HSC, 观察对其 TGF- β 1 与 I 型胶原分泌的变化, 初步探讨肝素抗纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞系 rHSC-99 由北京大学人民医院肝胆外科中心冷希圣教授惠赠^[3]。Rat Type I collagen ELISA 检测试剂盒为 Biomol Research labs Inc. 公司产品, TGF- β 1 ELISA 试剂盒为美国 TPI 公司产品, 胰蛋白酶 (Trypsin) 为美国 Gibco 产品, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 及二甲亚砜 (DMSO) 购于 Sigma 公司, 胎牛血清为杭州四季清产品, D-Hank's 液自配。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝星状细胞的培养: 大鼠肝星状细胞复苏后接种在 100 mL 塑料培养瓶中, 于 50 mL/L 二氧化碳, 95% 湿度空气的培养箱里培养, 24 h 细胞完全贴壁后换液, 以后每 2 d 换 1 次培养液。

1.2.2 ELISA 法检测: TGF- β 1 与 I 型胶原培养瓶

中细胞长成单层后, 弃去培养液, 加入 2.5 mL/L 胰蛋白酶的消化液, 收集消化液, 2200 r/min, 离心 7 min, 弃上清液, 再用 DMEM 培养液离心洗涤一次, 细胞团块用含 200 mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液悬浮并计数。用含 DMEM 培养液稀释细胞悬液, 以 1×10^5 /L 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。24 h 后吸去培养液再用含 10 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液同步化细胞, 使细胞同步化于静止期。实验分为对照组 (生理盐水), 肝素 I 组、肝素 II 组、肝素 III 组, 加入肝素使得各组培养液中肝素浓度分别是 10, 100, 1000 mg/L (每组 6 孔重复 3 次), 培养 48 h。作用 48 h 后吸取上清液 -20℃ 冰冻保存待检。ELISA 检测 TGF- β 1 和 I 型胶原。

1.2.3 MTT 法检测肝素对 rHSC-99 增殖: 上述在培养 48 h 时终止培养的标本, 分别在每孔加入 5 mg/L MTT 20 μ L, 再培养 4 h, 加入 DMSO 150 μ L 振荡 10 min, 用酶标仪 (波长 570 nm) 测定 HSC 吸光度。

统计学处理 统计数据以 mean±SD 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。数据经 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析 (Oneway ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 和 Dunnett T3 检验。

2 结果

肝素组与对照组的 rHSC-99 培养 48 h, 测定上清液的 TGF- β 1 与 I 型胶原结果见表 1。对照组与肝素 I, II, III 组测定的 TGF- β 1 水平组间变异 F 值为 12.86, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异, 组内两两比较: 肝素 II, III 组的 TGF- β 1 显著低于对照组 ($P < 0.01$), 肝素 III 组 TGF- β 1 浓度显著低于肝素 II, I 组 ($P < 0.01$)。对照组与肝素 I, II, III 组测定的 I 型胶原水平组间变异 F 值为 29.30, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异; 组内两两比较: 肝素 I, II, III 组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

肝素组与对照组的 rHSC-99 培养 48 h, 测定的平均吸光度变化结果见表 1。对照组与肝素 I, II, III 组测定的平均吸光度水平组间变异 F 值为 6.11, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异。

3 讨论

肝素基本结构是带有硫酸基团和乙酰化基团的高度硫酸化的蛋白多糖。近年研究证实, 肝素除了公认的抗凝血和抗血栓作用外, 还具有抗炎、免疫调节、调节多肽生长因子和抑制细胞增殖等多种生物学活性^[1-2]。石军 *et al* 临床用肝

表 1 肝素对rHSC-99 I 型胶原TGF- β 1水平以及增殖的影响($n = 18$, mean \pm SD)

分组	肝素浓度(mg/L)	TGF- β 1 (ng/L)	I 型胶原浓度(ng/L)	平均吸光度
对照组	0	5.95 \pm 1.72	95.61 \pm 12.55	0.46 \pm 0.17
肝素 组	10	5.49 \pm 1.23	87.20 \pm 9.30 ^a	0.42 \pm 0.12
肝素 组	100	4.59 \pm 1.27 ^b	73.17 \pm 12.04 ^a	0.33 \pm 0.14
肝素 组	1000	3.34 \pm 1.13 ^{bd}	63.31 \pm 10.93 ^{ac}	0.29 \pm 0.07 ^a
<i>F</i>		12.86	29.30	6.11
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 肝素 组、肝素 组。

素治疗乙型肝炎患者后,发现肝素可显著降低慢性乙型肝炎患者血清透明质酸型IV型胶原水平,治疗后肝组织胶原纤维增生减轻,肝星状细胞恢复正常,显示肝素有抗肝纤维化的效果^[2]。但肝素抗纤维化作用机理目前尚未完全明了,认为可能与其影响HSC及一些细胞因子有关^[1,4]。在肝纤维化时HSC是TGF- β 1产生的主要细胞,TGF- β 1是促进肝纤维化重要的细胞因子^[5]。各种致病因素作用于肝脏引起的损伤时,可即刻诱导TGF- β 1的表达。在TGF- β 1的作用下激活的HSC向损伤部位迁移和产生胶原,并促进自分泌TGF- β 1,形成正反馈效应,导致=Extra cellular matrix, ECM不断的产生,同时抑制ECM的降解,导致肝纤维化的发生发展^[5-7]。我们发现HSC在体外培养48 h后,在其培养的上清液中可以检测到TGF- β 1,肝素作用48 h后,除低浓度肝素组外,HSC分泌TGF- β 1水平明显低于对照组,说明一定浓度肝素可以抑制HSC的TGF- β 1的分泌。

肝纤维化是一种对坏死脱落的肝组织进行修复的代偿反应。HSC可分泌 I, III, IV型胶原,层黏蛋白(laminin, LN)、纤维连接素(fibronectin, FN)、透明质酸等多种ECM成分,用以修补坏死脱落的肝组织缺损空间,并最终导致肝纤维化。其中 I 型胶原是ECM的主要成分。Stefanovic *et al*^[8]发现HSC活化时 I 型胶原mRNA为静止时的60-70倍,本实验发现, HSC在肝素作用48 h后,其分泌 I 型胶原水平明显低于对照组,说明肝素可以抑制HSC的 I 型胶原的产生,呈现一定浓度依赖性。肝素抑制HSC的 I 型胶原分泌的机制与HSC的增殖受抑制有关^[9]。我们通过MTT比色法测定吸光度的变化反应肝素对培养的肝星状细胞增殖情况。结果发现加入肝素48 h,随着肝素浓度的增加,平均每孔的吸光度随之下降,说明肝素对HSC增殖有抑制作用。HSC增殖抑制,促进其凋亡可减慢或停止纤维化的发展。本实验发

现同样有肝素的作用,但肝素浓度较低的II组、I 组的吸光度和对照组比较无显著差异,而这两组分泌 I 型胶原水平明显低于对照组,说明肝素抑制HSC的 I 型胶原分泌除了引起HSC增殖抑制外可能还有其他的因素。文献[5,10]认为TGF- β 1与HSC I 型胶原表达关系密切。TGF- β 1通过活化Smad信号途径能诱导ECM基因的表达上调,刺激ECM的合成,而促进肝纤维化进程。如果阻断TGF- β 1合成和(或)信号途径显著降低动物纤维化。实验证明用TGF- β 1抑制物可抑制HSC的活化及其功能^[11]。本实验中对对照组HSC的TGF- β 1浓度较高,检测到 I 型胶原也相应较高。加入肝素作用后,随着肝素的浓度增加,TGF- β 1下降同时 I 型胶原随之减少,且剂量越大,抑制作用越强。因此HSC在肝素的作用下TGF- β 1的分泌下降进而抑制HSC I 型胶原的表达。

肝纤维化过程中,细胞与细胞间(激活的Kupffer细胞、损伤的肝细胞、内皮细胞、血小板等与HSC之间),基质与HSC间除TGF- β 1外还有多种细胞因子如结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、TNF- α 、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、IL-6、IL-1等构成复杂的调节网络。HSC活化的信号传导、HSC凋亡的启动因素、凋亡信号的传递途径、凋亡因子之间的相互作用及细胞因子网络在HSC活化和凋亡中的调控等也参与肝纤维化过程^[12-14]。因此抗肝纤维化的药物也是多途径、多靶点、多靶位的作用结果。肝素抗肝纤维化作用机制比较复杂^[15]。本实验发现肝素可能参与影响HSC的TGF- β 1等细胞因子的分泌和胶原的合成而产生抗肝纤维化作用。这只是其中错综复杂的机制的一小部分,其更深层次的作用及相关机制有待探索和研究。明确肝素抗纤维化机

应用要点
肝素抗纤维化临床有效。本实验通过体外细胞深入研究,为肝素抗肝纤维化的分子生物学机制提供了理论参考。

同行评价
本文设计合理, 方法可行, 结果可靠, 具有一定的价值.

制, 对肝纤维化的治疗有重要指导意义.

致谢: 感谢北京大学人民医院肝胆外科中心冷希圣教授对本课题的支持.

4 参考文献

- 1 Xie X, Rivier AS, Zakrzewicz A, Bernimoulin M, Zeng XL, Wessel HP, Schapira M, Spertini O. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate. *J Biol Chem* 2000; 275: 34818-34825
- 2 石军, 郝菁华, 朱菊人, 任万华. 肝素抗肝纤维化作用机制及临床疗效评价. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 215-216
- 3 冷希圣, 翁山耕, 李涛, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱. 大鼠肝星状细胞系的建立及其生物学特性的研究. *解剖学报* 2003; 34: 269-274
- 4 郝菁华, 朱菊人, 石军, 任万华, 孔祥辉. 肝素对肝纤维化大鼠模型作用的疗效观察. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 461-463, 467
- 5 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 6 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
- 7 Nepomnyashchikh GI, Aidagulova SV, Nepomnyashchikh DL, Kapustina VI, Postnikova OA. Ultrastructural and immunohistochemical study of hepatic stellate cells over the course of infectious viral fibrosis and cirrhosis of the liver. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142: 723-728
- 8 Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliebbhaber S, Brenner DA. Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5201-5209
- 9 李文才, 张锦生, 黄光存, 朱虹光, 张秀荣, 张月娥. 肝素对大鼠肝星状细胞生长、细胞外基质和基质金属蛋白酶基因表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 200-202
- 10 Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 11 Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290
- 12 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 794-801
- 13 Uchio K, Graham M, Dean NM, Rosenbaum J, Desmouliere A. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 60-66
- 14 Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Keri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 856-865
- 15 Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007; 46: 286-294

编辑 李军亮 电编 马文华

X线造影检查食管癌术后吻合口异常50例

朱世培, 罗勇, 宋威义

朱世培, 罗勇, 宋威义, 重庆三峡中心医院放射科 重庆市 404000
通讯作者: 罗勇, 404000, 重庆市, 重庆三峡中心医院放射科.
luoyong211@163.com
电话: 023-58103189
收稿日期: 2007-08-21 修回日期: 2007-10-18

Diagnostic value of X-ray radiography for the detection of abnormal stoma of oesophageal carcinoma after operation: an analysis of 50 cases

Shi-Pei Zhu, Yong Luo, Wei-Yi Song

Shi-Pei Zhu, Yong Luo, Wei-Yi Song, Department of Radiology, Three Gorges Central Hospital of Chongqing, Chongqing 404000, China
Correspondence to: Yong Luo, Department of Radiology, Three Gorges Central Hospital of Chongqing, Chongqing 404000, China. luoyong211@163.com
Received: 2007-08-21 Revised: 2007-10-18

Abstract

AIM: To analyze the findings of X-ray radiography in abnormal stoma of oesophageal carcinoma after operation and summarize the examination values.

METHODS: Post-operative imaging results from 50 cases of abnormal stoma of oesophageal carcinoma were analyzed retrospectively.

RESULTS: Among the 50 cases, anastomotic stenosis was seen in 21 cases, tumor recurrence in the stoma in 15 cases, stoma fistula in 9 cases, stoma ulcer in 3 cases, and a retained foreign body in the stoma in 2 cases.

CONCLUSION: X-ray radiography may have an important diagnostic value for the detection of abnormal stoma of oesophageal carcinoma after operations, and it offers reliable clinical data.

Key Words: Oesophageal carcinoma; Stoma; X-ray radiography; Diagnosis

Zhu SP, Luo Y, Song WY. Diagnostic value of X-ray

radiography for the detection of abnormal stoma of oesophageal carcinoma after operation: an analysis of 50 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3633-3636

摘要

目的: 分析食管癌术后吻合口异常的X线造影表现, 总结X线造影检查价值。

方法: 回顾性分析50例食管癌术后吻合口异常患者的X线造影检查影像表现。

结果: 50例食管癌术后吻合口异常患者, 发生吻合口狭窄21例, 吻合口肿瘤复发15例, 吻合口瘘9例, 吻合口溃疡3例, 吻合口处异物滞留2例。

结论: X线造影检查对食管癌术后吻合口异常具有重要的检查诊断价值, 并为临床提供可靠的检查资料。

关键词: 食管癌; 吻合口; X线造影; 诊断

朱世培, 罗勇, 宋威义. X线造影检查食管癌术后吻合口异常50例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3633-3636
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3633.asp>

0 引言

食管癌在临床工作中非常常见, 是消化道常见的恶性肿瘤之一。外科手术治疗为其首选治疗方法, 文献对其报道较多^[1-5]。X线(钡餐或泛影葡胺)造影检查是食管癌术后患者常用的检查方法, 文献对其报道较少。笔者搜集我院50例食管癌术后吻合口发生异常患者的X线造影检查影像资料, 分析其影像学表现, 总结X线造影检查诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-2007年间食管癌术后吻合口发生异常的50例患者, 所有患者均行X线造影检查, 其中男31例, 女19例, 年龄32-75(平均年龄53.5)岁。临床表现为吞咽困难20例, 吞咽不适5例, 胸痛15例, 反酸呕吐34例, 声嘶5例, 呛咳9例。

背景资料

食管癌是临床工作中非常常见的消化道恶性肿瘤之一, 外科手术治疗为其首选治疗方法, X线(钡餐或泛影葡胺)造影检查作为一种简单、经济实用的检查手段, 是食管癌术后患者常用的检查方法, 通过检查可观察吻合口异常情况, 为临床治疗提供可靠的检查依据。

创新盘点

本文从医学影像学角度分析食管癌术后吻合口X线造影表现,为临床治疗提供了可靠的检查资料,从而加强了临床医学与影像医学学科之间的联系。

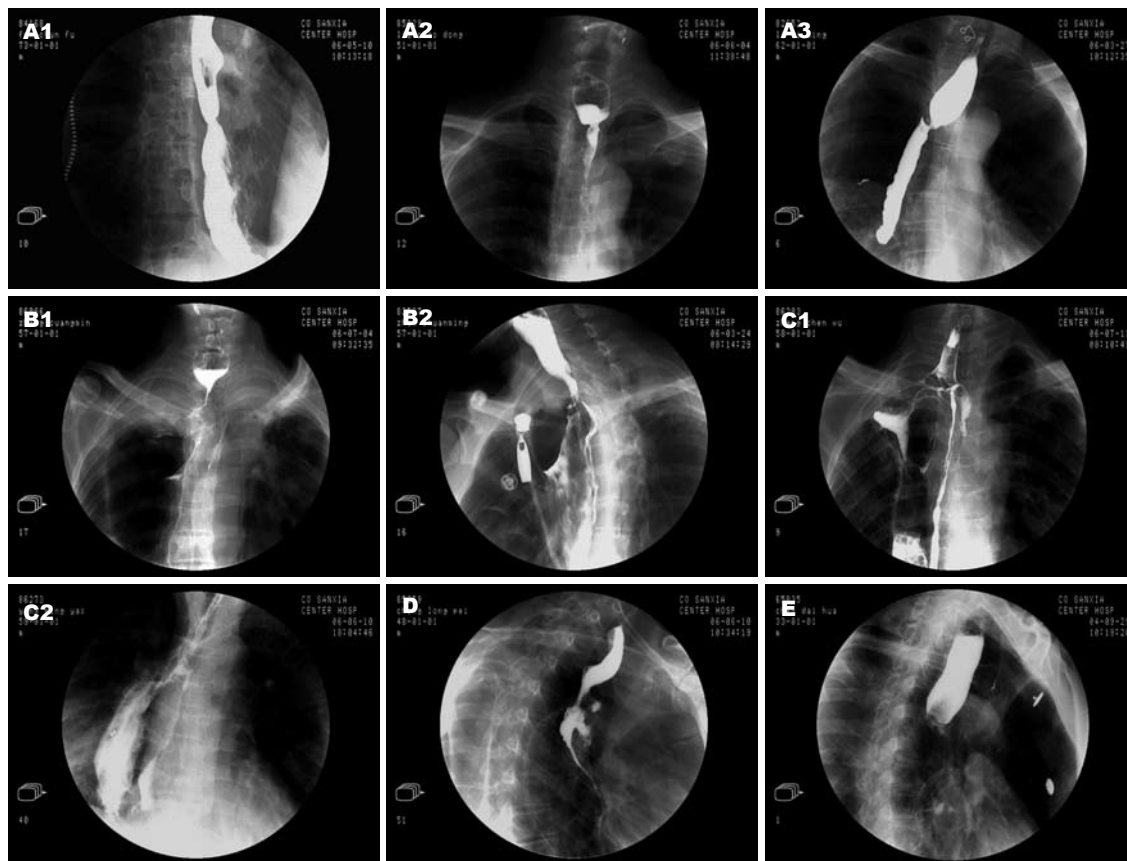


图1 食管癌术后吻合口异常X线表现: A1-3: 轻、中、重度狭窄; B1-2: 肿瘤复发; C1-2: 多发、单发瘘; D: 肿瘤复发并溃疡形成; E: 吻合口处异物滞留(手术证实为肉块)。

1.2 方法 X线造影检查采用PHILIPS数字胃肠机,所有患者均行X线造影检查。造影时根据患者梗阻情况灵活选择造影剂(钡剂)浓度,适时采用低张双对比检查。对吞咽梗阻较为严重的病例立即换用稀钡并行低张双对比检查,对怀疑有吻合口瘘者及腹部肠道有梗阻征象者采用 po 泛影葡胺造影检查。

2 结果

50例食管癌术后吻合口异常患者均行X线造影检查。其X线表现为: (1)吻合口狭窄21例(42%), X线造影表现为吻合口管径不同程度的狭窄(图1A)。 (2)吻合口肿瘤复发15例(30%), 表现为吻合口区管壁不规则增厚, 并形成软组织块影(与吻合口邻近残胃及残段食管界限显示不清)(图1B)。 (3)吻合口瘘9例(18%), 可见造影剂经吻合口处瘘口进入胸腔内, 形成不规则的造影剂积聚影, 可为单发或多发瘘口(图1C)。 (4)吻合口溃疡3例(6%), 在吻合口处见龛影形成(图1D)。 (5)吻合口处异物滞留2例(4%), 表现为吻合口处上方见类圆形充盈缺损影, 其上缘呈杯口状改变(图1E)。

3 讨论

食管癌目前治疗方式有外科手术治疗、放射治疗、介入治疗和内科化疗^[1-7], 外科手术治疗为其首选治疗方法。食管癌多沿食管浸润生长, 手术切除时其肿块上下方需要切除一定长度的食管, 以保证彻底切除肿瘤。食管癌经外科手术后, 胃提至胸腔与残留食管吻合, 因此食管癌术后患者应注意密切随访观察吻合口的改变。食管癌术后复查首先应选择进行X线(钡餐或泛影葡胺)造影检查^[8], 观察造影剂通过吻合口情况, 了解有无并发症发生。常见异常其X线造影表现常见有以下几种异常情况。

第一, 吻合口狭窄^[9-10]。吻合口狭窄是食管癌术后常见的并发症。食管癌术后吻合口狭窄程度决定了患者的生存质量。X线造影检查是确诊吻合口狭窄的常用方法, 可以了解吻合口狭窄的原因、位置及程度。吻合口狭窄的上方残段食管可见不同程度扩张征象, X线造影时吻合口壁光整, 柔软度及黏膜未见确切异常。X线造影检查将吻合口狭窄程度分为轻度、中度及重度。轻度狭窄指吻合口宽度为5-10 mm, 造影时造影

剂充盈吻合口, 稍有凹陷切迹改变; 中度狭窄吻合口宽度为3-5 mm, 造影剂通过稍显受阻, 其上食管可见扩张征象; 重度狭窄吻合口宽度为<3 mm, 造影剂通过时呈线样改变, 其上食管明显扩张. 本组病例中为轻度狭窄者12例, 中度狭窄者6例, 重度狭窄者3例. 吻合口狭窄需与肿瘤复发所致狭窄及吻合口瘢痕性狭窄相鉴别^[11]. 吻合口肿瘤复发所致的狭窄可见吻合口壁增厚或吻合口肿块影像改变, 瘢痕性狭窄无软组织肿块及周围侵犯, 必要时可行胃镜检查鉴别.

第二, 吻合口肿瘤复发^[11-12]. 食管癌术后肿瘤复发包括吻合口复发, 胸腔胃复发, 纵隔淋巴结转移^[13]. 复发最常见于吻合口复发, 表现为吻合口壁局限性增厚, 或吻合口软组织肿块. 常见以下几种情况: (1)切缘残存癌细胞复发; (2)如切除长度不够可导致局部复发, 常在吻合口处. 吻合口肿瘤复发时, 癌细胞侵及黏膜, 可出现黏膜增粗、紊乱、破坏中断; 侵及肌层时, 可见吻合口壁毛糙、僵硬、吻合口器质性狭窄. 胸腔胃复发造影时发现胸腔胃内有充盈缺损及黏膜破坏中断, 应考虑胸腔胃复发可能. 当放射医师发现或怀疑吻合口及胸腔胃有复发征象, 此时要行胃镜及病理检查确诊. 纵隔淋巴结复发, 纵隔淋巴结复发X线造影较难发现, 有时仅见纵隔内半弧形突出影, CT检查是诊断纵隔淋巴结复发的可靠检查方法. 早期发现吻合口肿瘤复发对患者早期治疗有着重要的临床意义.

第三, 吻合口瘘^[14-16]. 吻合口瘘是食管癌术后最严重的并发症之一^[17-18], 发生率约为3%-5%. 其发生时间早, 手术后起至术后1 wk左右为其高发时间, 手术结束即应高度警惕. 按其发生时间早晚可分为早期瘘(<3 d)、中期瘘(4-10 d)、晚期瘘(10 d以上). X线造影最好选用60%泛影葡胺. 当发生食管吻合口与气管瘘时, 患者可出现明显呛咳、呼吸困难等症状; 发生食管与胸腔瘘时, 患者可出现术侧胸腔积液、高热、胸痛、呼吸困难等症状. X线造影检查可明确诊断吻合口瘘, 并了解吻合口瘘口情况. 瘘口可为单发或多发, 造影时可见造影剂经瘘口进入气管或胸腔内, 进入气管者可见支气管及分支显影, 进入胸腔者可见胸腔内不规则的造影剂积聚影. 临床上有些小瘘道, 站立位情况下造影剂通过快, 不易显示, 此时应取卧位或俯卧位观察. 尤其是临床高度怀疑有瘘存在情况下, 患者体温持续偏高, 此时放射科医师更应该多体位、多角度观察, 以明确诊断.

第四, 吻合口溃疡. X线造影发现吻合口处规则或不规则钡斑影时, 应考虑吻合口处溃疡发生. 吻合口溃疡与常见消化道溃疡一样, 有良性与恶性之分. 良性者表现为吻合口处规则的钡斑影. 恶性者表现为吻合口处不规则的钡斑影, 邻近吻合口管壁僵硬毛糙, 可见不同程度的狭窄及充盈缺损征象, 黏膜破坏中断. 良性及恶性溃疡有时在X线造影上难区分, 此时应结合胃镜及病理检查鉴别.

第五, 吻合口处异物滞留. 吻合口处异物滞留, X线造影表现为吻合口上方可见类圆形充盈缺损影, 其上缘呈杯口状. 异物滞留最常见于患者饮食大块食物后. 吻合口处异物滞留, 常见的原因有两种: 一种是吻合口发生狭窄, 表现为食物难以通过狭窄的吻合口; 另一种是吻合口肿瘤复发, 表现为吻合口管壁增厚, 管腔变窄. 如食用大块食物容易发生吻合口处异物滞留.

X线造影(钡餐或泛影葡胺)检查是食管癌术后复查的一种经济实用的检查方法. 他可及时早期发现食管癌术后吻合口异常改变, 其X线造影表现有一定的特征性. X线造影检查结合胃镜及病理检查, 可为临床治疗提供可靠的检查资料.

应用要点
X线造影(钡餐或泛影葡胺)检查是食管癌术后复查的一种简单、经济实用的检查方法, 在全国各级医院都可以开展. 他可及时早期发现食管癌术后吻合口异常改变, 其X线造影表现有一定的特征性. X线造影检查结合胃镜及病理检查, 可为临床治疗提供可靠的检查资料.

4 参考文献

- 1 Dan HL, Bai Y, Meng H, Song CL, Zhang J, Zhang Y, Wan LC, Zhang YL, Zhang ZS, Zhou DY. A new three-layer-funnel-shaped esophagogastric anastomosis for surgical treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 22-25
- 2 Kawano T, Nakajima Y, Suzuki T, Haruki S, Ogiya K, Kawada K, Inokuchi M, Nishikage T, Yamada H, Kojima K, Nagai K. Esophageal carcinoma - from the viewpoint of surgery. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 824-830
- 3 Ruol A, Portale G, Zaninotto G, Cagol M, Cavallin F, Castoro C, Sileni VC, Alfieri R, Rampado S, Ancona E. Results of esophagectomy for esophageal cancer in elderly patients: age has little influence on outcome and survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 1186-1192
- 4 Chen G, Wang Z, Liu XY, Liu FY. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma in the middle thoracic esophagus after modified Ivor-Lewis esophagectomy. *World J Surg* 2007; 31: 1107-1114
- 5 Shimada H, Shiratori T, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Shuto K, Shimizu T, Hayashi H, Ochiai T. Surgical outcome of patients with thoracic esophageal cancer positive for cervical lymph nodes. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 100-103
- 6 Gilani JA, Hameed K, Asghar AH, Begum N, Jawad S, K A. Outcome of chemoradiation in treating carcinoma esophagus. *J Coll Physicians Surg Pak* 2003; 13: 562-564
- 7 金晶, 王绿化, 殷蔚伯, 杨宗贻, 谷铎之. 食管癌根治术后吻合口复发的放射治疗. *中华放射肿瘤学杂志*

同行评价
本文资料来源可靠, 内容实用, 对临床有一定指导意义.

- 2000; 9: 87-90
- 8 郭启勇. 实用放射学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 713-714
- 9 Schroder W, Zahringer M, Stippel D, Gutschow C, Beckurts KT, Lackner K, Holscher AH. Does celiac trunk stenosis correlate with anastomotic leakage of esophagogastronomy after esophagectomy? *Dis Esophagus* 2002; 15: 232-236
- 10 王章流, 刘爱琴. 内镜下扩张治疗食管贲门癌术后吻合口狭窄43例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1940-1941
- 11 张克宇. 食管癌术后复发的CT表现及其诊断价值. 放射学实践 2004; 19: 832-834
- 12 张建伟, 李辛, 刘海泉, 郭旻, 肖金成. 食管癌术后复发的X线表现及其原因分析. 放射学实践 2000; 15: 350-352
- 13 刘明, 李彩英, 周道安, 彭俊杰. 食管癌根治术后纵隔淋巴结转移的特点. 中华放射肿瘤学杂志 2001; 10: 83-84
- 14 Maruyama K, Motoyama S, Okuyama M, Sato Y, Hayashi K, Minamiya Y, Ogawa J. Esophagotracheal fistula caused by gastroesophageal reflux 9 years after esophagectomy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 801-803
- 15 Aguilo Espases R, Lozano R, Navarro AC, Regueiro F, Tejero E, Salinas JC. Gastrobronchial fistula and anastomotic esophagogastric stenosis after esophagectomy for esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 296-297
- 16 刘源, 官泳松. 食管胸内吻合口瘘及处理方法. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1402-1404
- 17 李建秋, 徐志飞, 乌立晖, 吴彬, 潘铁文, 赵学维, 钟镭, 薛磊, 秦雄. 食管癌、贲门癌术后胸内消化道瘘9例诊疗分析. 第二军医大学学报 2006; 27: 1389-1390
- 18 俞明锋, 尹国文, 蒋明, 张治, 徐卫东. 经瘘口置管引流治疗食管癌、贲门癌术后吻合口瘘的临床分析. 临床肿瘤学杂志 2006; 11: 306-307

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 •

中国科技期刊引证报告 (核心版) 发布 世界华人消化杂志 2006 年影响因子 0.373

本刊讯 2006年世界华人消化杂志的总被引频次为1855, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第104位, 内科医学类28种期刊的第7位. 2006年世界华人消化杂志的影响因子为0.373, 内科医学类28种期刊的第21位. 即年指标0.134, 他引率0.71, 地区数27, 基金论文比0.42, 海外论文比0.02, 学科影响指标 0.50. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

妊娠急性脂肪肝组织的体液免疫反应

郑智勇, 王晨, 曲利娟, 杨才生, 曾玲, 冯昌银

郑智勇, 王晨, 曲利娟, 曾玲, 冯昌银, 福建医科大学福总临床学院/南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025
杨才生, 福建医科大学福总临床学院/南京军区福州总医院肝病内科 福建省福州市 350025
通讯作者: 郑智勇, 350025, 福建省福州市西二环路156号, 南京军区福州总医院病理科. zzy@public.fz.fj.cn
电话: 0591-83717703 传真: 0591-83717703
收稿日期: 2007-06-28 修回日期: 2007-11-02

Humoral immunity reactions in the liver tissues of patients with acute fatty liver during pregnancy

Zhi-Yong Zheng, Chen Wang, Li-Juan Qu, Cai-Sheng Yang, Ling Zeng, Chang-Yin Feng

Zhi-Yong Zheng, Chen Wang, Li-Juan Qu, Ling Zeng, Chang-Yin Feng, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzong Clinical School of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Cai-Sheng Yang, Department of Hepatopathy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzong Clinical School of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Yong Zheng, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzong Clinical School of Fujian Medical University, 156 Xi'erhuanbei Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. zzy@public.fz.fj.cn
Received: 2007-06-28 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To observe whether humoral immunity reactions participate in acute fatty liver during pregnancy (AFLP).

METHODS: The deposition of all kinds of immunoglobulin and complements was observed in three cases of AFLP by immunohistochemical staining.

RESULTS: In cases 1 and 2, many rough particles of IgG, C1q or C4c were deposited in hepatic sinusoidal endothelial cells, while Kupffer cells swallowed many positive particles of IgG, IgM, IgA and C1q. Different amounts of C1q and C4d were deposited in the portal area and vessel endothelial cells, respectively in case 3, many IgG, IgM and IgA molecules were deposited in

hepatic sinusoidal endothelial cells and portal area, but very few complements were deposited.

CONCLUSION: The hepatic tissue of AFLP patients has various degrees of humoral immunity reaction, which may be important factors in the development of AFLP.

Key Words: Acute fatty liver during pregnancy; Immunoglobulin; Complement; Immunohistochemistry

Zheng ZY, Wang C, Qu LJ, Yang CS, Zeng L, Feng CY. Humoral immunity reactions in the liver tissues of patients with acute fatty liver during pregnancy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3637-3640

摘要

目的: 观察妊娠急性脂肪肝(AFLP)发病有无体液免疫反应参与。

方法: 采用免疫组化染色方法, 观察3例AFLP肝组织中各种免疫球蛋白和补体的沉积。

结果: 例1, 2肝小叶的肝血窦内皮细胞上均有大量IgG、C1q或C4c粗颗粒状沉积, 血窦内枯否氏细胞吞噬IgG、IgM、IgA及C1q阳性颗粒, 汇管区有不等量C1q沉积和血管内皮细胞C4d。例3肝血窦内皮细胞和汇管区有较多IgG、IgM、IgA沉积, 但补体沉积很少。

结论: AFLP肝脏组织中存在不同程度的体液免疫反应, 可能是其重要的发病因素。

关键词: 妊娠急性脂肪肝; 免疫球蛋白; 补体; 免疫组化

郑智勇, 王晨, 曲利娟, 杨才生, 曾玲, 冯昌银. 妊娠急性脂肪肝组织的体液免疫反应. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3637-3640
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3637.asp>

0 引言

妊娠急性脂肪肝(acute fatty liver during pregnancy, AFLP)是妊娠晚期发生的一种少见的致命性疾病, 发病机制不明。目前认为此病与胎

背景资料
妊娠急性脂肪肝(acute fatty liver of pregnancy, AFLP)是一种罕见且病因不明的妊娠晚期并发症, 发病率为1/7000-1/16 000, 死亡率极高。主要病理变化是肝细胞内出现大量的细小脂肪空泡。

研发前沿
对AFLP多从脂酸代谢、酶的研究、基因表达和临床实验检查等方面研究。目前主流意见认为其发病与胎儿或母体脂酸代谢障碍有关。AFLP中存在体液免疫反应的研究未见报道。

创新盘点
本文通过免疫组化染色证实妊娠急性脂肪肝中存在显著的体液免疫反应。体液免疫反应可能是AFLP发病的重要因素。

儿脂肪酸运转以及线粒体氧化障碍有关^[1-2]。为了解AFLP发病是否也有体液免疫反应参与,我们对1997年以来我院确诊为AFLP的3例肝穿标本,采用免疫组化染色方法,观察肝组织中各种免疫球蛋白和补体的沉积情况。

1 材料和方法

1.1 材料 临床资料参见表1。病例1, 22岁, 因“妊娠36 wk, 全身黄疸5 d, 牙龈出血10 d, 加重5 d”, 于1997-01-20入院。给予保肝、抗凝、输新鲜血浆和血小板、利尿、抗感染及对症支持治疗, 次日静滴催产素, 臀牵引助产1死婴。产后持续阴道出血, 无尿, 病情逐渐加重, 出现血性泡沫痰, 叹气样呼吸, 血压测不到, 于入院后第6天经抢救治疗无效死亡。死后1 h内行肝穿刺, 送病理检查。病例2, 26岁, 双胎妊娠37 wk, 疲乏, 眼黄5 d, 腹部阵痛3 h, 于2006-06-20入院。入院后给予保肝、保肾、降酶、止血、补充凝血因子等处理, 次日会阴侧切助娩出一大一小男婴, 大的抢救无效死亡, 小的转儿科治疗后存活。产后胎盘胎膜部分残留, 出血不止, 行次全子宫切除术, 同时肝活检。术后给予保肝、利胆、利尿、抗感染、抗肝性脑病、改善微循环及营养支持等治疗, 但病情逐渐加重, 呼吸急促, 呈昏迷状, 出现高热。入院后第8 d经抢救治疗无效死亡。病例3, 26岁, 孕37 wk, 恶心、呕吐5 d, 皮肤黄染、眼黄4 d, 2007-02-09入院。主要体征为血压160/115 mmHg, 下肢浮肿, 全身皮肤、双眼巩膜黄染。当日行急诊剖腹产术, 娩一男婴, 存活。术后血压明显下降(105/60 mmHg), 术后4 d内黄疸进行性加深, 出现凝血功能障碍、肾功能损害和低血糖, 考虑妊娠期急性脂肪肝, 转入内科诊治。行肝穿活检术, 给予保肝、退黄、静滴血浆、抗感染等治疗, 症状逐渐消失, 皮肤黄染消退, 肝功明显好转。住院8 d后出院, 随访月余, 痊愈。

第一抗体兔抗人IgG、IgA、IgM、C3c、C4c、C1q均为Dako公司产品, 兔抗人C4d为Biomedica公司产品, 兔抗HBsAg和HBcAg购于中杉金桥公司。免疫组化试剂盒用Maixin.Bio公司EliVision™ plus广谱试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 标本处理: 3例AFLP光镜标本用中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续切片2 μ m, 分别行HE, PAS, 网状纤维染色和第二步法免疫组化染色。电镜标本按常规制片, JEM 1200EX型电镜观察。

1.2.2 免疫组化染色: 石蜡切片脱蜡入水, 0.01

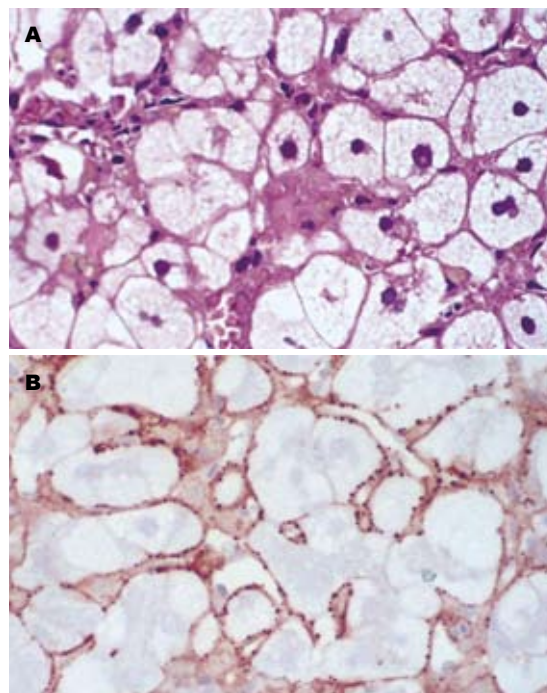


图1 AFLP。A: 肝细胞弥漫性小泡状脂肪变性(HE染色 \times 400); B: 血窦内皮细胞上C1q大量粗颗粒状沉积(免疫组化染色, AEC显色, 苏木精复染 \times 400)。

mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中高温高压修复抗原。HBsAg和HBcAg染色不消化, C4d染色用0.1%胰酶消化0.5 min, 其余染色用0.1%胰酶消化1.5 min。浸入30 mL/L过氧化氢10 min, 滴加一抗37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗37 $^{\circ}$ C孵育30 min, AEC显色。各步骤间均用PBS(pH7.2)洗涤切片。PBS代替一抗作为阴性对照。观察各例免疫组化染色片中IgG、IgM、IgA、C3c、C4c、C4d、C1q和纤维蛋白原(Fg)的阳性显色在肝组织中的分布情况, 按汇管区、肝小叶分别记录阳性范围。阳性范围: 阴性为0分, <25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分。

2 结果

2.1 光镜下病变 3例均有肝细胞弥漫性小泡状脂肪变性(图1A), 少量大泡性脂肪变性, 肝细胞内中度淤胆, 灶性肝细胞坏死, 肝血窦狭窄, 枯否氏细胞增生。例1汇管区有少量淋巴、单核细胞浸润。例2汇管区水肿, 中等量淋巴、单核细胞浸润, 中等量碎屑样坏死, 轻度桥形坏死。

2.2 电镜下病变 3例均见肝小叶结构存在, 肝细胞质内可见大量小泡性脂滴, 有时脂滴呈大泡性, 部分肝细胞基质内亦有无包膜的脂滴。线粒体形态、大小、结构无明显异常, 糖原不多, 少

表 1 3例AFLP入院时化验指标

	ALT U/L	AST U/L	DBIL μmol/L	TBil μmol/L	CREA μmol/L	UA mmol/L	WBC 10 ⁹ /L	N %	PLT 10 ⁹ /L	HGB g/L	FIB g/L	PT s	TT s	PT-INR	GLU mmol/L
例1	30	-	-	171	323	453	22.5	88	97	95	-	74	-	-	3.4
例2	344	345	71.3	151.3	207	637	17.58	68.6	158	130	<0.35	36.60	-	3.94	3.0
例3	275	284	118	138	223	640	10.8	74.4	102	164	1.2	30	14.4	2.41	3.4

例1: HBsAg阴性; 例2: HBsAg, HBeAg和HBcAb均阳性; 例3: HBV, HAV, HCV, HEV血清标志物均阴性.

表 2 AFLP免疫组化染色结果

抗体	肝血窦壁			汇管区		
	A	B	C	A	B	C
IgG	4	3	4	0	0	4
IgM	0	0	2	0	0	2
IgA	0	1	3	0	0	4
C3c	0	0	2	0	0	1
C4c	0	3	0	0	0	0
C4d	1	1	0	2	1	2
C1q	4	4	1	2	2	0
Fg	0	2	0	0	0	0

A为例1; B为例2; C为例3.

量色素颗粒, 毛细胆管尚正常, 肝细胞之间及窦间隙有少量淋巴、单核细胞及中性粒细胞浸润, 少量肝细胞点状坏死. 例2见一汇管区, 小胆管增生, 少量淋巴、单核细胞浸润.

2.3 免疫组化染色结果 (表2)例1, 2肝小叶的肝血窦内皮细胞上均有大量IgG、C1q或C4c粗颗粒状沉积(图1B), 血窦内枯否氏细胞吞噬IgG、IgM、IgA及C1q阳性颗粒, 汇管区有不等量C1q沉积和血管内皮细胞C4d. 例3肝血窦内皮细胞和汇管区有较多IgG、IgM、IgA沉积, 但补体沉积很少. 例1, 3 HBsAg和HBcAg均阴性, 例2 HBsAg和HBcAg均阳性.

2.4 病理诊断 例1为妊娠急性脂肪肝(90%肝细胞脂肪变), 例2为妊娠急性脂肪肝(60%肝细胞脂肪变), 伴中度慢性乙型肝炎, 例3为妊娠急性脂肪肝(40%肝细胞脂肪变).

3 讨论

AFLP病因不明, 多数研究认为此病与胎儿或母体脂肪代谢紊乱有关^[11-10]. 然而越来越多的证据表明, 妊娠期间的某些疾病, 如妊娠期高血压、妊娠性肾病等, 都与母体与胎儿之间的体液免疫反应有关^[11-15]. 为了探讨AFLP的发病机制是否也与体液免疫反应有关, 我们采用免疫组化

的方法检查了3例AFLP患者肝组织中免疫球蛋白和补体沉积情况.

结果发现, 例1, 2肝组织中均有大量的IgG及C1q沉积于肝血窦壁内皮细胞上. 例3肝组织有IgG、IgM和IgA沉积, 但补体沉积很少. 前两者肝功损害、凝血功能障碍和脂肪变性均较重, 最终死亡. 第三例病情相对较轻, 最终治愈. 这一现象提示, AFLP患者肝脏组织中存在不同程度体液免疫反应, 并造成肝组织损伤. 补体系统大量激活是造成肝脏严重损害的重要因素^[16-20], 体液免疫反应可能是AFLP发病的重要因素. 本组例1, 2入院后通过产道分娩, 例3行急诊剖腹产术, 两种治疗方案结果完全不同. 因此, 及时终止妊娠对阻断AFLP病情的发展和挽救病人生命可能有重要意义.

Nowoslawski *et al*^[21]曾经报道过, 乙型病毒性肝炎的肝组织中有免疫复合物沉积, 尤其在亚急性重症肝炎中有明显补体激活. 本组第2例有碎屑样坏死、轻度桥形坏死, 以及HBsAg和HBcAg阳性, 提示患者原有乙型中度慢性肝炎. 但是, 该例中肝细胞大量小泡性脂肪变性不能用乙型肝炎解释. 结合临床其他指标, 此例诊断为AFLP伴有慢性乙型肝炎. Hamid *et al*^[22]曾提出, 病毒性肝炎可能与AFLP发病有关. 然而AFLP十分罕见, 慢性乙型肝炎孕妇却并不少见^[23-26]. 因此两种病之间可能没有因果关系.

本文报道的现象与目前AFLP发病机制的研究观点有冲突. 这种现象是否在AFLP中普遍存在, 仍有待于对更多病例进行研究.

4 参考文献

1 回允中. ROSAI&ACKERMAN外科病理学. 第9版. 北京: 北京大学医学出版社出版, 2006: 961-962
2 Rinaldo P. Fatty acid transport and mitochondrial oxidation disorders. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 489-500
3 Santos L, Patterson A, Moreea SM, Lippiatt CM, Walter J, Henderson M. Acute liver failure in pregnancy associated with maternal MCAD

应用要点
本文为阐明AFLP的发病机制提供了新的研究角度.

同行评价

本文图片清晰, 研究方法得当, 结果可靠, 结论丰富了有关AFLP发病机制的研究, 有一定的可读性和参考性。

- deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 103
- 4 Hoffmann GF, von Kries R, Klose D, Lindner M, Schulze A, Muntau AC, Roschinger W, Liebl B, Mayatepek E, Roscher AA. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 2004; 163: 76-80
- 5 Browning MF, Levy HL, Wilkins-Haug LE, Larson C, Shih VE. Fetal fatty acid oxidation defects and maternal liver disease in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 115-120
- 6 Pliego Perez AR, Zavala Soto JO, Rodriguez Ballesteros R. Fatty liver in pregnancy. A report of two cases and medical literature review. *Ginecol Obstet Mex* 2006; 74: 164-169
- 7 Mjahed K, Charra B, Hamoudi D, Noun M, Barrou L. Acute fatty liver of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274: 349-353
- 8 Bahloul M, Dammak H, Khlaf-Bouaziz N, Trabelsi K, Khabir A, Ben Hamida C, Kallel H, Ksibi H, Chelly H, Chaari A, Rekik N, Bouaziz M. Acute fatty liver of pregnancy. About 22 cases. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34: 597-606
- 9 Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 35-41
- 10 Ibdah JA. Acute fatty liver of pregnancy: an update on pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7397-7404
- 11 宋屿娜, 郑智勇, 曾玲. 妊娠性肾病肾组织中C4d沉积的观察. *中华肾脏病杂志* 2006; 22: 148
- 12 Slater DN, Hague WM. Renal morphological changes in idiopathic acute fatty liver of pregnancy. *Histopathology* 1984; 8: 567-581
- 13 Joyama S, Yoshida T, Koshikawa M, Sawai K, Yokoi H, Tanaka A, Gotoh M, Ueda S, Sugawara A, Kuwahara T. C4d and C4bp deposition along the glomerular capillary walls in a patient with preeclampsia. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: E6
- 14 Lopez-Mendez E, Avila-Escobedo L. Pregnancy and portal hypertension a pathology view of physiologic changes. *Ann Hepatol* 2006; 5: 219-223
- 15 Sidorova IS, Babina MG, Aleshkin VA, Afanas'ev SS. Dynamics of some characteristics of humoral immunity, vaginal interferon status in pregnant women with the relapse of chronic pyelonephritis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2003; 3: 34-39
- 16 卜宪敏, 郑智勇, 余英豪, 曾玲, 江艺. 肝移植排斥反应中C4d的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1314-1316
- 17 Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JL, Lin F, Medof ME, Nagy LE. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 1117-1126
- 18 Njoku DB, Mellerson JL, Talor MV, Kerr DR, Faraday NR, Outschoorn I, Rose NR. Role of CYP2E1 immunoglobulin G4 subclass antibodies and complement in pathogenesis of idiosyncratic drug-induced hepatitis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 258-265
- 19 Dumestre-Perard C, Ponard D, Drouet C, Leroy V, Zarski JP, Dutertre N, Colomb MG. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 131-136
- 20 Ishii Y, Shimomura H, Itoh M, Miyake M, Ikeda F, Miyaike J, Fujioka S, Iwasaki Y, Tsuji H, Tsuji T. Cold activation of serum complement in patients with chronic hepatitis C: study on activating pathway and involvement of IgG. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 229-235
- 21 Nowoslawski A, Krawczynski K, Brzosko WJ, Madalinski K. Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Am J Pathol* 1972; 68: 31-56
- 22 Hamid SS, Jafri SM, Khan H, Shah H, Abbas Z, Fields H. Fulminant hepatic failure in pregnant women: acute fatty liver or acute viral hepatitis? *J Hepatol* 1996; 25: 20-27
- 23 白茵, 赵桂珍. 乙型肝炎病毒母婴传播机制及预防的研究进展. *国外医学流行病学传染病学分册* 2005; 32: 99-102
- 24 Yang W, Shen Z, Peng G, Chen Y, Jiang S, Kang S, Wu J. Acute fatty liver of pregnancy: diagnosis and management of 8 cases. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 540-543
- 25 Ibdah JA. Acute fatty liver of pregnancy: an update on pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7397-7404
- 26 Li XM, Ma L, Yang YB, Shi ZJ, Zhou SS. Clinical characteristics of fulminant hepatitis in pregnancy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4600-4603

编辑 何燕 电编 马文华

肿瘤标志物CA199联合螺旋CT检查胆囊癌33例

林 翀, 廖 彦, 何长有

林翀, 廖彦, 何长有, 海南省农垦总局医院东湖院区检验科
海南省海口市 570203
通讯作者: 林翀, 570203, 海南省海口市, 农垦医院东湖院区检
验科. dhxjslc@163.com
电话: 0898-65374252
收稿日期: 2007-09-28 修回日期: 2007-11-28

Clinical value of combined serum tumor marker CA199 and spiral CT in the diagnosis of gallbladder carcinoma: an analysis of 33 cases

Chong Lin, Yan Liao, Chang-You He

Chong Lin, Yan Liao, Chang-You He, Department of Clinical Laboratory, Nongken Chief Board Hospital of Hainan Province, Haikou 570203, Hainan Province, China
Correspondence to: Chong Lin, Department of Clinical Laboratory, Nongken Chief Board Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan Province, China. dhxjslc@163.com
Received: 2007-09-28 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical value of combined CA199 and spiral CT in the diagnosis of gallbladder carcinoma.

METHODS: Clinical data on 33 patients with gallbladder carcinoma were analyzed retrospectively and assessed for the presence of CA199 with chemoluminescence and spiral CT.

RESULTS: The diagnostic rates of 16-slice spiral CT, serum CA199 and their combination were 72.73%, 81.82% and 66.67%, respectively, with no significant difference ($\chi^2 = 1.98, P > 0.05$). Using spiral CT, 24 patients were diagnosed as having gallbladder carcinoma before treatment, including 10 cases of soft-tissue mass type, 6 cases of cystic wall thickening and 6 cases of intra-cystic type.

CONCLUSION: Determining the presence of serum CA199 may contribute to an early diagnosis of gallbladder carcinoma, and spiral CT data and its typing may provide scientific evidence for making suitable treatment plans. Combined serum CA199 and spiral CT has no effect on the

sensitivity, but can improve the specificity of gallbladder carcinoma diagnosis.

Key Words: Gallbladder carcinoma; Tumor markers CA199; 16-slice spiral CT

Lin C, Liao Y, He CY. Clinical value of combined serum tumor marker CA199 and spiral CT in the diagnosis of gallbladder carcinoma: an analysis of 33 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3641-3643

摘要

目的: 探讨肿瘤标志物CA199测定联合螺旋CT检查对胆囊癌的诊断价值。

方法: 回顾性分析胆囊癌33例, 所有患者术前测定血清CA199含量, 并行螺旋CT检查。

结果: 术前CT、CA199、CT联合CA199诊断符合率依次为72.73%、81.82%和66.67%, 差异无统计学意义($\chi^2 = 1.98, P > 0.05$)。16层螺旋CT术前诊断胆囊癌24例, 包括肿块型10例、壁厚型8例、腔内型胆囊癌6例。

结论: CA199测定有利于胆囊癌的早期发现, 螺旋CT检查及其分型可为术前制订治疗方案提供依据, 两者联合对胆囊癌诊断的灵敏性无影响, 但可以提高特异性。

关键词: 胆囊癌; 16层螺旋CT; 肿瘤标志物CA199; 化学发光法

林翀, 廖彦, 何长有. 肿瘤标志物CA199联合螺旋CT检查胆囊癌33例. *世界华人消化杂志*. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3641-3643
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3641.asp>

0 引言

胆囊癌(gallbladder carcinoma)多与胆囊结石、炎症并存, 其早期症状不明显, 临床表现无特异性。当患者出现消瘦、腹痛加剧、右上腹包块及黄疸时, 已属晚期。患者开始出现症状后平均生存时间约6 mo, 明确诊断后1年的死亡率约为88%, 5年生存率低于5%^[1-3]。因此, 胆囊癌的诊断与治疗是目前胆道外科迫切要解决的问题之一。

背景资料
胆囊癌早期症状不明显, 临床表现无特异性。CA199为血清肿瘤标志, 用于癌症的早期诊断, 螺旋CT检查及其分型可为术前制订治疗方案提供依据。

应用要点
本文应用先进的16层螺旋CT技术结合传统的血清肿瘤标志物CA199诊断胆囊癌,可提高诊断的特异性。

本文回顾性分析我院33例胆囊癌患者的临床资料,探讨血清肿瘤标志物CA199测定联合螺旋CT检查对胆囊癌的诊断价值,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组33例胆囊癌患者均经手术病理证实,男8例,女25例,年龄19-67(平均54.2)岁。50岁以上的患者24例(女18例),占72.73%。所有患者中腺癌23例、鳞癌5例、黏液癌5例,合并胆囊结石18例。临床症状多以右上腹不适、伴腹痛为主,部分病例伴发热、腹胀、乏力、消瘦、纳差和黄疸。

1.2 方法

1.2.1 血清CA199测定: 采集患者晨起空腹静脉血3 mL,离心后取血清置美国雅培公司AXSY全自动免疫分析仪上,用微粒体发光法测定血清CA199含量,操作严格按说明书进行。血清CA199正常参考范围为0-27 kU/L。

1.2.2 螺旋CT检查: 患者禁食6 h以上,开始检查前服温开水1000-1500 mL。使用LightSpeed Ultra 16层螺旋CT扫描机,扫描条件:120 kV,100 mA,层厚3.75 mm,螺距1-1.5 mm,速率3 mL/s。增强扫描用65%泛影葡胺或碘普罗胺注射液80-100 mL,快速静脉滴注或高压注射器2.0-2.5 mL/s注射40-60 s后开始扫描,于5 min后再行延迟扫描。将采集到的原始数据输入GE advantage workstation 4.0工作站进行图像后处理,保存立体感最强图像。

统计学处理 结果用excel录入,用SPSS10.0统计软件包进行处理,计数资料比较 χ^2 检验。

2 结果

本组33例患者中血清CA199阳性者27例,诊断符合率81.82%;术前CT检查诊断为胆囊癌24例,诊断符合率为72.73%;有22例患者术前血清CA199阳性,CT检查诊断为胆囊癌。联合术前CT检查和CA199均诊断为胆囊癌的诊断符合率为66.67%。CA199和CT联合诊断符合率的差异无统计学意义($\chi^2=1.98, P>0.05$)。

术前CT检查诊断为胆囊癌24例,包括三种类型:(1)肿块型10例,胆囊形态不完整或未见胆囊正常形态,胆囊被圆形或不规则肿块充填,仅剩余少量胆囊腔,侵及胆囊管(图1A)。平扫密度不均匀,内见低密度区,增强后见正常肝组织与病灶分界清晰。(2)壁厚型8例,胆囊壁局限性或弥漫性不规则增厚,甚至呈结节状,厚度

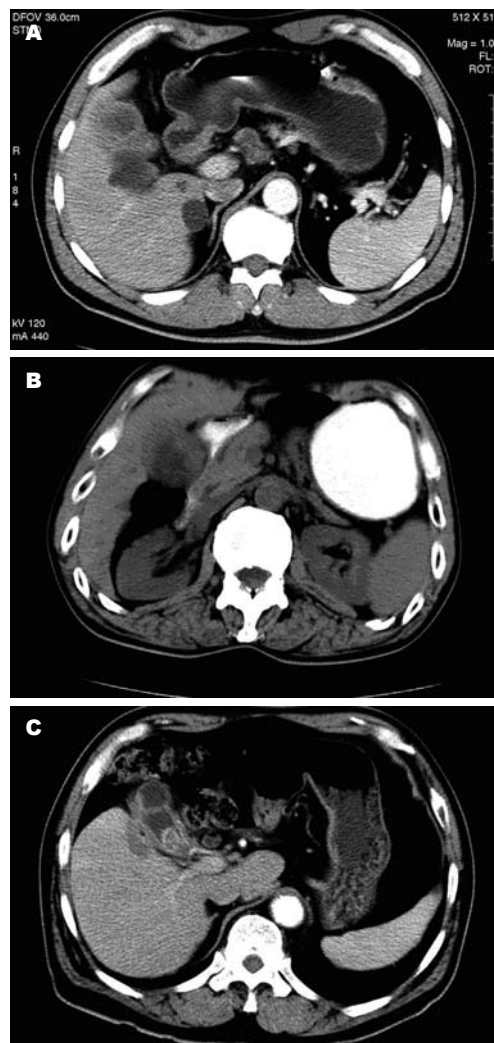


图1 胆囊癌螺旋CT图像。A: 肿块型; B: 壁厚型; C: 腔内型。

0.8-1.5 cm,内缘呈波浪状(图1B)。(3)腔内型6例,胆囊明显增大但形态完整,局部胆囊壁增厚,胆囊壁内侧结节状或蕈伞状软组织肿块突向腔内,平扫密度均匀,增强后密度欠均匀(图1C)。33例中有9例术前CT检查误诊为胆囊炎,其中胆囊结石者7例,肝门胆管癌1例,胰头部占位1例。

3 讨论

胆囊癌是胆道系统常见的恶性肿瘤,在我国消化道肿瘤中居第5-6位,多见于东北和西北地区,在黑龙江省同期普外科疾病中占0.6%^[4]。邹声泉(2000年)回顾性分析全国3922例胆囊癌流行病学资料,提出胆囊癌发生与年龄、性别、职业、饮食和地区等因素有关,发病的高峰年龄为50-70岁,男女发病比例约为1:1.98^[4]。本组33例,54.55%合并胆囊结石,50岁以上的患者占72.73%,男女比例为1:3.125。经病理确诊腺癌23例,占全部病例的69.7%。

血清肿瘤标志物在临床症状、体征或影像学改变出现前, 就呈现在患者血清或组织中, 对于癌症的筛选、辅助诊断、疗效评价及预后监测等具有重要的意义. CA199是一种黏液型糖蛋白, 在正常人血液中含量很低, 但在胰腺癌、胃癌、结直肠癌、胆管癌、卵巢癌、宫颈癌等患者血清中均会升高, 以胰腺癌中升高最为明显, 其次为胆囊癌^[5-14]. 由于CA199并非胆囊癌的特异性肿瘤标记物, 且CA199是Lewis血型抗原的组成部分, 有些人由于缺少这种基因, 即使发生胆囊癌, 外周血CA199仍表现为假阴性^[15]. 因此, CA199需要结合影像学检查并经临床全面系统分析, 才能进一步提高胆囊癌诊断的特异性. 本文33例胆囊癌患者, CA199诊断符合率为81.82%, CT诊断符合率为72.73%, CT和CA199联合诊断符合率为66.67%, 差异无统计学意义($P<0.01$).

影像学检查是诊断胆囊癌的主要方法. 传统X线造影检查已基本被淘汰. 皮肝穿胆道造影(PTC)及逆行胰胆管造影(ERCP)因具有创伤性, 且不能显示腔外情况, 临床诊断具有一定的局限性^[16]. B超检查虽简单、实用、经济, 但易受腹壁肥厚、肠管积气的影响, 并且不易判定结石充满型及萎缩型胆囊壁情况^[17]. 近年来, 螺旋CT及三维重建技术被用于胆囊癌的术前诊断, CT检查可清晰地显示胆囊形态、大小、血供、胆道改变及局部解剖关系, 对胆囊癌的定性诊断和分型有重要价值. 本文应用螺旋CT检查胆囊癌患者, 术前诊断符合率达72.73%. 其中肿块型10例, 占41.67%, 多为晚期, CT表现为胆囊形态不完整, 胆囊腔大部分或完全消失, 胆囊窝内为软组织肿块充填, 肿块边缘不清. 壁厚型8例, 占33.33%. 此型胆囊癌由于肿瘤广泛浸润导致胆囊壁不对称、不均匀增厚, 胆囊多变形、不规则. 腔内型胆囊癌6例, 占25%, CT表现为胆囊形态完整, 向腔内生长的分叶状结节边界清晰. 各型胆囊癌CT特征为临床制定治疗方案具有重要意义.

总之, CA199测定对胆囊癌的早期发现具有重要作用, CT检查对于病灶的发现、形态及分型必不可少. 采用CT和CA199联合诊断可明显提高诊断的特异性, 且不降低胆囊癌的诊断符合

率, 有利于临床制订治疗方案, 建议推广应用.

4 参考文献

- 1 Orth K, Beger HG. Gallbladder carcinoma and surgical treatment. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 501-508
- 2 Sosnik K, Sosnik H. Some aspects of gallbladder carcinogenesis. *Wiad Lek* 2005; 58: 678-681
- 3 Muratore A, Polastri R, Capussotti L. Radical surgery for gallbladder cancer: current options. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 438-443
- 4 邹声泉, 张林. 全国胆囊癌临床流行病学调查报告. *中国实用外科杂志* 2000; 20: 43-46
- 5 Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 266-270
- 6 Nehls O, Gregor M, Klump B. Serum and bile markers for cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 139-154
- 7 Qiu J, Luo P, Wasmund K, Stepleski Z, Kieber-Emmons T. Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines. *Hybridoma* 1999; 18: 103-112
- 8 Sasaki A, Kawano K, Inomata M, Shibata K, Matsumoto T, Kitano S. Value of serum carbohydrate antigen 19-9 for predicting extrahepatic metastasis in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1814-1819
- 9 Yasumoto K, Takahashi Y, Mai M, Kawashima A. Meningeal carcinomatosis preceded by a rapid increase in serum CA19-9 levels in a patient with breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2005; 10: 276-280
- 10 Carmignani CP, Hampton R, Sugarbaker CE, Chang D, Sugarbaker PH. Utility of CEA and CA 19-9 tumor markers in diagnosis and prognostic assessment of mucinous epithelial cancers of the appendix. *J Surg Oncol* 2004; 87: 162-166
- 11 Jiang JT, Wu CP, Deng HF, Lu MY, Wu J, Zhang HY, Sun WH, Ji M. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1675-1677
- 12 Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 431-434
- 13 向明月, 盛泽兰. 血清CEA和CA19-9检测对结直肠癌的诊断价值探讨. *数理医药杂志* 2007; 20: 481-482
- 14 陈艳宁, 姜季, 李焕春, 钟志. CA19-9和CEA联合检测对肠道恶性肿瘤术后复发的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1472-1473
- 15 Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a-its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 2007; 30: 189-209
- 16 李彦婷. B超对胆囊癌的诊断价值. *陕西医学杂志* 2003; 32: 1043-1044
- 17 陈强, 王慧, 包宏伟, 王纪龙, 王志成, 庄奇新. 胆囊癌的CT与B超诊断价值. *上海医学影像* 2007; 16: 33-35

同行评价
本文用16层螺旋CT和CA199联合诊断胆囊癌具有一定的科学性和实用性.

编辑 李军亮 电编 刘勇

血清巨噬细胞抑制因子-1在胰腺癌临床检测诊断中的应用价值

邵长君, 王小兵, 汪毅, 李莱, 田海梅, 单毅, 赵平, 张伟

背景资料
胰腺癌一种发病隐匿的高度恶性肿瘤, 死亡率极高。建立对早期胰腺癌的有效诊断方法是目前提高胰腺癌疗效的唯一有效的方法。目前广泛使用的胰腺癌标志物CA199的敏感性只有70%左右, 对早期胰腺癌的检出价值较低。因此临床急需新的肿瘤标志物以提高早期胰腺癌的诊断率。随蛋白质组学的发展对找寻胰腺癌肿瘤标志物有了很大促进作用, 但有效的肿瘤标志物仍寥寥无几。目前仅有MIC-1显示出了可以应用于临床以提高对胰腺癌诊断率的潜力。虽然早在1997年MIC-1即被发现, 但只在近年来才作为肿瘤标志物进行研究。

邵长君, 王小兵, 李莱, 田海梅, 张伟, 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所生物检测中心 北京市100021
汪毅, 单毅, 赵平, 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院腹部外科 北京市100021
国家十五攻关资助项目, No. 2004BA703B11
国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目, No. 2007AA02Z485
通讯作者: 张伟, 100021, 北京市, 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所生物检测中心。
zhangww1954@126.com
电话: 010-87788430 传真: 010-67718921
收稿日期: 2007-06-13 修回日期: 2007-10-24

Value of macrophage inhibitory cytokine-1 as a novel marker for detecting and diagnosing pancreatic cancer

Chang-Jun Shao, Xiao-Bing Wang, Yi Wang, Mo Li, Hai-Mei Tian, Yi Shan, Ping Zhao, Wei Zhang

Chang-Jun Shao, Xiao-Bing Wang, Mo Li, Hai-Mei Tian, Wei Zhang, Tumor Marker Research Center, Cancer Institute and Cancer Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China
Yi Wang, Yi Shan, Ping Zhao, Department of Abdominal Surgical Oncology, Cancer Institute and Cancer Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China
Supported by: the National Key Technologies R&D Program of China During the 10th Five-year Plan Period, No. 2004BA703B11 and Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2007AA02Z485
Correspondence to: Wei Zhang, Tumor Marker Research Center, Cancer Institute and Cancer Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China. zhangww1954@126.com
Received: 2007-06-13 Revised: 2007-10-24

Abstract

AIM: To evaluate the value of serum macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) as a novel marker for diagnosing pancreatic cancer.

METHODS: Serum MIC-1 levels were measured by sandwich ELISA assay in 101 patients with pancreatic adenocarcinomas, 10 patients with benign pancreatic tumors, and 50 healthy control subjects. The diagnostic performance of se-

rum MIC-1 as a marker of pancreatic cancer was compared with that of serum CA199.

RESULTS: MIC-1 levels were significantly higher in patients with pancreatic adenocarcinoma than in those with benign pancreatic neoplasms or in healthy controls (1427 ± 1056 ng/L vs 362 ± 177 ng/L, 299 ± 159 ng/L). The diagnostic accuracy of MIC-1 (sensitivity 81.2%, specificity 94%, positive predictive value 96.5%, negative predictive value 71.2%; AUC 0.92) at detecting pancreatic adenocarcinomas was higher than that of CA199 (sensitivity, 72.4% specificity 89.6%, positive predictive value 93.4%, negative predictive value 61.4%; AUC 0.86), and the combination of MIC-1 and CA199 significantly improved diagnostic sensitivity (91.1%).

CONCLUSION: MIC-1 can become a novel tumor marker and aid in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma.

Key Words: Pancreatic adenocarcinomas; Macrophage inhibitory cytokine-1; CA199; Enzyme linked immunosorbent assay

Shao CJ, Wang XB, Wang Y, Li M, Tian HM, Shan Y, Zhao P, Zhang W. Value of macrophage inhibitory cytokine-1 as a novel marker for detecting and diagnosing pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3644-3648

摘要

目的: 探讨MIC-1作为新的肿瘤标志物在胰腺癌临床血清学诊断中的应用价值。

方法: 采用酶联免疫方法检测101例胰腺癌、10例胰腺良性病变患者及50例正常人血清中的MIC-1表达水平, 并与肿瘤标志物CA199进行比较。

结果: 胰腺癌患者血清中MIC-1表达水平(1427 ± 1056 ng/L)显著高于胰腺良性肿瘤(362 ± 177 ng/L)和正常人血清水平(299 ± 159 ng/L)($P < 0.001$)。MIC-1检测胰腺癌的敏感性、

特异性、阳性预测值、阴性预测值和AUC分别为81.2%、94%、96.5%、71.2%和0.92, 分别高于CA199的相应对应值72.4%、89.6%、93.4%、61.4%和0.86. 与CA199联合检测时, 敏感性可提高至91.1%.

结论: MIC-1有可能成为用于胰腺癌临床诊断的新肿瘤标记物.

关键词: 胰腺癌; 巨噬细胞抑制因子; CA199; 酶联免疫方法

邵长君, 王小兵, 汪毅, 李茉, 田海梅, 单毅, 赵平, 张伟. 血清巨噬细胞抑制因子-1在胰腺癌临床检测诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3644-3648
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3644.asp>

0 引言

胰腺癌是一种高度恶性肿瘤, 具有发病隐匿、恶性度高、预后差、生存率低等特点, 其发病率呈上升趋势, 死亡率与发病率之比接近于1. 由于胰腺癌早期缺乏特异的临床表现, 80%以上的胰腺癌患者在确诊时已有局部扩散和远处转移而不能进行手术治疗, 中位生存期只有3-6 mo, 5年生存率小于5%. 早期胰腺癌手术治疗是目前唯一提高胰腺癌疗效的有效方法, 术后5年生存率可提高到19%-41%. 因此胰腺癌的早期诊断对其手术治疗及预后至关重要^[1-2]. 目前广泛使用的胰腺癌标志物CA199的敏感性只有70%左右, 对早期胰腺癌的检出价值较低. 因此临床急需开发新的肿瘤标记物以提高早期胰腺癌的诊断率. 巨噬细胞抑制因子-1(MIC-1)是近期发现的肿瘤标志物^[3-4], 作为TGF- β 家族的成员, 广泛参与细胞凋亡、侵袭及转移等生物学过程. 正常人血清中的MIC-1是经剪切成熟的含有TGF- β 家族保守的7-半胱氨酸结构域同源二聚体蛋白(约为25 kDa), 呈低水平稳定的表达. Koopmann *et al*^[5]发现, 在胰腺癌患者血清中MIC-1的表达水平显著升高, 具有用于临床诊断胰腺癌的价值.

本文通过检测胰腺癌、良性胰腺肿瘤患者和正常人血清中MIC-1表达水平, 进一步探讨MIC-1作为胰腺癌临床诊断新标志物的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医学科学院肿瘤医院2003-12/2006-12期间经细胞或病理学诊断的胰腺癌患者术前血清样本101例, 男68例, 女33例, 平均年龄

为58.77岁. 按UICC 2002年胰腺癌TNM分期标准分为I期4例, II期8例, III期52例, IV期37例; 按肿瘤位置分为胰头49例, 胰尾37例, 胰体部13例, 全胰2例. 另外还收集良性胰腺实性假乳头状瘤10例, 正常人50例(男26例, 女24例, 平均年龄为40.89岁). 采集正常人及患者术前静脉血, 所有血清样本均无溶血、脂血, 收集血清后立即置于-70℃冰箱中保存. MIC-1检测试剂盒为美国R&D公司生产(Lot4301), 高吸附酶标板为Biomat公司生产, TMB显色剂(LotFL001)及浓缩洗涤剂(LotFL017)为晶美公司生产, 伯乐450酶免疫分析仪为美国伯乐公司生产, 水浴箱为天津泰斯特仪器有限公司生产, CA199试剂盒为美国Roche生产.

1.2 方法 CA199测定按照试剂盒说明书进行. MIC-1浓度测定采用生物素-亲和素放大系统的ELISA双抗体夹心两步法, 每个样品均设有平行孔. 实验步骤如下: (1)标准品的制备: 以10 g/L BSA-VI(20 mmol/L、pH7.4 PBS)为稀释液将标准抗原从浓度500 ng/L开始倍比稀释7次. (2)包被: 50 mmol/L、pH9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗体稀释至2 mg/L, 然后以100 μ L/孔加入96孔微孔板中, 4℃过夜, 弃包被液并洗涤2次, 以300 μ L/孔加入封闭液(10 g/L BSA-VI、20 mmol/L PBS), 室温2 h, 弃封闭液并洗涤2次后备用. (3)加样: 将血清按1:10稀释, 按100 μ L/每孔加入孔中, 室温2 h. 洗涤3次后每孔加入100 μ L生物素化兔多抗(50 μ g/L), 室温2 h, 洗涤3次, 再以50 μ L/孔加入亲和素化辣根过氧化物酶, 室温40 min, 洗涤4次. (4)显色: 每孔分别滴加入A液和B液各50 μ L, 室温20 min, 加入1 mol/L H₂SO₄ 50 μ L终止反应, 测A₄₅₀值. (5)参考值和阳性判断值: CA199参考值为0-37 kU/L, CA199>37 kU/L判断为阳性. 以MIC-1浓度(ng/L)为横坐标, A值为纵坐标, Log-Log拟合曲线, MIC-1的cutoff值设定为正常人浓度值的mean \pm 2SD. 大于cutoff值判断为阳性.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS12.0统计软件, 进行t检验、方差分析及相关性分析等统计分析.

2 结果

2.1 胰腺癌患者血清中MIC-1表达水平 胰腺癌患者101例和正常对照组血清MIC-1浓度分别为1427 \pm 1056 ng/L、299 \pm 159 ng/L, 两者差异显著($P<0.001$). 胰腺良性肿瘤病变患者10例血清

相关报道
Koopmann *et al*研究表明血清MIC-1对胰腺癌检测的敏感性、特异性分别为90%和94%. 在8例T1-T2的早期胰腺癌患者中有6例MIC-1表达水平升高, 而CA199升高的只有3例.

应用要点

本文研究表明,在临床血清学诊断胰腺癌中MIC-1敏感性高于CA199,与CA199联合检测可以有效提高检出率,进一步表明MIC-1有可能成为用于胰腺癌临床诊断的新肿瘤标记物。

表 1 胰腺病变患者与正常对照组血清中MIC-1和CA199测定结果(mean ± SD)

分组	MIC-1(ng/L)			CA199 (kU/L)		
	<i>n</i>		<i>P</i> 值	<i>n</i>		<i>P</i> 值
正常	50	299 ± 159		48	10.0 ± 13.8	
胰腺癌	101	1427 ± 1056	0.000	98	1621.0 ± 4570.1	0.016
+ 期	12	1107 ± 1139	0.005	12	276.3 ± 324.2	0.000
期	52	1366 ± 986	0.000	49	987.3 ± 3243.4	0.002
期	37	1057 ± 1021	0.000	37	3037.2 ± 6412.7	0.040
胰腺假乳头状瘤	10	362 ± 177	0.001	10	168.6 ± 478.9	0.021

MIC-1浓度为362 ± 177 ng/L, 与胰腺癌相比差异性显著($P < 0.001$). 此外, 分析胰腺癌临床各期患者血清MIC-1表达水平, 结果显示与正常组相比均具有显著性差异, 而各期之间无明显差异(表1).

2.2 MIC-1与CA199在胰腺癌临床诊断中的比较 MIC-1的阈值为617 ng/L, MIC-1检测胰腺癌的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值依次为81.2%、94%、96.5%和71.2%, 高于CA199的72.4%、89.6%、93.4%和61.4%(表2). ROC曲线分析MIC-1、CA199的曲线下面积(AUC)分别为0.92和0.86(图1). MIC-1与CA199联合检测胰腺癌的敏感性可以提高至91.1%. 在区分胰腺良性与恶性肿瘤方面, MIC-1的鉴别能力优于CA199. 10例胰腺实性假乳头状瘤患者只有1例MIC-1检测呈弱阳性, 与正常对照组无明显差异($P = 0.891$), 而CA199呈阴性例数为7例.

2.3 胰腺癌患者血清中MIC-1表达水平与胰腺癌临床病理各参数的相关性分析 胰腺癌患者血清中的MIC-1表达水平与肿瘤大小、分期、转移等因素无相关性. 在肿瘤体积小于2 cm的4例胰腺癌早期患者中, 2例患者血清MIC-1含量大于1400 ng/L, 呈现强阳性. 在12例 I - II 期胰腺癌患者中, 有5例患者血清MIC-1含量大于617 ng/L, 11例患者血清MIC-1表达水平高于正常组平均值, 差异显著($P = 0.005$).

3 讨论

MIC-1是bootcov于1997年从人髓系白血病细胞系U937中的cDNA文库中分离出来的新基因^[6], 又称为GDF-15、NAG-1、PDF、PLAB、PTGFB. 辐射、缺氧、多种抗癌药物如维甲酸(RA)、非甾类抗炎药物(NASID)以及细胞因子TNF- α 、IL-1 α 、IL-6都能够增加MIC-1的表达. MIC-1是其前肽经furin样蛋白酶剪切后形成的同源二聚体, 作为分泌型细胞因子分泌到细胞外^[7]. 在生

表 2 血清MIC-1对胰腺癌的临床诊断价值(%、*n*/*n*)

	MIC-1	CA199	MIC-1+CA199
敏感性	81.2%(82/101)	72.4%(71/98)	91.1%(92/101)
特异性	94%(47/50)	89.6%(43/48)	88%(44/50)
阳性预测率	96.5%(82/85)	93.4%(71/76)	93.9%(92/98)
阴性预测率	71.2%(47/66)	61.4%(43/70)	83.0%(44/53)

理状态下, MIC-1高表达于胎盘组织和中枢神经系统上皮组织, 如脉络丛、室管膜, 在前列腺、结肠、肾、脑、肝、胰腺等组织中呈低表达. 然而在病理状态下如肿瘤、急性损伤及炎症, MIC-1表达水平可显著升高^[8]. MIC-1具有促进细胞凋亡^[9-10]、抑制上皮细胞生长、降低细胞黏附^[11]及增强肿瘤细胞的侵袭与转移^[12-13]等生物学功能, 在调节肿瘤细胞与生长环境相互作用中发挥重要功能.

Koopmann *et al*^[14]率先报道了血清中MIC-1表达水平对诊断胰腺癌的价值, 结果表明胰腺癌患者血清中MIC-1表达水平显著高于正常人, 检测的敏感性、特异性分别为90%和94%^[14]. 本研究表明, MIC-1在胰腺癌患者血清中的表达水平显著高于正常人, 诊断胰腺癌的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、AUC依次为81.2%、94%、96.5%、71.2%和0.92, 高于CA199的72.4%、89.6%、93.4%、61.4%和0.86, 其中敏感性略低于Koopmann *et al*的报道. 值得关注的是, MIC-1与CA199联合检测胰腺癌敏感性可提高至91.1%, 说明两者具有很好的联合诊断胰腺癌的价值. MIC-1可以有效的区分胰腺良性肿瘤与恶性肿瘤($P < 0.001$). 10例胰腺实性假乳头状瘤中只有1例检出呈弱阳性. 在早期胰腺癌诊断方面, 4例肿瘤最大径小于2 cm的早期胰腺癌患者, MIC-1和CA199的检出率同为50%, 与

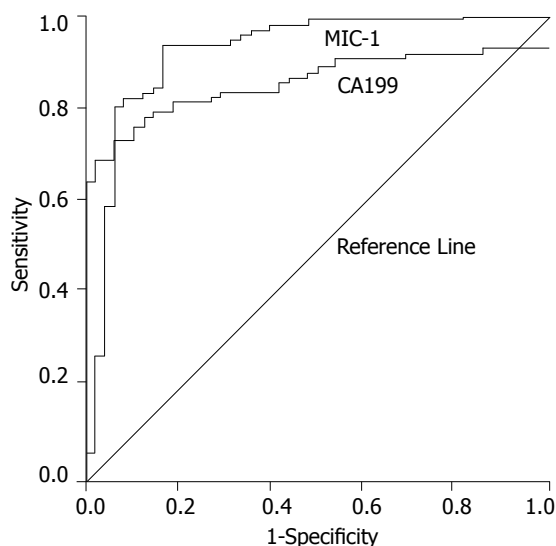


图 1 MIC-1与CA199对胰腺癌诊断的ROC曲线图.

Koopmann *et al*^[14]报道的检出率(6/8)相一致. 在12例 I 期和 II 期患者血清中MIC-1显著高于正常组($P = 0.005$), 提示连续测定高危人群血清MIC-1, 有可能预警和发现早期癌变, 在评估胰腺癌的早期发病风险方面具有价值. 本文也表明, 血清MIC-1表达水平与胰腺癌TNM分期、转移、肿瘤大小无相关性. 除胰腺癌外, MIC-1在其他一些肿瘤患者血清中如前列腺癌和结肠癌表达水平也显著升高, 但检测敏感性较胰腺癌低^[3-4].

目前研究表明, MIC-1在肿瘤发展进程中具有抑制与促进的双重作用. 一方面高表达的MIC-1具有抑制肿瘤生长的作用, 例如高表达的MIC-1能够抑制化学和遗传等因素诱发小鼠消化道肿瘤的发生^[15]. 转染MIC-1基因可以使某些肿瘤细胞系丧失了体内致瘤能力^[16]. 另一方面高表达的MIC-1也具有促进肿瘤侵袭、转移的作用, 例如转染MIC-1基因的胃癌细胞侵袭能力有明显增强^[12]. MIC-1参与调控肿瘤发生的机制十分复杂. MIC-1受P53、NF- κ B、EGR-1和AKT/GSK-3 β 等基因的调控, 也是PKC下游的靶基因^[17]. MIC-1被P53诱导表达后, 能够抑制cyclin D1的表达, 介导细胞凋亡. 高表达的MIC-1能够通过ERK1/2通路上调uPA和uPA受体, 使肿瘤细胞黏附性降低、侵袭性增强^[11-12]. 高表达的MIC-1还能够抑制巨噬细胞的活性, 降低炎症与免疫反应, 利于肿瘤细胞的生存. 因此, 可以推测MIC-1在肿瘤发生的早期中起正常机体抵抗肿瘤的抑瘤作用, 而在肿瘤进展晚期中起促进肿瘤侵袭和转移的作用.

本文表明, 在临床血清学诊断胰腺癌中, MIC-1敏感性高于CA199, 与CA199联合检测可以有效提高检出率, 并可以有效地鉴别胰腺癌和胰腺良性肿瘤. 此外, MIC-1能否用于早期胰腺癌临床检测及高危人群的筛查, 还需扩大样本进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004; 59: 99-111
- 2 张学宏, 高玉堂. 胰腺癌的流行病学. *胰腺病学* 2005; 3: 180-183
- 3 Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, Bauskin AR, Kinzler KW, Vogelstein B, Breit SN. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2642-2650
- 4 Brown DA, Stephan C, Ward RL, Law M, Hunter M, Bauskin AR, Amin J, Jung K, Diamandis EP, Hampton GM, Russell PJ, Giles GG, Breit SN. Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 89-96
- 5 Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Fukushima N, Sokoll LJ, Chan DW, Yeo CJ, Hruban RH, Breit SN, Kinzler KW, Vogelstein B, Goggins M. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2386-2392
- 6 Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 11514-11519
- 7 Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, Rasiiah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst GJ, Johnen H, Russell PJ, Barret W, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 2005; 65: 2330-2336
- 8 Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, Breit SN. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 4983-4986
- 9 Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1023-1029
- 10 Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, Perez EA, Pierce RH, Chavin KD, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms. *J Surg Res* 2006; 130: 45-51
- 11 Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankhurst S, Russell PJ, Breit SN. Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5034-5040
- 12 Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin

同行评价
本文设计合理, 数据可信, 有较好的临床应用价值.

- SM, Song KS, Lee YH, Kim YJ, Lee JJ, Choi I, Lee JH. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; 63: 4648-4655
- 13 Wollmann W, Goodman ML, Bhat-Nakshatri P, Kishimoto H, Goulet RJ Jr, Mehrotra S, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 900-907
- 14 Koopmann J, Rosenzweig CN, Zhang Z, Canto MI, Brown DA, Hunter M, Yeo C, Chan DW, Breit SN, Goggins M. Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 442-446
- 15 Baek SJ, Okazaki R, Lee SH, Martinez J, Kim JS, Yamaguchi K, Mishina Y, Martin DW, Shoieb A, McEntee MF, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 2006; 131: 1553-1560
- 16 Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG, Hegi ME. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002; 21: 4212-4219
- 17 Shim M, Eling TE. Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 18636-18642

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志 2007 年 1 - 11 月份 收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 世界华人消化杂志2007年1-9月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-09-30, 世界华人消化杂志共收到稿件1450篇, 退稿585篇, 退稿率40.34%。发表文章707篇, 其中述评44篇(6.2%), 基础研究181篇(25.6%), 临床研究89篇(12.6%), 文献综述100篇(14.1%), 研究快报84篇(11.9%), 临床经验179篇(25.3%), 病例报告10篇(1.4%), 焦点论坛19篇(2.7%)。会议纪要1篇(0.14%), 英文摘要677篇(95.8%)。其中受国家级基金资助的157篇(22.2%), 省部级基金资助的222篇(31.4%)。作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院。(常务副总编辑: 张海宁 2007-11-15)

Cdk3在结肠癌变过程中的表达及其意义

黄大毛, 王巍巍, 莫莉, 冯德元, 颜亚晖, 蒋海鹰, 唐发清

黄大毛, 王巍巍, 莫莉, 唐发清, 中南大学湘雅医院检验科 湖南省长沙市 410008
冯德元, 颜亚晖, 蒋海鹰, 中南大学湘雅医学院病理学系 湖南省长沙市 410008
国家自然科学基金资助项目, No. 30572455
2006年教育部优秀人才支持计划资助项目
通讯作者: 唐发清, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院. tangfaqing333@hotmail.com
电话: 0731-4327168
收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-10-18

Expression of Cdk3 in colon carcinogenesis and its significance

Da-Mao Huang, Wei-Wei Wang, Li Mo, De-Yuan Feng, Ya-Hui Yan, Hai-Ying Jiang, Fa-Qing Tang

Da-Mao Huang, Wei-Wei Wang, Li Mo, Fa-Qing Tang, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

De-Yuan Feng, Ya-Hui Yan, Hai-Ying Jiang, Department of Pathology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572455 and Program for New Century Excellent Talents in University

Correspondence to: Professor Fa-Qing Tang, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. tangfaqing333@hotmail.com

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-10-18

Abstract

AIM: To investigate the expression profile of Cdk3 in colon polyp, adenoma and its adjacent tissues and its significance in the evolution of colon cancer.

METHODS: Using immunohistochemistry and in situ hybridization, Cdk3 protein and mRNA expressions were detected in 22 cases of colon cancer, 22 cases of colonic adenoma and 24 cases of colonic polyp.

RESULTS: Immunohistochemistry and in situ hybridization showed Cdk3 protein in the cytoplasts and cytoplasm of colonic polyp, colonic adenoma and cancer tissues. Cdk3 was mainly expressed in cytoplasm. Image analysis revealed that the mean optical density of Cdk3 protein in

colon cancer tissue (0.80 ± 0.36) was significantly higher than that in colon adenoma (0.48 ± 0.22) and polyp tissues (0.25 ± 0.13 , $P < 0.05$), and the mean optical density of colonic adenomas was significantly higher than that of colon polyps ($P < 0.05$). The results of in situ hybridization showed significantly more cells expressing Cdk3 mRNA in colon cancer tissue (266.5 ± 40.2) than in colon adenoma (132.0 ± 37.4) and polyp tissues (129.3 ± 26.7 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Cdk3 expression gradually increases during the course of colon cancerization. Cdk3 may be involved in colon carcinogenesis.

Key Words: Cdk3; Colon cancer; Immunohistochemistry; In situ hybridization assay

Huang DM, Wang WW, Mo L, Feng DY, Yan YH, Jiang HY, Tang FQ. Expression of Cdk3 in colon carcinogenesis and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3649-3653

摘要

目的: 研究Cdk3在结肠息肉、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达, 探讨Cdk3在结肠癌变过程中的演变规律及其意义。

方法: 用免疫组织化学和原位杂交的方法检测22例结肠癌组织、22例结肠腺瘤组织、24例结肠息肉组织中Cdk3蛋白和mRNA的表达。

结果: Cdk3蛋白和mRNA在结肠息肉、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达呈核-质型, 以质为主。图像分析结果显示, 结肠癌组织中Cdk3蛋白表达平均光密度值(0.80 ± 0.36)明显高于结肠腺瘤组织(0.48 ± 0.22)和结肠息肉组织(0.25 ± 0.13)($P < 0.05$), 结肠腺瘤组织中Cdk3蛋白表达平均光密度值明显高于结肠息肉组织($P < 0.05$), 结肠癌组织中的阳性细胞数(266.5 ± 40.2)明显高于结肠腺瘤组织(132.0 ± 37.4)和结肠息肉组织(129.3 ± 26.7)。

结论: Cdk3在结肠癌变过程中表达逐步增强, 在结肠癌组织中异常高表达, 可能在结肠癌变过程中发挥重要作用。

背景资料
Cdk3基因在乳腺癌等肿瘤组织中高度重排, 在体外能够促进细胞转化, 但是否参与癌变以及作用机制并不十分清楚。研究Cdk3在结肠癌等肿瘤组织中的表达有助于寻找Cdk3在肿瘤组织中异常活化的证据, 为研究Cdk3与肿瘤的关系提供新的实验依据。

研发前沿

Cdk3是一种细胞周期正性调控因子,其生物学功能研究是当前细胞周期研究的热点.是否与其他细胞周期正性调控因子(如Cdk4, cyclin D1等)一样具有致癌潜能是目前有关Cdk3研究的难点.为明确Cdk3是否参与癌变,首先考察其在癌变过程的异常表达和异常活化.

关键词: Cdk3; 结肠癌; 免疫组织化学; 原位杂交

黄大毛, 王巍巍, 莫莉, 冯德元, 颜亚晖, 蒋海鹰, 唐发清. Cdk3在结肠癌变过程中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3649-3653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3649.asp>

0 引言

Cdk3是一种新的与CDC2相关的细胞周期依赖性蛋白激酶,在细胞周期中发挥重要作用^[1-3].作为一种细胞正性调控因子,Cdk3不仅参与细胞周期G1/S转换^[4-6]和促进G0期退出^[4],而且能够促进细胞停泊非依赖性生长^[7].在大多数正常组织或细胞中Cdk3表达极低,而在肿瘤组织中表达以及异常活化情况目前尚不清楚.结肠癌(colon cancer)是胃肠道常见的恶性肿瘤.我们研究Cdk3在结肠癌变过程中的表达,以获得Cdk3在结肠癌变过程中的表达规律及其在结肠癌中高表达证据,为研究Cdk3在肿瘤发生、发展过程中的作用提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 中南大学湘雅医院病理科2005/06-10的住院和门诊患者送检标本68例,其中结肠癌22例,男12例,女10例,平均年龄(49.3±15.3)岁;结肠腺瘤22例,男13例,女9例,平均年龄(57.8±12.1)岁;结肠息肉24例,男13例,女11例,平均年龄(53.8±14.0)岁,均经临床诊断和病理诊断确诊.兔抗人Cdk3 mAb(Santa Cruz, CA),SABC免疫组化染色试剂盒、Cdk3原位杂交试剂盒、DAB购于武汉博士德公司,HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统购于同济千屏影像公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法检测Cdk3蛋白: 实验操作严格按照SABC免疫组化染色试剂盒说明书进行.一抗稀释度为1:100,用0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液进行微波抗原修复,DAB显色,苏木素复染,干燥后中性树脂封片.实验结果采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行分析.每张组织切片随机选取15个高倍视野(×400)测量光密度,计算平均光密度值.

1.2.2 原位杂交实验检测Cdk3 mRNA: 对同一标本用原位杂交的方法检测Cdk3 mRNA表达,实验操作严格按照Cdk3原位杂交试剂盒说明书进行.用30 g/L柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶暴露mRNA核酸片段,然后进行后固定、预杂交和

杂交,滴加生物素化鼠抗地高辛和生物素化过氧化物酶后DAB显色,苏木素复染,干燥后中性树脂封片,显微镜下观察结果.以细胞核或细胞质出现浅黄色至深棕黄色颗粒为阳性反应细胞.实验结果采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行分析.每张组织切片选取15个高倍视野(×400)计数阳性细胞数.

统计学处理 资料采用SPSS10.0统计软件对数据进行统计学分析,数值用mean±SD表示.多组间均数比较采用方差分析.

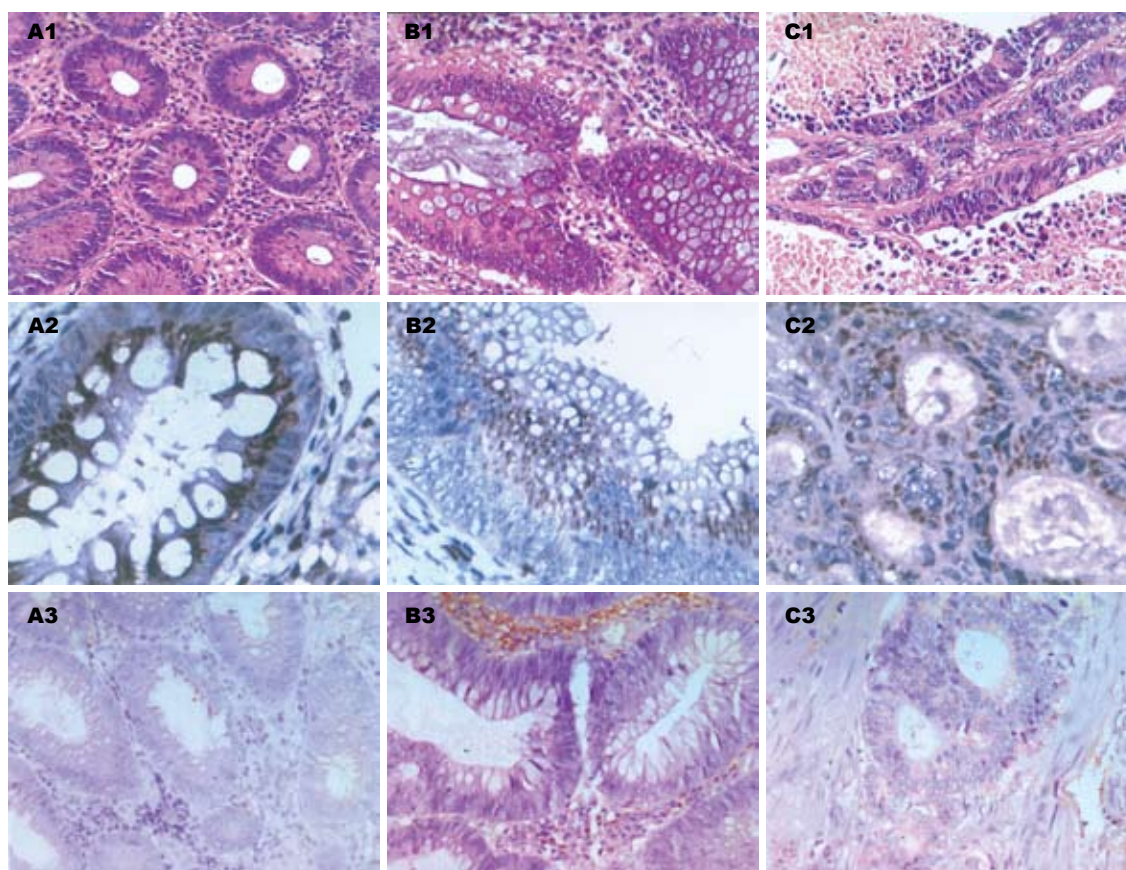
2 结果

2.1 68例结肠息肉、结肠腺瘤和结肠癌组织中Cdk3蛋白和mRNA检测 显微镜下观察结果显示,Cdk3蛋白和mRNA在结肠息肉、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达呈核-质型,以质为主(图1).以细胞核或细胞质出现浅黄色颗粒为弱阳性,出现黄色颗粒至深棕黄色颗粒为阳性,不出现上述显色颗粒为阴性(表1).结果显示,结肠息肉、腺瘤、癌组织中Cdk3蛋白表达阳性率分别为29.17%,45.45%和81.82%;结肠息肉、腺瘤、癌组织中Cdk3 mRNA表达阳性率分别为33.33%,45.45%和86.36%.其中免疫组化和原位杂交均阴性26例(38.24%),均阳性(包括弱阳性)31例(45.59%).结果表明,Cdk3蛋白和mRNA在结肠息肉、结肠腺瘤和结肠癌阳性率呈逐步上升的趋势.

2.2 Cdk3蛋白和mRNA表达的量化分析 结果显示,结肠癌组织中的Cdk3蛋白平均光密度(0.80±0.36)明显高于结肠腺瘤组织(0.48±0.22)和结肠息肉组织(0.25±0.13, $P<0.05$),结肠腺瘤组织中的平均光密度明显高于结肠息肉组织($P<0.05$,图2A),结肠癌组织中的Cdk3 mRNA阳性细胞数(266.5±40.2)明显高于结肠腺瘤组织(132.0±37.4)和结肠息肉组织(129.3±26.7, $P<0.05$,图2B).

3 讨论

Cdk3是一种重要的细胞周期依赖性蛋白激酶,在细胞周期调节过程中起着重要作用^[8-10].Cdk3通过DP-1与E2F1-3结合增强他们的转录活性而参与G1/S转换^[4-6].作为一个蛋白激酶,Cdk3与cyclin C结合使pRb Ser 807/811位磷酸化而促进G0期退出,Cdk3-DN能够导致G1期阻止^[6]和抑制pRb Ser 807/811位磷酸化而阻止G0期退出^[4].Cdk3与CDC2(Cdk1)和Cdk2有高度的同源性,但在细



相关报道
国外研究发现高水平的Cdk3可以促进Myc介导的细胞增殖和细胞停泊非依赖性生长, Cdk3基因在乳腺癌以及其他肿瘤组织中高度重排。

图 1 结肠息肉, 腺瘤和癌组织的表达(A1-C1: HE $\times 400$; A2-C2: 蛋白免疫组化 $\times 400$; A3-C3: 原位杂交)。A1 - A3: 结肠息肉; B1 - B3: 结肠腺瘤Cdk3蛋白; C1 - C3: 腺癌Cdk3 mRNA。

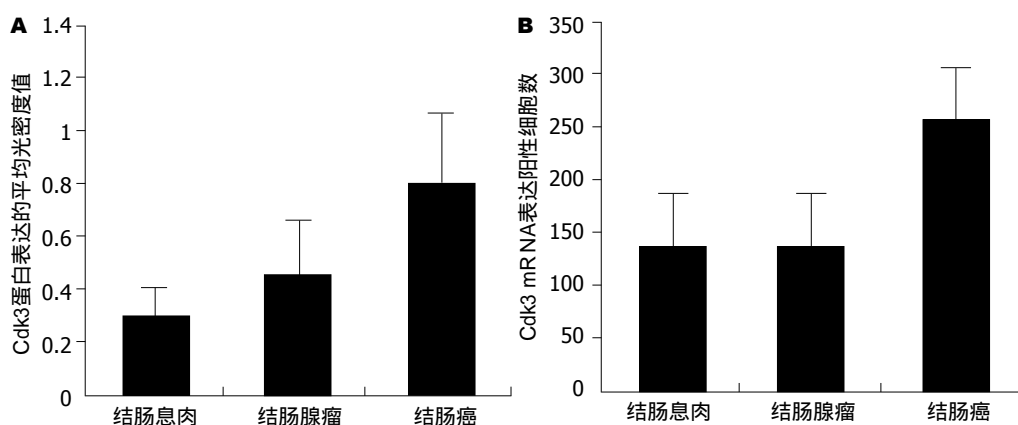


图 2 Cdk3的表达. A: 蛋白; B: mRNA。

胞周期调节中的作用又截然不同^[6,11-12]。Cdk3显性负性突变体(Cdk3 dominant-negative mutant, Cdk3-DN)介导的G1期阻止能够被野生型Cdk3解除^[7], 却不能被Cdk2解除^[6]。另外Cdk3介导ik-3 Ser 274位磷酸化而参与细胞周期的调节^[13-15]。Cdk3参与细胞周期的调控的研究取得了一定进展, 而Cdk3的确切生物学功能和在肿瘤发生、发展中的作用并不十分清楚。

Cdk3参与G1/S转换以及促进G0期退出等都

表明Cdk3具有促进细胞增殖的功能。Cdk3也是一种细胞周期正性调控因子^[16-17], 许多细胞周期正性调控因子具有致癌潜能^[18]。但是Cdk3是否与其他细胞周期正性调控因子一样具有致癌潜能却并不清楚。要研究Cdk3的致癌潜能, 我们首先要考察其在肿瘤组织中异常表达情况。在正常生理状况下, Cdk3在大多数细胞和组织中活性极低^[4]。然而当受到EGF刺激或在细胞癌变过程中基因高度重排时Cdk3活性显著升高^[19]。另

应用要点
Cdk3在结肠癌变早期结肠腺瘤中就开始高表达,可能为结肠癌的早期诊断提供新的分子靶标。

表 1 68例结肠息肉、腺瘤和癌组织中Cdk3蛋白和mRNA表达

编号	病理号	病理类型	免疫组化结果	原位杂交结果
1	643966	息肉	-	-
2	643251	息肉	-	-
3	642889	息肉	-	-
4	641810	息肉	+	+
5	641763	息肉	±	+
6	641605	息肉	+	-
7	640714	息肉	-	-
8	640551	息肉	-	±
9	640179	息肉	+	+
10	640002	息肉	-	-
11	639610	息肉	+	±
12	639098	息肉	+	±
13	638864	息肉	±	-
14	638783	息肉	-	-
15	638094	息肉	-	+
16	636821	息肉	-	-
17	636474	息肉	-	-
18	635248	息肉	-	-
19	635128	息肉	-	-
20	634783	息肉	-	-
21	633969	息肉	-	-
22	633373	息肉	-	-
23	633344	息肉	-	-
24	633156	息肉	+	+
25	641971	腺瘤	+	+
26	644139	腺瘤	-	-
27	644044	腺瘤	+	+
28	639941	腺瘤	±	-
29	643179	腺瘤	-	-
30	640587	腺瘤	-	-
31	641092	腺瘤	-	+
32	640584	腺瘤	-	-
33	638863	腺瘤	-	-
34	638782	腺瘤	-	+
35	638334	腺瘤	+	+
36	637900	腺瘤	-	-
37	637258	腺瘤	+	±
38	636767	腺瘤	+	+
39	636475	腺瘤	-	-
40	636059	腺瘤	-	-
41	635997	腺瘤	+	+
42	639943	腺瘤	±	+
43	635378	腺瘤	-	-
44	633637	腺瘤	+	+
45	640600	腺瘤	+	-
46	643033	腺瘤	-	-
47	643912	腺癌	+	+
48	643640	腺癌	+	+
49	643517	腺癌	+	+

50	643465	腺癌	-	-
51	642925	腺癌	±	+
52	642534	腺癌	+	+
53	642535	腺癌	+	+
54	642211	腺癌	+	+
55	642188	腺癌	+	+
56	642160	腺癌	-	-
57	641643	腺癌	±	±
58	640839	腺癌	+	+
59	640040	腺癌	+	+
60	639884	腺癌	+	±
61	639419	腺癌	-	+
62	639158	腺癌	+	±
63	638836	腺癌	+	+
64	638790	腺癌	±	+
65	638565	腺癌	+	-
66	638475	腺癌	-	+
67	638403	腺癌	+	±
68	638174	腺癌	+	+

+为阳性; ±为弱阳性; -为阴性。

外研究表明Cdk3能够促进Myc介导的细胞停泊非依赖性生长^[5]。这些都强烈提示Cdk3可能参与肿瘤的形成。而目前有关Cdk3在肿瘤组织中的表达和异常活化情况国内外尚未见报道。结肠癌发生、发展的演进过程具有明显的形态学时相。正常的结肠黏膜由最初的上皮增生发展成为良性腺瘤,再经腺瘤转变为具有浸润转移潜力的结肠癌。细胞形态学上,由单纯性增生发展为异型增生,再转化为癌^[20]。这为我们研究Cdk3在癌变过程中表达规律提供了良好的模型。因此,我们分别用免疫组化和原位杂交的方法检测结肠癌组织、结肠腺瘤组织、结肠息肉组织中的Cdk3蛋白和mRNA的表达,结果显示,Cdk3蛋白和mRNA在结肠息肉、腺瘤、癌组织中表达逐步升高,而且蛋白和mRNA的表达呈现高度的一致性,结肠癌组织中Cdk3蛋白和mRNA表达明显高于结肠息肉和腺瘤组织。这表明Cdk3在结肠癌变过程中的表达逐步增强,在结肠癌组织中异常活化,因而Cdk3可能在结肠癌变过程中发挥重要作用。Cdk3在结肠腺瘤组织的高表达,说明Cdk3异常活化发生在结肠癌变的早期,可能为结肠癌的早期诊断提供新的分子靶标。

本研究发现,Cdk3在结肠癌变过程中异常活化以及在结肠癌组织中高表达。因此,我们认为Cdk3可能参与结肠癌变。这为研究Cdk3在肿瘤发生、发展过程中的作用提供了实验依据,也为结肠癌变的分子机制研究提供了新的思路。

而Cdk3参与癌变的作用机制尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 黄大毛, 莫莉, 唐发清. 细胞周期依赖性蛋白激酶3(CDK3)的研究进展. *实用预防医学* 2007; 14: 247-249
- 2 Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 1992; 11: 2909-2917
- 3 Lew J, Wang JH. Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 33-37
- 4 Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 2004; 117: 239-251
- 5 Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Wang Z. The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1996; 10: 2949-2959
- 6 van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262: 2050-2054
- 7 Braun K, Holzl G, Soucek T, Geisen C, Moroy T, Hengstschnlager M. Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation. *Oncogene* 1998; 17: 2259-2269
- 8 Draetta GF. Mammalian G1 cyclins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 842-846
- 9 Zwicker J, Muller R. Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression. *Trends Genet* 1997; 13: 3-6
- 10 Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 2003; 424: 223-228
- 11 Hofmann F, Livingston DM. Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit. *Genes Dev* 1996; 10: 851-861
- 12 Braun K, Holzl G, Pusch O, Hengstschnlager M. Deregulated expression of CDK2- or CDK3-associated kinase activities enhances c-Myc-induced apoptosis. *DNA Cell Biol* 1998; 17: 789-798
- 13 Yamochi T, Semba K, Tsuji K, Mizumoto K, Sato H, Matsuura Y, Nishimoto I, Matsuoka M. ik3-1/Cables is a substrate for cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3). *Eur J Biochem* 2001; 268: 6076-6082
- 14 Matsuoka M, Matsuura Y, Semba K, Nishimoto I. Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3) in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 442-447
- 15 Sato H, Nishimoto I, Matsuoka M. ik3-2, a relative to ik3-1/cables, is associated with cdk3, cdk5, and c-abl. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1574: 157-163
- 16 Wu JR, Gilbert DM. The replication origin decision point is a mitogen-independent, 2-aminopurine-sensitive, G1-phase event that precedes restriction point control. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4312-4321
- 17 Keezer SM, Gilbert DM. Evidence for a pre-restriction point Cdk3 activity. *J Cell Biochem* 2002; 85: 545-552
- 18 Haas K, Staller P, Geisen C, Bartek J, Eilers M, Moroy T. Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* 1997; 15: 179-192
- 19 Bullrich F, MacLachlan TK, Sang N, Druck T, Veronese ML, Allen SL, Chiorazzi N, Koff A, Heubner K, Croce CM. Chromosomal mapping of members of the cdc2 family of protein kinases, cdk3, cdk6, PISLRE, and PITALRE, and a cdk inhibitor, p27Kip1, to regions involved in human cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1199-1205
- 20 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170

同行评价
本文设计合理, 数据可信, 对基础研究有一定的参考意义。

编辑 何燕 电编 何基才

肝转移性胃肠道间质瘤临床病理分析15例

朱红波, 张秀辉, 廖殿英, 李俸媛

背景资料
GISTs因其为消化道最常见的间叶性肿瘤而成为近年来研究的热点, 其好发部位为胃和小肠, 最常见的转移部位为肝脏。肝脏转移性GISTs仅依赖组织形态特征易与其他梭形细胞肿瘤混淆, 需结合临床病史和免疫组织化学染色确诊, 其预后较原发性GISTs差, 临床应随访和复查。

朱红波, 张秀辉, 廖殿英, 李俸媛, 四川大学华西医院病理科四川省成都市 610041
通讯作者: 张秀辉, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院病理科. zhangxiuhui1955@126.com
电话: 028-85422020
收稿日期: 2007-06-21 修回日期: 2007-11-24

Clinicopathological analysis of hepatic metastatic gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 15 cases

Hong-Bo Zhu, Xiu-Hui Zhang, Dian-Ying Liao, Feng-Yuan Li

Hong-Bo Zhu, Xiu-Hui Zhang, Dian-Ying Liao, Feng-Yuan Li, Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xiu-Hui Zhang, Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhangxiuhui1955@126.com
Received: 2007-06-21 Revised: 2007-11-24

Abstract

AIM: To study the clinicopathological and immunophenotypical features of hepatic metastatic gastrointestinal stromal tumors (GISTs).

METHODS: Clinical and pathological data of 15 patients with hepatic metastatic GISTs were analyzed, and the related literature was reviewed.

RESULTS: The tumors mainly originated from the small bowel (6/15) and stomach (5/15). The length of time after surgical treatment of the primary tumor to detection of a hepatic metastatic tumor was 0 d-86 mo (mean 25 mo \pm 9 mo). Tumor size varied from 1.5 cm to 30.0 cm (mean 7.1 cm \pm 1.2 cm). Cystification, hemorrhage or necrosis was observed in 6 tumors. Histologically, 11 were of the spindle cell type, 2 the epithelioid cell type and 2 mixture type. CD117 and CD34 showed diffuse expression, with a positive rate of 86.7% and 46.7%, respectively. Some cases were focally positive for SMA (33.3%) and S-100

(20%). Desmin was negative in all the 15 tumors.

CONCLUSION: The liver is the most metastatic site of GISTs. The most common primary sites of hepatic metastatic GISTs are the small bowel and stomach. Hepatic metastatic GISTs have similar clinical and pathological features as primary GISTs, and a poor prognosis. The combination of CD117 and CD34 is helpful for differential diagnosis.

Key Words: Hepatic tumor; Gastrointestinal stromal tumors; Clinical and pathological features

Zhu HB, Zhang XH, Liao DY, Li FY. Clinicopathological analysis of hepatic metastatic gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3654-3659

摘要

目的: 探讨肝转移性胃肠道间质瘤(GISTs)的临床病理、免疫组化特点。

方法: 复习文献, 分析15例肝转移性GISTs的临床表现、组织学及免疫组化特征。

结果: 本组15例肝转移性GISTs, 原发灶分别位于小肠(6例)、胃(5例)及网膜(2例), 余2例来源不明。发现肝转移灶与原发肿瘤手术相距时间为0 d-86 mo(平均25 mo \pm 9 mo)。肿瘤大小为1.5-30.0(平均7.1 \pm 1.2) cm。6例伴有出血、坏死或囊性变。组织学分型: 梭形细胞型11例, 上皮样细胞型2例, 混合型2例。免疫组化结果: 肿瘤细胞弥漫表达CD117(86.7%)、CD34(46.7%), 灶性表达SMA(33.3%)、S-100(20%), Desmin均为阴性。

结论: 肝脏是GISTs最常见的转移部位, 原发部位多为小肠和胃。其临床表现、组织形态及免疫组化表型与原发灶基本一致, 预后较差。CD117和CD34联合应用有助于鉴别诊断。

关键词: 肝脏肿瘤; 胃肠道间质瘤; 临床病理特征

朱红波, 张秀辉, 廖殿英, 李俸媛. 肝转移性胃肠道间质瘤临床病理分析15例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3654-3659
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3654.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)这一概念最早是由Mazur和Clark在1983年提出^[1], 后又发现少数原发于腹腔软组织的胃肠道外间质瘤(extra-gastrointestinal stromal tumors, EGISTs)^[2]. 国内多于20世纪九十年代中后期才开始在临床实践中引入GISTs概念. 关于GISTs的临床病理研究集中于胃肠道原发灶, 转移性GISTs的研究仅限于个案报道. 肝脏是GISTs最常见的转移部位. 本文总结了15例肝转移性GISTs, 以探讨其临床病理特征.

1 材料和方法

1.1 材料 收集华西医院病理科1995-01-01/2006-12-31诊断为GISTs病例共185例. 所有病例均参照GISTs目前公认的组织形态学特点并行免疫组化染色确诊, 其中肝转移性GISTs 15例.

1.2 方法 对15例肝转移性GISTs患者的临床病理及随访资料进行回顾性分析. 肿瘤组织标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋切片(4 μ m), HE染色, 并采用EnVision二步法进行免疫组化染色. 抗体选用CD117(c-KIT)、CD34、SMA、Desmin及S-100. CD117、CD34、SMA、Desmin及EnVision试剂盒购自丹麦DAKO公司, S-100购自北京中杉公司. 用已购阳性切片作阳性对照, PBS缓冲液代替一抗作阴性对照. 染色步骤和抗体稀释度均按产品说明书进行. 结果判定: 结构清晰, 着色明显强于背景, 在相应部位(CD117: 细胞膜, CD34: 细胞膜, SMA: 细胞质, S-100: 细胞核/质, Desmin: 细胞质)出现棕黄色颗粒者为阳性细胞; 不着色或显色强度与背景无差别者为阴性细胞. 每例切片随机选择5-10个高倍镜视野($\times 400$), 统计阳性细胞数, 取平均值: 无着色或 $<10\%$ 为阴性(-), $10\%-25\%$ 为弱阳性(+), $26\%-50\%$ 为中等强度阳性(++), $>50\%$ 为强阳性(+++).

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行分析. 数据用mean \pm SD表示, 采用计数资料的 χ^2 检验及Spearman等级相关分析, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 临床资料 185例GISTs中, 良性27例, 其余为交界性或恶性. 经手术切除行病理检查确诊转移的29例, 转移部位分别为: 肝脏15例, 网膜10例, 腹膜后4例, 腹壁皮下3例, 脾脏1例. 15

例肝转移性GISTs中, 男9例, 女6例, 男女比为1.5:1, 年龄35-73(平均 56 ± 3)岁, ≥ 50 岁11例, 占73.3%. 多数病例表现为腹部疼痛或不适, 极少数患者无症状, 于体检、腹部其他手术或复查时偶被发现. 原发部位为小肠6例、胃5例、网膜2例, 另2例未发现明确原发灶. 6例为原发部位肿瘤与肝脏转移瘤同时诊断, 7例为原发部位肿瘤诊断后1 mo-86 mo发现肝脏转移. 原发部位肿瘤初次诊断为GISTs 9例、恶性外周神经鞘瘤(MPNSTs)2例、平滑肌瘤1例、平滑肌肉瘤1例. 本组有随访资料者6例(40%), 随访时间从3 mo-7年, 生存时间为术后0 d-65 mo(平均 25 ± 9 mo), 5年生存率为16.7%(1/6)(表1).

2.2 病理观察

2.2.1 肉眼: 13例为多发, 2例为单发结节状肿物, 均为肝内浸润性生长. 直径1.5-30.0(平均 7.1 ± 1.2) cm, 切面灰白、灰红色, 多为鱼肉状, 质地较软. 6例伴明显出血坏死(5例直径 ≥ 10 cm), 其中3例囊性变(表2).

2.2.2 镜下: 11例以梭形细胞为主, 2例以上皮样细胞为主, 余2例为两种成分混合存在. 多数病例瘤细胞呈长梭形、短梭形和圆形, 胞质弱嗜酸, 常见核端空泡, 有时呈印戒样或透明细胞样(图1A); 排列呈漩涡状、栅栏状、巢状或弥漫性分布, 部分区细胞稀少, 胶原丰富, 可有血管外皮瘤样改变(图1B); 核分裂为6-118/50HPF; 间质血管丰富, 管周易见玻璃样变及黏液样变. 部分病例出血坏死较明显(表2).

2.2.3 免疫组化: 肿瘤细胞弥漫表达CD117(86.7%)(图1C)、CD34(46.7%)(图1D), 灶性表达SMA(33.3%)、S-100(20%), Desmin均为阴性. 2例原发灶与转移灶肿瘤细胞免疫表型不一致(表2).

3 讨论

肝脏是GISTs最常见转移部位. Bauer *et al*^[3]报道90例转移性GISTs中, 肝转移占62例. 国内报道GISTs发生肝转移的数据略高于国外. M. D. Anderson肿瘤中心研究显示, GISTs的肝转移率为17%^[4]. 国内李俊霞 *et al*^[5]报道31例原发GISTs的肝转移率为25.8%, 蔡国响 *et al*^[6]报道99例原发GISTs的肝转移率为29%. 本研究中, GISTs各部位的转移率分别为肝脏8.1%, 网膜5.4%, 腹膜后2.2%, 腹壁皮下1.6%, 脾脏0.5%. 肝脏与网膜转移率明显高于其他部位($P<0.05$). 但本组肝转移率明显低于国内外报道数据, 原因可能为仅

研发前沿
目前GISTs相关研究主要集中在分子生物学水平, 基因靶向治疗将成为未来研究的重点.

创新盘点

以往GISTs研究多集中于胃肠道原发灶。本文通过总结肝脏转移性GISTs的临床病理资料、免疫组化特点及预后,配合国内外文献的学习,归纳出肝脏转移性GISTs的临床病理特征。

表 1 15例肝转移性GISTs的临床资料

编号	性别	年龄(岁)	临床表现	原发部位情况			随访结果
				部位	初次诊断距	肝转移时间(mo)	
1	男	66	腹膜包块术后复查, CT发现肝脏占位	网膜	MPNSTs	31	术后4 mo再发, 再次手术3 mo后死亡
2	男	73	腹膜包块术后复查, CT发现肝脏占位	网膜	GISTs	12	术后失访
3	女	69	右上腹不适15 d	胃	平滑肌瘤	50	术后化疗12 mo后再发, 3 mo后死亡
4	男	62	右上腹不适7 d, CT发现肝脏占位	小肠	MPNSTs	86	术后失访
5	男	67	发现腹部包块1年	小肠	GISTs	0	术后失访
6	男	59	反复黑便2年, 加重1 mo	小肠	GISTs	0	术后6 mo复发, 再次术后2 mo死亡
7	女	39	小肠间质瘤术后复查, CT发现肝脏占位	小肠	GISTs	1	术后失访
8	女	58	发现腹部包块8 mo	不明			术后失访
9	男	67	小肠肿瘤术后复查, CT发现肝脏占位	小肠	GISTs	60	术后失访
10	女	38	体检发现肝脏占位	胃	平滑肌肉瘤	84	术后失访
11	男	35	体检发现肝脏占位	小肠	GISTs	0	术后2 d死亡
12	女	45	右上腹不适1 mo	胃	GISTs	0	术后失访
13	男	55	右上腹不适10 d	胃	GISTs	0	术后65 mo健在
14	男	55	右上腹不适6 mo, 加重1 mo	胃	GISTs	0	术后失访
15	女	53	上腹不适1年, 发现腹部包块1 mo	不明			术中死亡

影像学提示转移而未行病理检查的病例未被纳入, GISTs病例失访率较高, 临床诊断和治疗水平提高。肝原发GISTs国内外未见报道, 故一般认为肝脏的GISTs均为转移性。

肝转移性GISTs见于各年龄段。本组年龄35-73(平均 56 ± 3)岁, ≥ 50 岁者11例, 占73.3%, 差异显著($P < 0.05$)。男女比为1.5 : 1。临床常见症状为腹部疼痛或不适, 仅极少数患者无症状, 偶于体检、腹部其他手术或复查时被发现。

其肿瘤大体表现以多发结节为主(86.7%), 大小不等, 最大直径可达30 cm。6例伴出血、坏死或囊性变的病例中, 5例直径 ≥ 10 cm($P < 0.05$)。镜下依据梭形细胞和上皮样细胞的比例可将GISTs分为梭形细胞型(上皮样细胞 $< 10\%$)、上皮样细胞型(上皮样细胞 $> 50\%$)和混合型(上皮样细胞10%-50%)。原发GISTs中多为梭形细胞型(70%), 常见于结肠、直肠, 上皮样细胞型(20%)主要见于胃, 混合型(10%)多见于胃和小肠。本组15例中各型分别占73.3%、13.3%和13.3%, 与原发性GISTs无明显差异($P > 0.05$), 提示GISTs组

织形态与转移无明显相关。

临床病理诊断中常需要借助免疫组化鉴别GISTs与其他梭形细胞肿瘤, 常用标记有CD117、CD34、SMA、S-100、Desmin。其中CD117、CD34对诊断GISTs有特异性。本组CD117的表达率为86.7%, 与原发性GISTs一致(84.2%-98.9%)($P > 0.05$); CD34为46.7%, 明显低于原发性GISTs(70.8%-95.4%)($P < 0.05$)^[7-10]。有文献[11]提出CD34与Desmin阴性的GISTs侵袭、转移能力更强。本组研究结果较支持这一观点。我们观察到部分肝转移性GISTs也可灶性表达SMA和S-100, 说明其与原发性GISTs相似, 可有肌样或神经样分化。但本组中2例转移灶肿瘤细胞与原发灶的免疫表型不一致, 提示GISTs在转移的过程中可能发生免疫表型的变化。

CD117是GISTs诊断中的重要标记, 但GISTs也存在CD117阴性^[12]。本组2例CD117阴性, 此时可通过外显子的检测来确定^[13-14]。但目前该检测在临床的应用尚未成为常规病理检测手段, 所以仍有大约5%左右的GISTs有待于进一步确

表 2 15例肝转移性GISTs的病理资料

编号	肉眼		镜下		免疫组化				
	数目	大小(cm)	类型	核分裂数/50HPF	CD117	CD34	SMA	S-100	Desmin
1	多发	最大5×4×3	梭形细胞型	58	+++	+++	+	+ ¹	-
2	多发	直径0.5-1	梭形细胞型	17	+	++	-	-	-
3	多发	最大4.5×3.8×3.8	混合型	22	+++	+++	-	-	-
4	多发	最大10×8.5×6 出血坏死	上皮细胞型	22	++	-	-	-	-
5	多发	最大14×11×10 出血坏死囊性变	梭形细胞型	8	+++	-	-	-	-
6	多发	最大7×5.5×5.5	梭形细胞型	32	+++	-	+ ¹	-	-
7	多发	最大10×8×5	上皮细胞型	12	+++	+++	-	-	-
8	多发	最大15×10×9 出血坏死囊性变	梭形细胞型	16	+++	-	+ ¹	-	-
9	多发	最大7×5×4	梭形细胞型	47	++	+++	-	-	-
10	多发	最大14×10×4 出血坏死	梭形细胞型	9	- ²	+++ ¹	-	- ²	-
11	多发	最大5×4×3 出血坏死	梭形细胞型	118	+++	-	+ ¹	-	-
12	多发	最大6×5.6×4	梭形细胞型	20	-	++	-	- ²	-
13	单发	1.5×1.5×1	混合型	6	++	-	+ ¹	-	-
14	单发	2×1.6×1.6	梭形细胞型	54	+++	-	-	++	-
15	多发	最大30×17×10 出血坏死囊性变	梭形细胞型	34	+++	-	-	+ ¹	-

¹灶性表达; ²肝转移灶与原发部位免疫组织化学结果不一致.

诊. 另一方面, 有文献报告精原细胞瘤、肥大细胞瘤、恶性黑色素瘤均表达CD117^[15]. 某些透明细胞肉瘤、Ewing肉瘤、原始神经外胚层肿瘤、Kaposi肉瘤、血管肉瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、肌纤维母细胞瘤、孤立性纤维瘤、纤维瘤病、分化良好脂肪肉瘤和转移性小细胞癌都可不同程度表达CD117, 这增加了GISTs诊断的难度.

肝转移性GISTs与肝脏其他肿瘤的鉴别同样要依靠免疫组化: (1)平滑肌瘤和平滑肌肉瘤: 是最常与GISTs相混淆的肿瘤, 主要由梭形细胞呈束状排列而成, 特征为核似“雪茄烟样”. SMA和Desmin弥漫强阳性, CD117阴性. (2)MPNST: 当GISTs出现神经分化时, S-100可为阳性, 易误诊为MPNSTs, 但MPNSTs CD117阴性. 本组中2例初诊为MPNSTs, 行CD117检测后修正为GISTs. (3)肉瘤样肝细胞癌: 是肝脏梭形细胞肿瘤中最常见的类型, 多处取材可见小梁状肝细胞和肉瘤样成分的移行, 且CK阳性. (4)血管肉瘤: 部分肝脏血管肉瘤可表现为梭形细胞形态, 且CD117和CD34可不同程度表达. 但仔

细查找, 可见特征性的胞质内血管腔形成, 腔内偶见红细胞. (5)恶性黑色素瘤: CD117、SMA也可呈阳性, 其特征性标记为HMB45阳性. 此外, 还应鉴别一些肝脏少见的肿瘤如孤立性纤维性肿瘤、炎症性肌纤维母细胞瘤、Kaposi肉瘤、恶性纤维组细胞瘤等.

Masuoka *et al*^[16]研究显示, GISTs多在原发部位诊断后出现肝转移, 肝转移距原发肿瘤手术的中位时间为12 mo. 国内研究^[17]提出, 在原发性GISTs术后1年内应密切注意肝脏的变化. 但本研究结果与之有较大差异. 原发肿瘤与肝转移同时发现者6例, 非同时发现者7例, 且后者肝转移距原发肿瘤手术的时间多在1年以上(6/7), 最长者达86 mo. 这可能与病例的选择和临床检查治疗手段有关. 文献曾报道1例胃GISTs和1例直肠GISTs分别于术后11年和12年发生肝转移^[16,18]. 因此, 临床应对GISTs术后患者进行长期观察和随访.

肝转移性GISTs的5年生存率较原发GISTs低, 为10%-20%^[19]. 本组仅6例患者有随访资料, 随访率为40%, 随访时间3 mo-7年不等, 生存时

应用要点
本文总结了肝脏转移性GISTs的临床病理资料, 有助于临床医生提高对该病的认识, 加强随访和复查, 避免漏诊误诊.

同行评价
本文设计合理, 思路清晰, 有一定的临床意义.

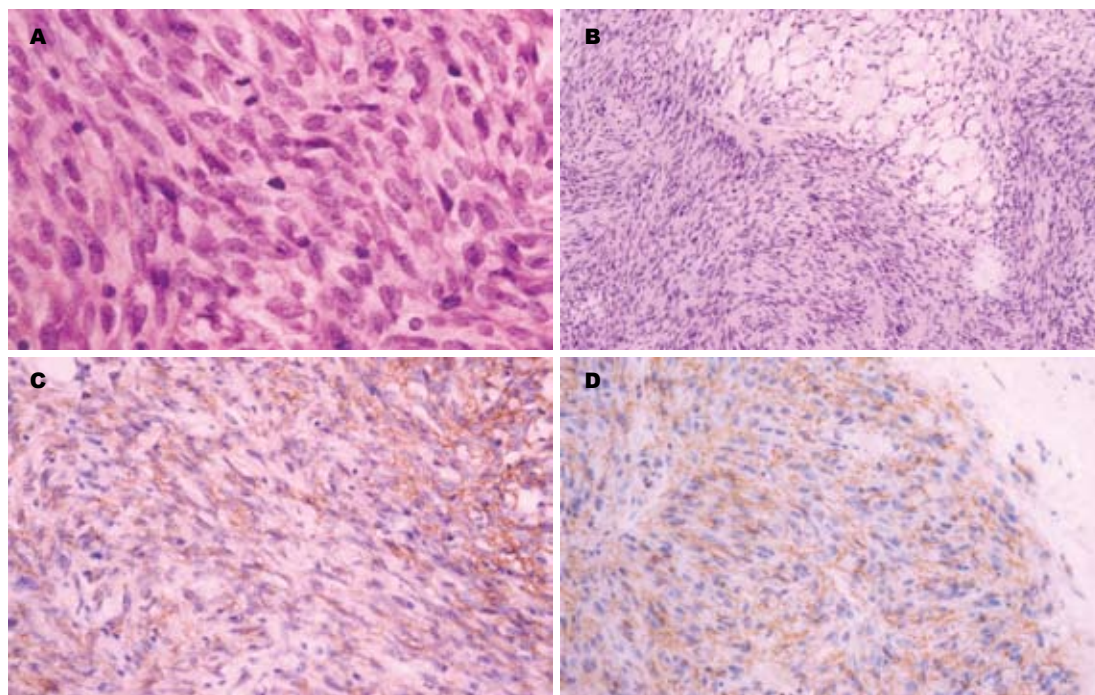


图1 肝转移性GISTs的组织学特点和免疫组化结果. A: 肿瘤细胞呈梭形, 胞质嗜酸性, 可见核分裂及核端空泡(HE × 200); B: 肿瘤细胞交叉束状排列(HE × 40); C: CD117阳性限于胞膜, 棕褐色, 弥漫分布(EnVision二步法 × 100); D: CD34阳性限于胞膜, 棕褐色, 弥漫分布(EnVision二步法 × 100).

间为术后0 d-65 mo, 1例超过5年(16.7%). 多数文献认为, 小肠GISTs的恶性程度最高, 发生肝转移的概率最高, 预后最差^[20]. 目前手术治疗的进展使这一状况得到一定改善. DeMatteo *et al*^[21]对34例行肝转移灶完全切除的GISTs患者进行生存分析, 5年生存率可达30%, 中位生存时间为39 mo. 临床正确认识肝转移性GISTs, 加强GISTs患者随访和复查, 早期诊断, 及时治疗, 有利于提高患者的生存质量, 延长生存期.

4 参考文献

- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519
- Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1109-1118
- Bauer S, Hartmann JT, de Wit M, Lang H, Grabellus F, Antoch G, Niebel W, Erhard J, Ebeling P, Zeth M, Taeger G, Seeber S, Flasshove M, Schütte J. Resection of residual disease in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors responding to treatment with imatinib. *Int J Cancer* 2005; 117: 316-325
- Patel SR, Benjamin RS. Management of peritoneal and hepatic metastases from gastrointestinal stromal tumors. *Surg Oncol* 2000; 9: 67-70
- 李俊霞, 柳平, 王化虹, 余靖, 谢鹏雁, 刘新光. 胃间质瘤31例临床分析. *中华内科杂志* 2002; 41: 742-745
- 蔡国响, 蔡三军, 师英强, 杜春燕, 侯英勇, 徐烨, 廉朋, 管祖庆, 施达仁. 26例胃肠道间质瘤肝转移的临床特征和生存分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 521-525
- 贺慧颖, 方伟岗, 钟锦镐, 李燕, 郑杰, 杜娟, 衡万杰, 吴秉铨. 165例胃肠道间质瘤中c-kit和PDGFRA基因突变的检测和临床诊断意义. *中华病理学杂志* 2006; 35: 262-266
- 赵再秋, 章美珍, 赵贺秋, 金利刚. 胃肠道间质瘤71例临床病理及免疫组化分析. *肿瘤研究与临床* 2006; 18: 326-328
- 穆林菁, 楼善贤, 朱寿田, 刘庆伟. 胃肠道间质瘤87例临床病理分析. *肿瘤研究与临床* 2006; 18: 106-107
- 李潮, 宋丁. 67例胃肠道间质瘤临床病理及免疫组化研究. *中国实验诊断学* 2006; 10: 250-252
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
- Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 889-894
- Willmore-Payne C, Layfield LJ, Holden JA. c-KIT mutation analysis for diagnosis of gastrointestinal stromal tumors in fine needle aspiration specimens. *Cancer* 2005; 105: 165-170
- 顾国利, 王石林, 任力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉. 胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2241-2246
- Hornick JL, Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 188-193
- Masuoka H, Kawagishi N, Inoue T, Ohkohchi N,

- Fujimori K, Koyamada N, Sekiguchi S, Tsukamoto S, Satomi S. Giant hepatic metastasis from gastrointestinal stromal tumor of the rectum 12 years after surgery. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1454-1456
- 17 侯英勇, 朱雄增. 胃肠道间质瘤临床病理研究进展. *实用肿瘤杂志* 2003; 18: 257-259
- 18 Ballarini C, Intra M, Ceretti AP, Prestipino F, Bianchi FM, Sparacio F, Berti E, Perrone S, Silva F. Gastrointestinal stromal tumors: a "benign" tumor with hepatic metastasis after 11 years. *Tumori* 1998; 84: 78-81
- 19 Lang H, Nussbaum KT, Kaudel P, Frühauf N, Flemming P, Raab R. Hepatic metastases from leiomyosarcoma: A single-center experience with 34 liver resections during a 15-year period. *Ann Surg* 2000; 231: 500-505
- 20 Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 82-87
- 21 DeMatteo RP, Shah A, Fong Y, Jarnagin WR, Blumgart LH, Brennan MF. Results of hepatic resection for sarcoma metastatic to liver. *Ann Surg* 2001; 234: 540-547; discussion 547-548

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

• 编读往来 •

尊敬的社长先生:

我是滨州医学院的傅廷亮, 是贵社诸多刊物的忠实读者和作者. 非常高兴在新的一年里收到您寄来的精美贺卡, 在此表示衷心的感谢.

*World Journal of Gastroenterology*可以说是杰出青年学者潜心创业的一面旗帜, 您带领的优秀团队已经取得了令人瞩目的成绩, 尤其是WJG再次被SCI收录就是很好的证明. 祝愿杂志社取得更大成绩. 我们现从事临床营养、中药和梗阻性黄疸肠屏障方面的研究, 也包含中西医结合的部分内容, 是山东省科研项目, 等文稿整理后会寄到贵刊, 请提出建议和意见. 谢谢!

衷心祝福您和您的家人健康幸福, 万事如意!

傅廷亮 博士, 教授
滨州医学院附属医院
2007-12-11

胶囊内镜诊断消化道疾病102例

钟慧闽, 王群英, 曲晓静, 姚萍, 董文珠, 宋健

背景资料
胶囊内镜可以动态、清楚显示消化道各部位, 特别是克服了全小肠内镜检查的盲区, 将为消化道疾病的认识做出很大的贡献。

钟慧闽, 王群英, 曲晓静, 姚萍, 董文珠, 宋健, 解放军第401医院消化内科 山东省青岛市 266071
通讯作者: 宋健, 266071, 山东省青岛市闽江路22号, 解放军第401医院消化内科. healthsong@gmail.com
电话: 0532-83970049 传真: 0532-85805233
收稿日期: 2007-08-14 修回日期: 2007-11-15

Value of the Pillcam capsule endoscope in the diagnosis of digestive tract disease: an analysis of 102 cases

Hui-Min Zhong, Qun-Ying Wang, Xiao-Jing Qu, Ping Yao, Wen-Zhu Dong, Jian Song

Hui-Min Zhong, Qun-Ying Wang, Xiao-Jing Qu, Ping Yao, Wen-Zhu Dong, Jian Song, Department of Gastroenterology, 401 Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Jian Song, Department of Gastroenterology, 401 Hospital of Chinese PLA, 22 Minjiang Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. healthsong@gmail.com

Received: 2007-08-14 Revised: 2007-11-15

Abstract

AIM: To evaluate the detection rate and safety of the Pillcam capsule endoscope in the diagnosis of digestive tract disease.

METHODS: Patients suffering from unexplained gastrointestinal bleeding, abdominal pain and chronic diarrhea were enrolled in this study and underwent capsule endoscopy. Our results were compared with those achieved with conventional diagnostic procedures (including gastroscopy, colonoscopy, and digestive tract barium meal) to assess the detection rate and safety of the capsule endoscope in the diagnosis of digestive tract disease.

RESULTS: Examinations were completed in one hundred and two cases, with no complications. The capsule remained in the esophagus, stomach and small intestine for an average of 2.46 min, 37.8 min and 275.82 min, respectively. The quality of photos was excellent. The diseases detected included esophageal varices, gastritis xanthoma, duodenal ulcer,

intestinal erosion, Crohn's disease, angiodysplasia and polyps.

CONCLUSION: Capsule endoscopy is pain-free and has the advantages of excellent visualization, high safety and detection rate, precise localization, and better diagnostic value for intestinal disease and upper gastrointestinal disease than other conventional procedures.

Key Words: Capsule endoscope; Digestive tract disease; Diagnosis

Zhong HM, Wang QY, Qu XJ, Yao P, Dong WZ, Song J. Value of the Pillcam capsule endoscope in the diagnosis of digestive tract disease: an analysis of 102 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3660-3663

摘要

目的: 探讨胶囊内镜在消化道疾病中的诊断价值和安全性。

方法: 对不明原因的消化道出血、腹痛和慢性腹泻患者进行Pillcam胶囊内镜检查, 部分患者行传统检查(胃镜、结肠镜和全消化道钡餐), 进行对比分析。

结果: 102例受检者在胶囊内镜检查过程中无任何不适和并发症, 均顺利完成检查。胶囊1-4 d自然排出, 食道排空平均时间2.46 min, 胃排空平均时间37.8 min, 小肠转运时间平均275.82 min, 其中3例胶囊未达结肠。所得图像清晰, 检出食道静脉曲张、慢性胃炎、十二指肠溃疡、小肠炎症、克罗恩病、血管畸形、息肉和间质瘤等。

结论: 胶囊内镜检查无痛苦, 成功率高, 对病变检出率高, 定位较准确。与其他方法相比, 对小肠疾病和上消化道病变有较好的诊断价值。

关键词: 胶囊内镜; 消化道疾病; 诊断

钟慧闽, 王群英, 曲晓静, 姚萍, 董文珠, 宋健. 胶囊内镜诊断消化道疾病102例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3660-3663
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3660.asp>

0 引言

不明原因的消化道出血、腹痛和腹泻等是消化道疾病中常见的疑难问题, 通过传统方法(胃镜、结肠镜和全消化道钡餐检等)不能确诊. 这些患者大多是小肠疾病. 长期以来小肠一直是消化道检查的盲区, 小肠疾病很难早期确定, 胶囊内镜的面市正解决了这一难题. 自胶囊内镜2002-09进入我国, 愈加显示了他的优越性^[1]. 我院于2005-05引进以色列Given Imaging Ipllcam第二代胶囊内镜. 现对102例患者的检查资料, 进行总结分析, 进一步探讨其临床诊断意义.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2005-05/2007-05以来接受检查者102例, 男75例, 女27例, 年龄32-87(平均年龄49.53)岁. 其中不明原因消化道出血19例, 反复腹泻史31例, 慢性腹痛和消化不良史等52例. 经过胃镜检查10例, 经过结肠镜检查5例, 经过全消化道钡餐检查等7例, 无检查禁忌病例. 胶囊内镜, 含pillcam胶囊、数据记录仪套件和RAPID工作站. 该胶囊视角为125度, 每秒摄像2帧, 放大8倍, 工作时间450-508 min. 胶囊的微阵传感器能接受来自胶囊的信号, 并转换为二维定位图像.

1.2 方法 受检者检查前1天16时, 口服甘露醇250 mL, 清洁肠道, 晚餐简食. 检查当天空腹, 8时行胶囊内镜检查. 阵列传感器与数据记录仪连接, 固定于受检者身上. 检测胶囊工作状态良好后, 吞服胶囊, 胶囊工作期间不能接近强磁场检查, 结束将数据下载入电脑, 由2名内镜专业医师分析.

102例中78例采用吞服胶囊后左侧卧位和平卧位各10 min再自由活动的检查方法, 另25例站立吞服胶囊后自由活动.

2 结果

2.1 检查质量及安全性 102例受检者完成胶囊内镜检查, 无任何不适和并发症, 胶囊分别于第1-4天排出. 99例胶囊在工作时顺利通过回盲瓣进入结肠, 1例胶囊一直滞留于胃内. 后重做. 2例滞留于胃内约1 h, 手法按摩或胃镜推入胃内, 后来分析其中2例患者使用了生长抑素等, 可能对胃排空有影响. 还有5例胶囊达回盲瓣前, 未通过回盲瓣. 胶囊达结肠平均工作时间为4.64 h, 最短工作时间为2.08 h, 最长工作时间为8.48 h. 胃、十二指肠、空、回肠清洁度好71例, 清洁

度一般13例. 所得上消化道和小肠图像清晰, 能够反映黏膜像. 结肠部位因肠腔较宽, 多数患者其内有黄色粪水存留, 掩盖黏膜, 成像效果欠佳, 且因结肠蠕动慢, 不能完全显示全结肠肠腔黏膜像.

2.2 胶囊通过消化道各段时间 食道排空时间为2.46(0.5-21.38) min, 胃排空(包括1例胃内滞留8.5 h)时间为47.4(11.73-510) min. 排除1例胃内滞留8.5 h胃排空时间为37.8(11.73-221) min, 小肠转运时间为275.82(124.8-508.8) min. 其中3例未达结肠.

2.3 病变检出情况 102例受检者中, 94例有不同病变, 占92.2%. 检出的病变为1种病变者8例, 2种病变者32例, 3种病变者33例, 3种以上的29例. 检出病变约17种(表1).

2.4 与传统检查方法比较 部分受检者接受胃镜或/和结肠镜或/和全消化道钡餐. 与10例胃镜相比, 胶囊内镜对胃部弥漫性炎症病变检出率为100%. 其中4例球部溃疡, 胃镜检出3例. 与7例全消化道钡餐检查结果比较, 胶囊内镜发现非特异性小肠炎症5例, 炎症性肠病2例, 血管病变4例, 小肠间质瘤1例和小肠息肉2例, 上述病变在消化道钡餐中均未发现, 表明胶囊内镜对小肠炎症、血管病变、间质瘤和息肉等病变的检出率较钡餐高. 受检者中胶囊内镜多数到达升结肠, 并有1例到达横结肠. 因其对结肠的检查范围有限, 胶囊内镜对结肠病变的诊断价值不如结肠镜.

3 讨论

近半个世纪以来, 消化内镜的发展, 使消化道疾病的诊治产生了巨大飞跃. 但是由于小肠特殊的曲度和长度, 小肠镜插入困难, 而其他检查难以达到内镜的观察效果, 所以, 小肠疾病的诊断一直是临床的难点, 极大地困惑着广大医生和患者. 胶囊内镜是一种最先进的无创的数码技术在消化道内镜中的应用典范. 国内外资料证实, 其图像可以清晰地显示以往难以见到的全部小肠黏膜, 对小肠疾病的诊治有极大的价值, 且安全无痛苦, 实属消化内镜发展史上的又一个里程碑. 但是胶囊内镜的应用仅5年多的时间, 其应用进展尚需要不断探索提高.

朱森林 *et al*^[2]报道胶囊内镜对病变的检出率是86.8%. 我们病变检出率达92.2%, 可能与检查者多有病史有关. 本文共检出19种病变, 患2种以上病变者94例, 发病的频率依次为胃

研发前沿
目前研究初步阶段, 许多问题如相关疾病检出率、诊断标准、诊断技术等有待进一步探索.

应用要点
较全面报道部分疾病胶囊内镜诊断状况。如克罗恩病、上消化道病等, 疾病检出率高, 采用吞服胶囊的新体位等, 对胶囊内镜的发展应用起着积极的作用。

表 1 胶囊内镜检查的病变检出数

上消化道疾病	<i>n</i>	小肠疾病	<i>n</i>
食道胃底静脉曲张	2	肠血管病变例	31(30.3%)
胃炎	41(40.2%)	非特异性小肠炎	31(30.3%)
胃单发息肉	1	克罗恩病	6
胃黄色瘤	4	肠单发息肉	7
胃溃疡	2	多发息肉	3
十二指肠炎	13	小肠间质瘤	2
十二指肠溃疡	4	回肠淋巴增生	8
十二指肠肿瘤	1	吸收不良综合症	2
		结肠黑病变	5
		小肠憩室	2
		结肠炎	5
		结肠癌	2
合计	68		73

炎40.2%, 非特异性小肠炎30.3%, 肠血管病变30.3%, 十二指肠炎, 炎症性肠病, 肠息肉, 十二指肠溃疡和肿瘤等。王晓艳 *et al*^[3], 张冰凌 *et al*^[4]报道小肠疾病的检出率是62%-81.8%。我们检出小肠病变81例, 占79.4%, 主要检出非特异性小肠炎、炎症性肠病、血管病变和肠息肉等。胶囊内镜的镜头摄影焦距适合小肠肠腔的宽度, 所以小肠的图像清晰。正如Hara *et al*^[10]报道, 胶囊内镜与钡透、血管造影比较, 小肠病变的发现率明显增高。

胶囊内镜对不明原因消化道出血的检查具有重要价值^[9]。李运红 *et al*^[5]报道传统方法诊断率27.3%, 胶囊内镜诊断率可达67.7%。我们观察不明原因消化道出血19例, 检出病变率100%, 诊断率63%(指病变可明确解释出血原因)。其中小肠多发炎症并渗血5例, 散在胃和小肠多处糜烂渗血3例, 重度胃糜烂并渗血2例, 空肠肿物并活动性渗血1例, 活动期十二指肠球后溃疡1例, 克罗恩病2例。胃镜检查未发现十二指肠球后溃疡和胃糜烂。这几例患者还合并其他疾病, 回肠息肉1例, 淋巴增生和血管畸形等1例。小肠疾病如炎症、血管畸形、癌、淋巴瘤、息肉、类癌、克罗恩病和憩室等, 常是造成原因不明的消化道出血的主要根源。常规小肠钡剂造影对小肠出血的诊断率仅为5%-25%, 但对黏膜和血管性平坦型病变几乎没有诊断意义。锝99标记的红细胞可在1-2 h内显示放射性核素痕迹, 肠道出血时可呈现阳性结果。靶向标记红细胞扫描, 对伴有活动性出血的小肠病变有一定诊断价值, 阳性率达50%, 小肠镜阳性率50%, 说明胶囊内镜检查有较

高的确诊率, 并可以鉴别有多种疾病时实际出血的原因。目前认为胶囊内镜是检查不明原因消化道出血的首选方法, 将使大部分不明原因消化道出血的病因得到明确诊断^[6]。

克罗恩病是一种侵犯小肠结肠的肉芽肿病变, 近年来发病率呈上升趋势, 目前尚缺乏有效手段对其作出较为满意的诊断。小肠X线检查对黏膜炎症病变及扁平病灶一般不易显示, 腹部CT无法显示肠腔黏膜的炎症改变, 仅能发现黏膜的全层增厚和一些腔外并发症。近年双气囊小肠镜改进很大, 但毕竟是一种侵入性的检查手段, 操作过程约需6-8 h, 伴有极度不适和疼痛感, 常需要在镇静镇痛条件下完成, 很难到达全部小肠, 术中小肠镜需在剖腹探查和全身麻醉下进行, 而受到更大限制, 所以克罗恩病早期诊断困难。本文资料中10例不明原因的慢性腹泻、腹痛患者, 部分经全消化道钡透未见异常。胶囊内镜检查诊断克罗恩病6例, 其中轻型3例。表现为小肠充血水肿, 黏膜皱襞样息肉样增生, 散在糜烂、口疮样溃疡, 不规则溃疡, 肉芽肿性结节样病变, 部分黏膜片状萎缩, 胶囊内镜容易发现, 患者可以得到早期诊治。资料提示克罗恩病在胶囊内镜下的特征有黏膜增厚水肿、糜烂、溃疡、肉芽增生至肠腔狭窄等各种改变, 病灶均呈节段性和不对称性分布^[7-8]。结合临床表现为大便隐血阳性、缺铁性贫血、发热和腹痛等可以诊断克罗恩病。虽然胶囊内镜无法对病灶进行活检(活检的确诊意义仅在33%左右), 但结合对上述典型病灶进行的相关鉴别诊断、辅助检查和治疗试验, 可有效诊断。胶囊内镜在

对传统方法未能检出的克罗恩病有较高的检出率, 尤其对早期和轻型患者的诊断具有很大优越性, 从而可以临床早诊断早治疗, 对克罗恩病预后改善有很重要的意义。

息肉是小肠常见疾病。我们发现7例小肠单发息肉, 均为0.2-0.3 cm, 值得随访。另有3例多发息肉, 空肠起始部和回肠末段分布密集。胶囊内镜定位准确, 可指导手术部位。另外胶囊内镜对早期小肠肿瘤的检出具有重要的意义。临床小肠肿瘤的发现往往已属晚期, 失去根治机会。胶囊内镜可以发现癌前期病变(如息肉和早期小肠肿瘤), 从而对患者随访或及时治疗。

胶囊内镜对血管畸形有独特的诊断价值, 检出率较高。血管畸形可随年龄多发, 常由于肠黏膜下静脉间断的梗阻和缺氧造成。血管畸形有静脉扩张、动脉扩张、毛细血管扩张、血管发育不良、动静脉畸形和血管瘤等, 胶囊内镜可以清楚地发现及分类, 小肠X线检查等无法比拟。本研究胶囊内镜发现静脉扩张、动脉扩张、毛细血管扩张和血管瘤。

胶囊对上消化道(食道、十二指肠)疾病诊断也有一定的诊断价值。胃镜诊断虽然是金标准, 但胶囊内镜检查时在采用一定体位增加其在胃内的停留时间后, 可以清楚地显示胃黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡、胆汁反流、胃动力甚至贲门、幽门的收缩等, 作出较准确的诊断。如果胃腔较大, 胶囊内镜运行较快, 可能漏检部分病变, 应特别注意。胶囊通过食道、十二指肠球的时间较短, 通常仅有几帧图像, 所以对该处病变检出率较低, 但也发现了食道静脉曲张、十二指肠炎和溃疡等。胶囊内镜在上消化道疾病的诊断中有一定的价值, 可避免部分胃镜检查的风险和痛苦。特别对于有严重心、肺疾病胃镜检查有禁忌证的患者, 无疑是一种可取的检查筛选方法。胶囊内镜检查还可以观察到胃肠动力, 贲门、幽门、回盲瓣的开关, 对消化道

的运动观察有一定参考意义。

总之, 胶囊内镜对小肠疾病诊断具有目前一些传统检查无法比拟的优势, 对胃部病变也有一定的诊断价值。其应用范围广, 依从性好, 轻松吞服一粒胶囊, 即可早期诊断一些疾病。其仅仅应用3年, 已发现多种其他检查不能发现的小肠疾病, 确实能解决临床问题。他为小肠疾病诊断提供了有实用价值的检查方法, 将为小肠疾病基础研究、临床研究作出贡献, 并且将促进内镜诊断学的发展。随着胶囊内镜的进一步开发、应用与探讨, 消化道特别是小肠疾病的诊治将会出现一个较大的进展。

4 参考文献

- 1 徐肇敏. 使胶囊内镜更好地为临床服务. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 221-222
- 2 朱森林, 陈旻湖, 胡品津. 胶囊内镜的检查对小肠疾病的诊断价值. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 240-243
- 3 王晓艳, 王芬, 肖定华, 唐五良, 沈守荣. 无线胶囊内镜在消化道疾病诊断中的应用分析. 中国内镜杂志 2004; 10: 11-14
- 4 张冰凌, 陈春晓, 厉有名, 蒋伟莉. 胶囊内镜对小肠疾病的诊断价值. 浙江预防医学 2004; 116: 8-10
- 5 李运红, 徐肇敏, 陈隆典, 韩树堂, 张志宏. 胶囊内镜对不明原因消化道出血的诊断价值. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 100-102
- 6 Scapa E, Jacob H, Lewkowicz S, Migdal M, Gat D, Gluckhovski A, Gutmann N, Fireman Z. Initial experience of wireless-capsule endoscopy for evaluating occult gastrointestinal bleeding and suspected small bowel pathology. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2776-2779
- 7 戈之铮, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜诊断小肠克罗恩病的应用研究. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 96-99
- 8 Fireman Z, Mahajna E, Broide E, Shapiro M, Fich L, Sternberg A, Kopelman Y, Scapa E. Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy. *Gut* 2003; 52: 390-392
- 9 Pennazio M, Santucci R, Rondonotti E, Abbiati C, Beccari G, Rossini FP, De Franchis R. Outcome of patients with obscure gastrointestinal bleeding after capsule endoscopy: report of 100 consecutive cases. *Gastroenterology* 2004; 126: 643-653
- 10 Hara AK, Leighton JA, Sharma VK, Fleischer DE. Small bowel: preliminary comparison of capsule endoscopy with barium study and CT. *Radiology* 2004; 230: 260-265

同行评价
本文内容较系统完整, 具有一定的科学性和较好的参考价值。

编辑 李军亮 电编 李军亮

中国江苏地区健康人群CFTR基因M470V多态性分析132例

黄沁, 丁炜, 魏睦新

背景资料
囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)是广泛分布于上皮细胞顶膜的氯离子通道。CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(CF)。CF在白种人中是最常见的常染色体隐性遗传性疾病。M470V是外显子10上470位点碱基氨基酸发生替换属于错义突变,引起CFTR蛋白氯离子通道活性改变导致疾病。本文分析了江苏地区132名健康人CFTR基因M470V多态性。

黄沁, 丁炜, 魏睦新, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029
江苏省中医药领军人才基金资助项目, No. 2006-01
通讯作者: 魏睦新, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院中医科. weimuxin@njmu.edu.cn
电话: 025-83718836-6267
收稿日期: 2007-07-19 修回日期: 2007-10-20

Polymorphisms of M470V genotypes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in 132 healthy people in Jiangsu Province of China

Qin Huang, Wei Ding, Mu-Xin Wei

Qin Huang, Wei Ding, Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Key Talents of Traditional Chinese Medicine Foundation from the Government of Jiangsu Province, No. 2006-01

Correspondence to: Dr. Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. weimuxin@njmu.edu.cn
Received: 2007-07-19 Revised: 2007-10-20

Abstract

AIM: To investigate the polymorphic backgrounds of the cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator gene (CFTR) in Chinese people and the correlation between these polymorphisms and those in Caucasians and other Asian populations.

METHODS: Polymerase chain reaction was used to amplify Exon 10 of the CFTR gene. *Hph* was used to detect the M470V polymorphism.

RESULTS: The M/V polymorphism at position 470 was similar to that in Caucasians and other Asian populations. The V allele was slightly more frequent than the M allele (50.00% vs 43.94%). The frequency of genotypes MV, VV and MM was 45.5%, 33.3% and 21.21%, respectively.

CONCLUSION: The data on the M470V poly-

morphism in exon 10, provide genotype information for the CFTR gene.

Key Words: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene; Polymorphism; M470V genotypes

Huang Q, Ding W, Wei MX. Polymorphisms of M470V genotypes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in 132 healthy people in Jiangsu Province of China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3664-3667

摘要

目的: 研究中国人CFTR基因外显子10 M470V等位基因背景并与亚洲其他各国及高加索人种对比。

方法: 应用PCR技术对无亲缘关系的132位中国江苏地区健康人外周血样品进行CFTR外显子10片段扩增及*Hph* 限制性内切酶酶切方法分析M470V基因型及等位基因型。

结果: 中国江苏地区健康人CFTR基因外显子10 M470V等位基因与亚洲其他国家及高加索人相似, V470等位基因频率(56.06%)高于M470等位基因频率(43.94%), MV基因型频率最高为45.45%, 其次为VV基因型33.33%, MM基因型21.21%。

结论: 通过此次筛查, 首次获得了中国江苏地区CFTR Exon 10 M470V等位基因分型数据, 为中国CFTR基因及其相关疾病的研究提供了重要的遗传学资料。

关键词: CFTR基因; 多态性; M470V基因型

黄沁, 丁炜, 魏睦新. 中国江苏地区健康人群CFTR基因M470V多态性分析132例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(34): 3664-3667
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3664.asp>

0 引言

囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是位于上皮细胞顶膜的氯离子通道。CFTR广泛

分布于人体组织,如胆管上皮、呼吸道、消化道、生殖道及尿道等组织,对于跨上皮细胞的盐类运输、液体流动及离子浓度调节等具有重要的作用^[1]. CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(cystic fibrosis, CF). CF在白种人中最常见的致死性常染色体隐性遗传性疾病,而在亚洲人中却较少发生. M470V多态性是CFTR基因在外显子10上470位点A→G多态导致的氨基酸替换,其突变等位基因M/V多态性能够影响CFTR蛋白氯离子通道功能^[2-5]. CFTR基因是重要的氯离子通道, M470V多态性与CFTR蛋白氯离子通道功能相关. 在国外, CFTR基因突变及多态性一直是研究热点. 而我国却较少对其研究,可能与CFTR基因的突变在亚洲人中少见有关, M470V多态性在我国人群中的分布未见报道. 为了解中国人群中CFTR基因背景,我们首次分析了江苏地区132名健康人CFTR基因M470V多态性,为中国CFTR基因及其相关疾病的研究提供重要的遗传学资料.

1 材料和方法

1.1 材料 根据知情同意原则,男女不限,在江苏地区采集132例外周血样品. 每份样品均为健康个体外周血液标本, EDTA抗凝, -80℃保存.

1.2 方法

1.2.1 模板DNA制备和PCR扩增反应体系: 应用QIAamp Blood DNA Mini Kit(德国Qiagen公司)提取外周血基因组DNA, 操作步骤按说明书进行. 根据参考文献^[2]设计CFTR Exon 10上游引物: 5'-TTGTGCATAGCAGAGTACCTGAAA-3', 下游引物: 5'-GCTTCTTAAAGCATAGGTCATGTG-3', 扩增产物506 bp. 引物由上海英俊生物公司合成、纯化及鉴定. PCR反应液总体积为50 μL, 基因组DNA 100 ng, 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol)4 μL, 50 μmol/L的上下游引物各1 μL, Ex Taq Polymerase(5×10⁶ U/L)0.3 μL(TaKaRa大连生物工程有限公司), 加灭菌去离子水至终体积50 μL. 反应参数为: 94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 72℃延伸10 min. PCR扩增产物5 μL, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压为120 V, 时间约30 min, 凝胶成像系统(美国BLO-RAD公司)分析结果(图1). 用High Pure PCR Product Purification kit(Roche公司)纯化PCR阳性扩增反应液, 操作步骤按说明书进行.

1.2.2 Hph 限制性内切酶酶切鉴定: M470V基因型20 μL反应体积, 其中纯化PCR反应产物5

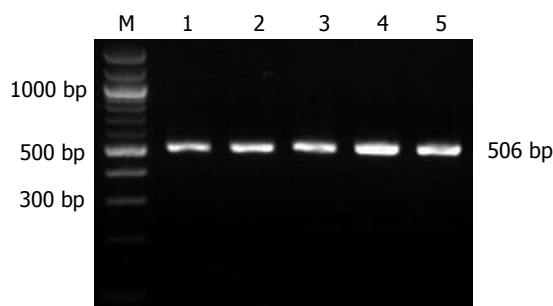


图1 Exon 10 PCR扩增结果.

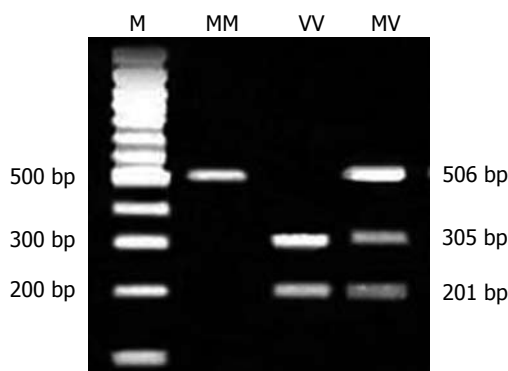


图2 M470V *Hph* I 酶切结果.

μL, 10×NE Buffer 2 μL, *Hph* I 0.5 μL(NEB公司), 灭菌去离子水12.5 μL, 37℃孵育过夜, 20 μL酶切产物上样电泳, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压为100 V, 时间约50 min. 凝胶成像系统(美国BLO-RAD公司)分析并记录、保存实验结果, 鉴定M470V基因分型(图2).

2 结果

2.1 CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率 CFTR基因外显子10 M470V有3种基因分型, 分别为MM、MV、VV基因型. 我们分析了132例研究对象, 发现MV基因型频率最高(45.5%), 其次为VV基因型(33.3%), MM基因型(21.2%). 264条DNA链中, V470等位基因频率高于M470等位基因频率, 分别为56.1%和43.9%.

2.2 中国江苏地区人群与其他国家CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率 中国人CFTR基因外显子10 M470V等位基因与亚洲其他国家及高加索人相似, V470等位基因频率均高于M470等位基因频率, MV、VV、MM三种基因型分布频率也与亚洲其他国家及高加索人相似(表1).

3 讨论

CFTR基因是一种重要的氯离子通道. 1989年,

研发前沿
CFTR基因是重要的氯离子通道, M470V多态性与CFTR蛋白氯离子通道功能相关. 在国外, CFTR基因突变及多态性一直是研究热点, 而我国却较少对其研究. M470V多态性在我国人群中的分布未见报道.

相关报道
CFTR基因突变频率及热点因地域、种族不同而有差异. CFTR基因的突变在亚洲人中少见. 日本、韩国、越南等国家对本国人群的CFTR基因做了大量筛查, 未发现白种人中常见的CFTR基因严重突变, 而M470V突变表型与类CF疾病的发生相关.

应用要点

本文对我国正常人群CFTR基因M470V多态性进行研究分析,有助于了解我国人群CFTR基因突变基因携带者情况,为我国CFTR基因突变及CFTR蛋白功能异常所致的疾病如支气管扩张、慢性胰腺炎、CBAVD等的研究提供重要的遗传学资料。

表 1 中国江苏地区人群与其他国家^[1]CFTR基因M470V多态位点基因型与等位基因频率

种群(n)	基因型数量及频率n(%)			等位基因数量及频率2n(%)	
	MM	MV	VV	M	V
Chinese(132)	28(21.2)	60(45.5)	44(33.3)	116(43.9)	148(56.1)
Caucasians(50)	9(18.0)	22(44.0)	19(38.0)	40(40.0)	60(60.0)
Japanese(50)	8(16.0)	19(38.0)	23(46.0)	35(35.0)	65(65.0)
Vietnamese(495)	106(21.4)	250(50.5)	139(28.1)	460(46.7)	528(53.3)

Riordan *et al*^[6]首次克隆了CFTR基因,其位点在第七对常染色体的长臂上(7q31),全长250 kb,共有27个外显子和26个内含子;cDNA全长6129 bp,含1480个氨基酸,分为12个跨膜片段(M1-M12)。目前已报道CFTR基因有1000多种突变和200多种多态现象^[7]。其中最常见的突变为 Δ F508,即外显子10上3-bp缺失引起蛋白质508位点苯丙氨酸丢失, Δ F508约占CFTR基因突变的35%^[8]。CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(CF)。CF是白种人中最常见的常染色体隐性遗传性疾病,发病率以西欧、北欧及北美人群为高,约为1/2500,而在亚洲人种中发病率很低,约1/100 000^[9]。CF患者几乎所有的外分泌功能都会受影响,但变异很大,多以肺和胰腺受累为主。由于外分泌液黏性增大,可阻塞分泌管腔,从而引起相应的临床表现。如在肺部,可阻塞气道,引起肺部感染,最后引起严重的、弥漫性的支气管扩张;在胰腺,由于胰液分泌受阻,引起消化不良、胰腺自身消化、慢性胰腺炎、胰腺纤维化。CFTR基因突变频率及热点因地域、种族不同而有差异,CFTR基因的突变在亚洲人中少见。日本、韩国、越南等国家对本国人群的CFTR基因做了大量筛查,均未发现在白种人中常见的CFTR基因严重突变,如 Δ F508、N1303K、 Δ I507、W1282A、R117A、R334W、R1162X、2789+5G-A等^[2,4,10-12]。CFTR基因突变可分以下5种^[13]:(1)无义突变,(2)错义突变,(3)移码突变;(4)剪接位点突变,(5)密码子缺失如 Δ F508。这些突变可分为如下5级:1级:蛋白生物合成缺陷,2级:蛋白加工成熟缺陷,3级:氯离子通道调控缺陷,4级:氯离子传导或门控功能下降,5级:蛋白质合成功能下降。这一级突变包括启动子突变、核苷酸和氨基酸替换,他们减少了结构及功能正常的CFTR蛋白数量。一般认为1、2或3级较4或5级有更严重的表型后果。M470V属于错义突变,是外显子10上470位点碱基氨

基酸发生了替换。研究表明M470V多态现象能够影响CFTR蛋白氯离子通道活性,V470等位基因型CFTR蛋白通道活性低于M470等位基因型蛋白通道活性^[3]。日本、韩国、越南等亚洲国家均对CFTR基因突变及多态性做了人群背景研究,而我国对该基因的研究却较少。有学者认为,虽然中国人CF发病率较高加索人低,但突变等位基因的绝对量可能相当大^[14]。如果按中国人CF发病率为1/100万计,至少有200万以上的CFTR突变基因携带者。目前我国尚未见对CFTR基因M470V多态位点的研究报道。我们首次分析了中国江苏地区132例正常人群CFTR基因M470V多态性,结果显示我国以MV基因型为主(45.45%),其次为VV型(33.33%)、MM型(21.21%),V470等位基因频率为56.06%,分别低于日本人群65%及高加索人群60%。我国M470V基因型及等位基因频率与越南相似,可能与我国同越南地域差异不大有关。通过此次筛查,我们首次获得了中国江苏地区CFTR Exon 10 M470V等位基因分型数据,为我国CFTR基因及其相关疾病的研究提供了重要的遗传学资料。本实验仅筛查了外显子10 M470V基因分型,至于其与CFTR常见突变相关性、CFTR蛋白功能异常所致疾病如支气管扩张、慢性胰腺炎、CBAVD(congenital bilateral absence of the vas deferens)等相关性仍有待进一步研究。

4 参考文献

- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999; 79: S23-S45
- Fujiki K, Ishiguro H, Ko SB, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41: e55
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic

- (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101: 487-496
- 4 Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2321-2332
- 5 Tzetzis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, Doudounakis S, Kanavakis E. CFTR gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet* 2001; 108: 216-221
- 6 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073
- 7 Turcios NL. Cystic fibrosis: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 307-317
- 8 Kilinc MO, Ninis VN, Dagli E, Demirkol M, Ozkinay F, Arikan Z, Cogulu O, Huner G, Karakoc F, Tolun A. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet* 2002; 113: 250-257
- 9 Findlay I. Approaches for cystic fibrosis diagnosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 166-169
- 10 Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, Ko SB, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e80-e85
- 11 Nam MH, Hijikata M, Tuan le A, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J, Tokunaga K, Keicho N. Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. *Am J Med Genet A* 2005; 136: 249-253
- 12 Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Yutsudo Y, Kasuga M. Polymorphism of cystic fibrosis gene in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2007-2012
- 13 Wine JJ, Kuo E, Hurlock G, Moss RB. Comprehensive mutation screening in a cystic fibrosis center. *Pediatrics* 2001; 107: 280-286
- 14 Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Genet* 1999; 104: 511-515

同行评价
本文采用分子生物学研究手段, 方法先进, 结论客观, 有一定的临床意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 11 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%。社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%。2007年1-11月份共收稿2432篇, 其中国内稿件912篇, 占38%; 国外稿件1520篇, 占62%; 退稿1000篇, 退稿率为41%。(常务副主任: 刘晔 2007-11-15)