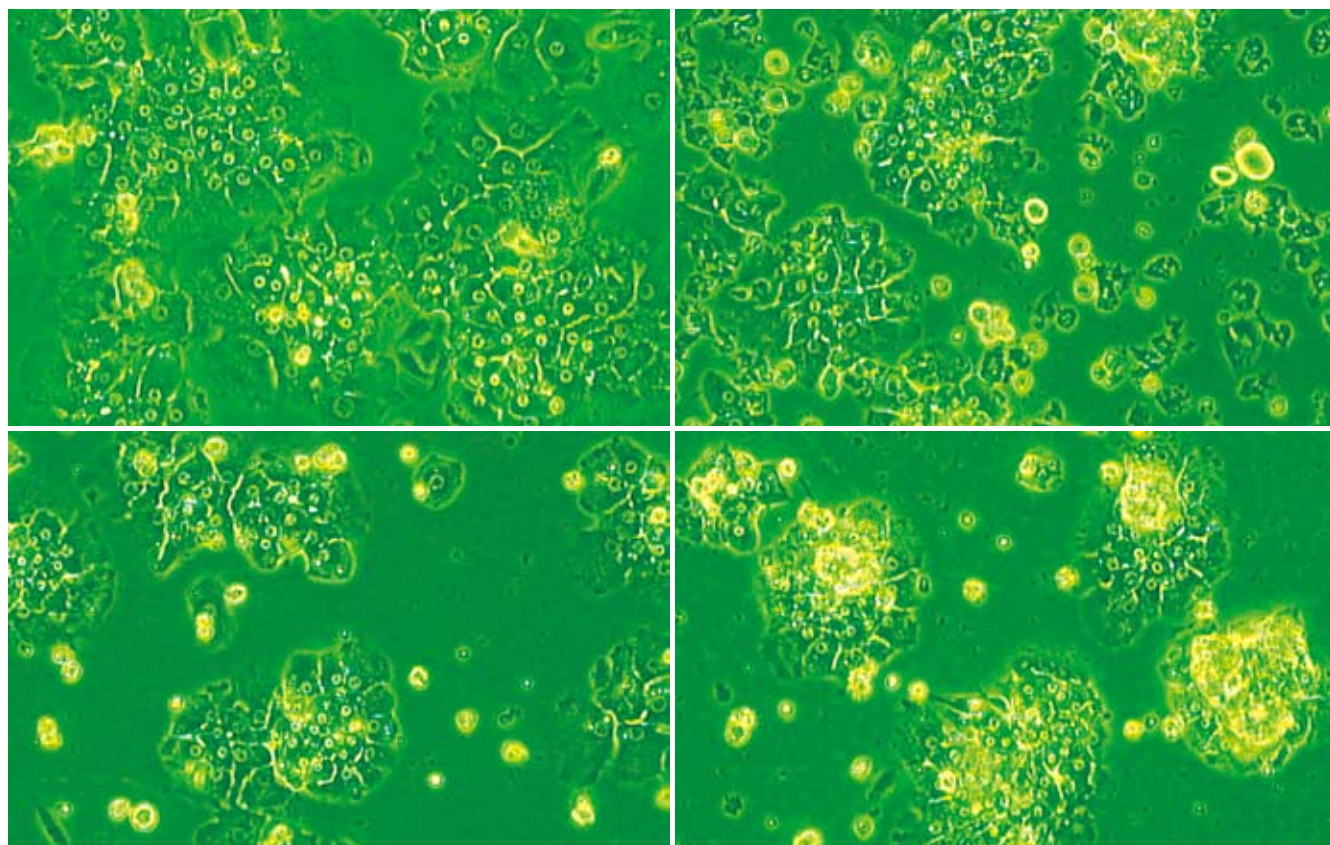


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 12 月 28 日 第 15 卷 第 36 期 (Volume 15 Number 36)



36 / 2007

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
芪新明教授
陈洪副教授
陈尼维主任医师

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李兆申教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授

吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
唐采白副教授
唐芙蓉教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张方信主任医师

张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授

巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛主治医师
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英主治医师
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

邱伟华副主任医师
裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵成浩讲师
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强博士
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师

徐智教授
许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授

钱林学主任医师
秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

程红岩教授
韩新巍教授
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
杨建勇教授

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
范志宁主任医师
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富主治医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员

高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赓宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
向德兵讲师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 12 月 28 日 第 15 卷 第 36 期 (总第224期)

述 评

3775 GGT亚组分及基因亚型与肝癌的特异性诊断

姚登福, 董志珍, 顾青青, 姚敏

基 础 研 究

3782 多希紫杉醇温敏纳米胶束对人胃癌裸鼠移植瘤的靶向治疗作用

沈泽天, 杨觅, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞

3787 体外循环状态下新生小型猪肝细胞的活性

张世昌, 王英杰, 陈志, 刘涛, 刘俊

3793 脂联素随原代HSC活化表达的动态变化及其对原代HSC表达MMP-13的影响

于丹, 马红

3798 降脂益肝冲剂对NASH大鼠肝脏抵抗素mRNA表达的影响

杨文慧, 赵和平, 段晓燕, 刘婷, 葛姝囡

3803 RNA干扰survivin基因靶向治疗大肠癌

张志宏, 韩盛玺, 邱春华, 强欧, 陈和平, 张初民, 李易

临 床 研 究

3809 胃癌组织中P27表达与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性

张广建, 寇有为, 王强

3815 肝癌组织DNA-PKcs过量表达及其靶向siRNA分子的抗增殖作用

余子建, 徐勤枝, 周丽君, 隋建丽, 张士猛, 安静, 王豫, 周平坤

3822 Vimentin在胰腺癌细胞中的表达及临床意义

殷涛, 王春友, 熊炯圻, 陶京, 赵刚

文 献 综 述

3826 饮食与溃疡性结肠炎

何新颖, 唐志鹏

3830 Fas/FasL系统表达与结直肠癌的研究进展

史勇, 关景明, 韩丹

3836 蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用

刘伟杰, 秦环龙

研 究 快 报

3842 小檗碱对肝细胞核因子6 mRNA表达及葡萄糖激酶活性的影响

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 陆小红, 董慧, 高志强

3847 丹酚酸B对肝纤维化大鼠TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平

临 床 经 验

3852 哈萨克族食管癌与CYP2E1基因多态性及烟酒嗜好的关系

陈波, 马彦清, 杨磊, 李锋, 王秀梅, 廖佩花, 何玲, 秦江梅

3856 中晚期胃癌术后序贯化疗36例

袁响林, 付强, 胡国清, 陈元, 张莉红, 胡广原, 于世英

3860 胃癌侵犯胃裸区与CD34、VEGF、VEGF-C表达的关系及临床意义

程鑫, 韩明, 张仕状, 董鹏, 曲林涛

3864 前列地尔注射液联合血浆置换治疗重型肝炎33例

陈礼宏, 李德辉, 杨春芳

	3868 Mirizzi综合征诊治14例 郭金星, 张宗明, 朱建平, 宿砚明, 蒋艺, 姜楠, 张子超 3871 胶囊内镜检查不明原因消化道出血临床转归115例 顾静莉, 戈之铮, 高云杰, 陈海英, 胡运彪, 萧树东 3877 食物不耐受与腹泻型肠易激综合征的关系 张旭东, 邓敏, 李梅, 王晓玲				
致 谢	3880 致谢世界华人消化杂志编委				
消 息	3786 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 3792 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 3802 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 即将开始实行网络版文章与该文章发表前纪录的链接 3814 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 3821 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 3829 世界华人消化杂志个性化服务订购活动 3835 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 2008年对作者贡献分布将开始实行公开策略 3841 世界华人消化杂志在线办公系统 3846 <i>WJG</i> 2007年1-11月份收稿及发稿数字统计结果 3851 中国学术期刊综合引证报告(2007) 3855 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 2008年对同行评议将开始实行公开策略 3863 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报 3867 中国科技期刊引证报告(核心版)发布 <i>WJG</i> 2006年影响因子0.834 3876 世界华人消化杂志的同行评价				
封面故事	张世昌, 王英杰, 陈志, 刘涛, 刘俊. 体外循环状态下新生小型猪肝细胞的活性. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3787-3792 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3787.asp				
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 程剑侠; 英文编辑 理文编辑; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生				
 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2007-12-28 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心 编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 世界华人消化杂志对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 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. 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换. 2007年版权归世界华人消化杂志所有					
中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
		82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050
www.wjgnet.com					

World Chinese Journal of Digestology

December 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 36

EDITORIAL	3775 Specific diagnosis of gamma-glutamyl transferase subfraction and its genotyping for hepatocellular carcinoma <i>Yao DF, Dong ZZ, Gu QQ, Yao M</i>
BASIC RESEARCH	3782 Targeting therapy with docetaxel thermosensitive nano-micelles of human gastric cancer xenografts in nude mice <i>Shen ZT, Yang M, Yu LX, Qian XP, Liu BR</i> 3787 Preliminary study of the viability of neonatal mini-porcine hepatocytes in extracorporeal circulation <i>Zhang SC, Wang YJ, Chen Z, Liu T, Liu J</i> 3793 Expression of adiponectin during hepatic stellate cell (HSC) activation and the effect of adiponectin on expression of matrix metalloproteinase-13 in primary HSCs <i>Yu D, Ma H</i> 3798 Effect of Jiangzhi Yigan Chongji on resistin mRNA in the liver of rats with non-alcoholic steatohepatitis <i>Yang WH, Zhao HP, Duan XY, Liu T, Ge SN</i> 3803 Effects and mechanisms of survivin-siRNA interference on colon adenocarcinoma cells SW620 <i>Zhang ZH, Han SX, Qiu CH, Qiang O, Cheng HP, Zhang CM, Li Y</i>
CLINICAL RESEARCH	3809 Expression of P27 and cyclin D₁ and E expression in gastric cancer <i>Zhang GJ, Kou YW, Wang Q</i> 3815 Over-expression of DNA-PKcs in hepatocarcinoma tissues and the antiproliferative effect mediated by down-regulating its expression with siRNA <i>Yu ZJ, Xu QZ, Zhou LJ, Sui JL, Zhang SM, An J, Wang Y, Zhou PK</i> 3822 Vimentin expression in pancreatic cancer and its clinical significance <i>Yin T, Wang CY, Xiong JX, Tao J, Zhao G</i>
REVIEW	3826 Diet and ulcerative colitis <i>He XY, Tang ZP</i> 3830 Progress in studies on the Fas/FasL expression system and colon carcinoma <i>Shi Y, Guan JM, Han D</i> 3836 Application of proteomic techniques in research on biomarkers for colorectal cancer <i>Liu WJ, Qin HL</i>
RAPID COMMUNICATION	3842 Effects of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor 6 and glucokinase activity in mouse primary hepatocytes <i>Yan ZQ, Leng SH, Lu FE, Lu XH, Dong H, Gao ZQ</i> 3847 Effect of salvianolic acid B on levels of TGF-β1, MMP-2 and TIMP-2 in rats with liver fibrosis <i>Lu MQ, Pan CW, Li J, Chen YP</i>
CLINICAL PRACTICE	3852 Relationship of CYP2E1 gene polymorphism and tobacco and alcohol consumption with susceptibility to esophageal cancer in Kazakh <i>Chen B, Ma YQ, Yang L, Li F, Wang XM, Liao PH, He L, Qin JM</i>

	3856 Postoperative sequence chemoradiotherapy for advanced gastric cancer: an analysis of 36 cases <i>Yuan XL, Fu Q, Hu GQ, Chen Y, Zhang LH, Hu GY, Yu SY</i> 3860 Clinical significance and relationship between gastric bare area involved in gastric carcinoma and expression of CD34, VEGF and VEGF-C <i>Cheng X, Han M, Zhang SZ, Dong P, Qu LT</i> 3864 Prostaglandin E1 combined with plasma exchange for treatment of patients with severe hepatitis: an analysis of 33 cases <i>Chen LH, Li DH, Yang CF</i> 3868 Diagnosis and treatment of 14 patients with Mirizzi syndrome <i>Guo JX, Zhang ZM, Zhu JP, Su YM, Jiang Y, Jiang N, Zhang ZC</i> 3871 Influence of capsule endoscopy on the clinical outcomes of patients with obscure gastrointestinal bleeding: an analysis of 115 cases <i>Gu JL, Ge ZZ, Gao YJ, Chen HY, Hu YB, Xiao SD</i> 3877 Food intolerance and diarrhea-dominant irritable bowel syndrome <i>Zhang XD, Deng M, Li M, Wang XL</i>
ACKNOWLEDGMENT	3880 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Zhang SC, Wang YJ, Chen Z, Liu T, Liu J.</i> Preliminary study of the viability of neonatal mini-porcine hepatocytes in extracorporeal circulation. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2007; 15(36): 3787-3792 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3787.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jian-Xia Cheng</i> English Language Editor: <i>Liwen bianji</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date December 28, 2007

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR
Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING
Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdnet.com

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdnet.com
<http://www.wcjdnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION
RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2007 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

GGT亚组分及基因亚型与肝癌的特异性诊断

姚登福, 董志珍, 顾青青, 姚敏

姚登福, 南通大学附属医院临床分子生物学中心 江苏省南通市 226001
董志珍, 南通大学医学院诊断学教研室 江苏省南通市 226001
顾青青, 南通大学附属医院内科 江苏省南通市 226001
姚敏, 南通大学附属医院医学检验中心 江苏省南通市 226001
姚登福, 1994年在日本德岛大学获博士学位, 教授/研究员, 博士生导师, 主要从事恶性肿瘤早期诊断及发病机制研究。
通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床分子生物学中心. yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052523 传真: 0513-85052254
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-12-11

Specific diagnosis of gamma-glutamyl transferase subfraction and its genotyping for hepatocellular carcinoma

Deng-Fu Yao, Zhi-Zhen Dong, Qing-Qing Gu, Min Yao

Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Molecular Biology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zhi-Zhen Dong, Department of Diagnostics, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Qing-Qing Gu, Department of Internal Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Min Yao, Department of Laboratory Science, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Molecular Biology, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2007-05-18 Revised: 2007-12-11

Abstract

Abnormal expression of total γ -glutamyl transferase (GGT, EC 2.3.2.2) activity can be found in patients with different liver diseases and extrahepatic tumors. Circulating GGT from hepatocellular carcinoma (HCC) patients can be divided into different isoforms (I, I', II, II', β , δ , ϵ , ϕ A, VIIb, ϕ C, γ A, γ B) by using PAGE. Some of these isoforms (I', II and II', and hepatoma-specific GGT, HS-GGT) can be detected in sera of HCC patients. Hepatic GGT gene expression may be closely related to the development of HCC. The human cDNA sequences from fetal liver, placenta and HepG2 cells (H) were

investigated. The genotype H was predominant in cancerous tissues of HCC. Both HS-GGT and genotype H were confirmed as useful specific HCC markers, with higher specificity and sensitivity, and their analysis may be useful for HCC diagnosis and differentiation.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; γ -glutamyl transferase; Gene; Genotyping

Yao DF, Dong ZZ, Gu QQ, Yao M. Specific diagnosis of gamma-glutamyl transferase subfraction and its genotyping for hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(36): 3775-3781

摘要

肝病及肝外肿瘤患者血 γ -谷氨酰转氨酶(GGT, EC 2.3.2.2)总活性均异常, 肝癌患者血清经聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 可将GGT分出十多种亚组分(I, I', II, II', β , δ , ϵ , ϕ A, VIIb, ϕ C, γ A, γ B), 而其中I', II, II'为肝癌所特有, 被称为肝癌特异性GGT(HS-GGT)。肝GGT基因表达与肝癌发展密切相关, 其基因亚型有胎肝型(F)、胎盘型(P)和肝癌细胞型(H), 基因型H主要见于肝癌组织。众多的基础及临床研究证实HS-GGT和基因H亚型为肝癌特异标志, 具有较高的特异性和敏感性, 其分析有助于肝癌诊断与鉴别。

关键词: 肝癌; γ -谷氨酰转氨酶; 基因; 亚型

姚登福, 董志珍, 顾青青, 姚敏. GGT亚组分及基因亚型与肝癌的特异性诊断. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3775-3781

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3775.asp>

0 引言

肝癌(HCC)是由病毒、化学致癌物等多病因作用, 因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些癌基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控而致癌变^[1], 经启动、促进、演变多阶段的发病过程^[2], 其中数百种基因调控和表达与肝癌发生、发展密切相关^[3], 患癌背景绝大多数与肝炎病毒(HBV、HCV)的慢性持续性感染有关, 并伴有肝硬化基础^[4-5]。临床上, 肝

■背景资料

肝癌是由病毒、化学致癌物等多病因作用, 经启动、促进、演变多阶段的发病过程, 发癌背景绝大多数与HBV、HCV的慢性持续性感染有关。肝癌在确诊时已多属中、晚期, 缺乏有效治疗, 预后较差, 早期诊断至关重要。肝癌的早诊早治, 今后仍应作为主攻方向。

■研发前沿
肝癌诊断相关的标志物很多,但具特异性诊断价值的不多.甲胎蛋白(AFP)诊断肝癌存在较高的假阳性和假阴性,总 γ -谷氨酰转移酶(GGT)分子中的肝癌特异性亚组分(HS-GGT)及GGT基因型对肝癌的诊断最具有特异性,对肝癌早期诊断具有应用前景.

癌在确诊时已多属中、晚期,缺乏有效治疗,术后易复发及远处转移,预后较差,早期诊断至关重要.肝癌研究的主要成就之一是早诊早治,今后仍应作为主攻方向.基因组学、蛋白组学、分子诊断技术已用于肝癌的早期发现、术后复发、转移监测,正向高度灵敏、特异诊断方向发展^[6-7].临床应用证明除肝癌特异性甲胎蛋白(HS-AFP)外,总 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyl transferase, GGT)分子中的肝癌特异性亚型(HS-GGT)及其GGT基因型对肝癌的诊断最具有特异性^[8-9].GGT基因表达、HS-GGT及GGT基因型对肝癌发病机制研究及临床诊断具有应用前景.

1 GGT基因表达与肝癌

1.1 GGT基因构成特点 人GGT基因属于一个多基因家族(至少7种基因),以适应高度生理变异及不同生理状态下的表达^[10].GGT基因位于22号染色体上,存在着一个q11-qter的BCR基因相关区域,编码有效的GGT.通过对人肝癌组织克隆的GGT cDNA研究显示,全长约2326 bp,由1707个核苷酸组成,可编码569个氨基酸组成的肽链;5'-末端非编码区域(5'-NC区)有774个核苷酸;3'-末端(3'-NC区)由132个核苷酸组成并含有AATAAA结构.人GGT基因至少编码以下几种mRNA:GGT-I mRNA主要编码人体正常组织的GGT,并且具有组织特异性;去除了顶端结构的GGT-I mRNA主要编码GGT轻链;GGT-II mRNA主要在肝脏中表达;GGT-III mRNA是另外一个去除了顶端的基因转录产物,其结构尚不清楚^[11].GGT-I mRNA主要存在于胰腺、胎盘、胎肝、肺以及肝癌组织细胞中,不同组织中的GGT-I mRNA可读框架(ORF)相同,主要区别在于其5'-NC区.在5'-NC区至少存在8种外显子,他们的可变剪接调控着GGT-I mRNA在不同组织中的表达.在肝胚胎细胞分化的不同阶段,GGT-I 基因的表达受到不同启动子的驱使和调控,并产生不同的mRNA^[12].

肝癌的发生与DNA合成及核酸代谢旺盛密切相关^[13-14].肝癌模型研究显示,在肝细胞发生癌变过程中,从肝细胞变性、癌前病变和癌变各个阶段,肝总RNA呈梯度进行性增加,肝GGT mRNA变化与总RNA相平行^[15-16].但在人肝癌的癌灶组织、癌周组织和远癌组织中,总RNA浓度在各组间差异显著^[17],人肝癌发生经过不同程度肝炎、肝硬化到肝癌长达数十年的发病过程,其中包括肝细胞坏死、结节样增生、假小叶形

成、大量的纤维结缔组织代替正常肝细胞使肿瘤组织残存肝细胞减少,同时伴肿瘤组织出血、坏死,则表现为有形细胞成分减少,组织总RNA减少,其复杂机制有待阐明^[18-19].

1.2 肝癌GGT异常表达与基因甲基化状态 体内GGT既与生物转化、核酸代谢及肿瘤发生有密切关系,又反映肝细胞恶性病变^[20].体内GGT催化谷胱甘肽及其结合物的降解,为 γ -谷氨酰循环中的关键酶,其功能与解毒和蛋白合成有关^[15].肝细胞癌变过程中,总基因组DNA甲基化水平、部分癌基因及癌相关基因如c-fos等呈低甲基化状态,DNA胞嘧啶残基的甲基化,特别是CCGG序列内位C甲基化状态与基因的调控和表达有密切关系^[21-22].胚胎期肝内GGT活性最高,出生后逐步降至较低水平;肝细胞发生癌变时,肝GGT重新大量表达,并且出现较明显的异质性改变.在致癌剂(2-FAA)诱发肝癌形成过程中,GGT表达与肝细胞癌变呈正相关^[23-24],以癌变组织GGT水平最高,GGT在癌变过程中呈动态改变,动物实验中GGT变化特点表现为8 wk最高峰,然后仍维持较高水平;肝癌模型发现癌组织GGT表达接近胎肝GGT水平^[25],肝癌组织GGT基因所编译的肽链与胎肝GGT酶蛋白相一致^[26].人肝癌形成多伴有肝炎或/和肝硬化,且多数伴有HBV感染,往往是从慢性肝炎到肝硬化到肝癌的多阶段过程,GGT表达为癌组织高于病变为肝硬化和/或慢性肝炎的癌周组织(多数伴不典型增生).肝癌形成过程中GGT活性变化,随肝病理学呈平行关系,为肝细胞恶性病变的灵敏标志酶^[27-29].

GGT基因5'-NC区含6个CCGG位点,以RT-PCR扩增GGT基因片段,利用Hap II能识别并切断未甲基化CCGG序列,可推测扩增片段中M3位点甲基化程度.癌组织GGT基因扩增片段检出率为100%,癌周和远癌组分别为85%和75%^[30].对M3位点的酶切分析,发现在肝癌、癌周和远癌组织中M3位点甲基化程度均低于30%,呈广泛的低甲基化状态,各组内未甲基化例与甲基化例的差别非常显著,提示GGT表达受基因甲基化程度的调节^[31].癌变过程中GGT基因去甲基化,使已关闭的GGT基因重新活化,过量表达GGT引起肝组织和血中酶活性的大幅度升高,提示GGT基因低甲基化诱导GGT表达,导致肝组织和血中GGT活性升高.对LEC大鼠使用低甲基化5-杂氮胞嘧啶(5-aza),使LEC大鼠5-甲基胞嘧啶含量明显的减少,同时鼠GGT大量表达,最终使该组大鼠发生肝肿瘤,而对照组未发生这种变化,说明

肝细胞对低甲基化药物高度敏感,且DNA甲基化减少在其发展为肝炎或肝肿瘤中起一定的作用.以5-aza作用于高度甲基化的Fao细胞,在引起脱甲基化作用同时,出现GGT强烈而稳定的表达,认为去甲基化增加GGT基因表达^[32-34].

2 GGT蛋白亚组分与肝癌特异诊断

2.1 GGT分子组成特点 GGT分子由大小两个亚基组成,重链由351个氨基酸残基组成,轻链由189个氨基酸残基组成^[35].重链前有一单一肽链(信号肽),由27个氨基酸残基组成,该链为脂溶性的,将GGT固定在细胞膜上. GGT分子上分别有糖基化位点和酶活性中心,在重链上有6个N-糖基化位点,轻链有一个糖化位点. GGT有非磷酸依赖性谷氨酰胺酶活性,表明该酶有谷氨酰胺结合位点^[12,36].肝细胞癌变过程中能合成和分泌多种与肝癌相关的蛋白质、多肽或同工酶. GGT亚型的区别在由于糖链结构的异常,造成电泳上迁移率不同,而蛋白质一级结构相同,酶分子间糖基化作用有明显异质性,GGT在本质上是一种含天冬氨酰的N-连接糖蛋白,正常肝脏含有完整的Gall-4GlcNAc外型糖链,但在肝细胞癌变时,表达的GGT却有一种独特的糖链结构,表现为合成的糖链不全,往往含有缺乏半乳糖(Gal)的外型糖链^[37-38].

正常肝内GGT以细胞膜上的膜结合型和存在于胞质中的可溶型两种形式存在,以前者为主,后者仅占10%左右^[39].人、鼠肝癌形成过程中,不同分子形式可溶型和膜结合型GGT亦呈同步升高趋势,但可溶型GGT与总GGT比值恒定于0.51-0.65,提示可溶型GGT相对更明显的增加可能通过酶促反应使肝脏解毒及生物转化功能加强,以解除病毒、化学致癌剂等毒性作用,保护正常肝脏免受启动因素及促癌因素影响,同时造成肝组织病理性损害^[40].且组织GGT以可溶性GGT和膜结合性GGT两种形式存在.癌组织总GGT和不同分子形式的GGT,均非常明显地高于癌周和远癌组^[41].

2.2 HS-GGT定性诊断肝癌 肝癌GGT等电点为3.8,应用阶段梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳^[42]可将GGT分成1-12条区带(I, I', II, II', β , δ , ϵ , ϕ A, VII B, ϕ C, γ A, γ B),其中II、I'、II'被称为HS-GGT,国外报道阳性率为27%-54%^[43].国内首先建立并报道以阶段梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离HS-GGT方法,并加以改进使HS-GGT诊断HCC阳性率提高到85%左右^[44];多项肝癌标

志比较,HS-GGT阳性率为85.1%,AFP(76.2%);AFP假阴性肝癌(<50 μ g/L)为84.0%;小肝癌为78.6%(AFP仅为50%);与AFP浓度或肿瘤大小无明显相关;中晚期肝癌中的阳性率,两者间无显著性差异,但在AFP低浓度或小肝癌中,其临床价值优于AFP.对肝癌行TAE术后HS-GGT阴性,病情较稳定,也是监测肝癌是否被切除或复发的有用指标^[45-46].HS-GGT表达与AFP浓度无关,对AFP高浓度或低浓度肝癌的诊断都具较高临床价值. HS-GGT在诊断肝癌方面优于AFP,随着对GGT基因的深入研究,可望成为监测肝细胞早期癌变的灵敏方法.

另一研究说明HS-GGT是AFP以外的最佳肝癌标记,诊断HCC的阳性率在80%左右,特异性97.1%.对低浓度AFP(<200 μ g/L)和假阴性HCC的诊断率分别为80.0%和77.8%^[47].随访HS-GGT阳性但无肝癌证据的病例,在2-20 mo内24.2%发生肝癌,其中73.3%为小肝癌.使用HS-GGT和AFP两项指标,可使诊断HCC的阳性率提高到94.4%^[48].通过筛选亦认为HS-GGT、异常凝血酶原(DCP)、AFP异质体可作为AFP以外的第二线最佳肝癌标志物,与AFP联合检测会大大提高HCC的阳性检出率^[49-50].

2.3 HS-GGT定量诊断肝癌 Yao *et al*^[51-52]在国内外首先建立并报道了HS-GGT定量诊断HCC方法,定量诊断阳性率为85.3%,在AFP阴性HCC 78.3%,小肝癌为75%,并可动态观察HS-GGT活性变化;对HCC患者血清肝癌特异性区带(HSB)进行定量分析,与慢性肝炎和肝外肿瘤组比较有显著性差异.而非肝癌患者全部阴性,表明检测HSB对HCC诊断有较高的敏感性和特异性^[53-54].HSB在健康人几乎测不出,急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、恶性胆道梗阻及其他肿瘤仅有极低水平的表达,都在5.5 IU/L以下,提示肝癌组织表达的GGT与正常GGT有差别.

对HS-GGT的定量分析,发现肝癌组HS-GGT活性明显升高;除极少数肝硬化或慢性肝炎患者轻度升高外,其余肝病及肝外肿瘤均在正常范围内;对肝癌诊断特异性为87%(图1),且对总GGT明显升高的肝外肿瘤鉴别也具有临床价值;肝癌术后HS-GGT活性明显下降,说明HS-GGT来源于肝癌组织,他的表达水平反映肝细胞癌变. HSB与AFP浓度或肿瘤大小无相关性;在中晚期肝癌患者中的阳性率,二者比较无显著性差异,但在AFP低浓度肝癌或小肝癌中,其临床价值优于AFP.对肝癌行TAE术后,HSB活

■相关报道
有研究资料显示HS-GGT除是AFP以外的最佳肝癌标记,诊断HCC的阳性率在80%左右,特异性97.1%.对低浓度和假阴性AFP HCC的诊断率分别为80.0%和77.8%. HS-GGT分析与AFP联合检查可使诊断HCC的阳性率提高到94.4%.

■创新盘点

HS-GGT及GGT基因H型,均为肝癌细胞产生,是肝癌诊断的特异标志,如持续性升高,应高度警惕癌变之可能;对长期慢性肝病者,有助于肝癌早期发现与良恶性肝病的鉴别;对AFP阴性或低浓度肝癌及亚临床肝癌,动态检测有助于肝癌早期诊断;术后的动态检测,可作为疗效判断及复发跟踪指标,并有助于探讨肝细胞癌变机制。

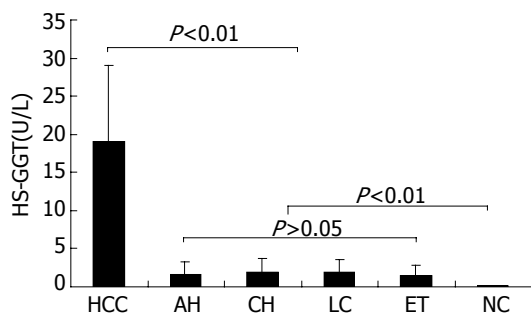


图1 外周血HS-GGT对肝癌的诊断与鉴别诊断价值。HCC: 肝癌; AH: 急性肝炎; CH: 慢性肝炎; LC: 肝硬化; ET: 肝外肿瘤; NC: 正常对照。

性均降至5.5 IU/L以下, HSB是监测肝癌被切除或复发的有用指标。在AFP浓度高于50 mg/L的肝癌中, HS-GGT异常率为89.7%; 在AFP低于50 mg/L的肝癌中, 异常率占79.6%。说明HS-GGT的表达与AFP浓度无关, 对肝癌诊断具有较高的临床价值^[55]。

2.4 肝癌GGT的免疫学诊断 以梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离HS-GGT, 方法繁琐。免疫学检测方法有多克隆抗体和单克隆抗体的检测法。多克隆抗体以提取和纯化的人HS-GGT酶蛋白免疫新西兰兔, 制备得抗血清^[56-57]。建立HS-GGT火箭电泳测定法, 对原发性肝癌及其他非癌性肝病等患者检测。此法对HCC诊断的敏感性和特异性分别为86.9%和92.1%, 肝外肿瘤、孕妇、正常人全都阴性, 而在急性肝炎、慢性肝炎和肝硬化标本中分别有15%、5%和10%表现为弱阳性。在早期和AFP阴性的HCC中, 亦具有较高的阳性率, 表明该法有助于肝癌的诊断, 包括早期和AFP阴性HCC具有定性诊断和开发推广价值^[58]。

单克隆抗体的检测法纯化HS-GGT免疫BALB/C小鼠, 利用杂交瘤技术制备单克隆抗体^[59]。采用免疫酶斑点法与电泳法同步检测肝癌和良性肝病者血清HS-GGT。单克隆抗体免疫酶斑点法检测HS-GGT对肝细胞癌的诊断阳性率71.5%与电泳法76.4%相比无明显差异。但免疫酶斑点法假阳性率(肝硬化23.7%, 慢性肝炎27.1%)高于电泳法(肝硬化10%, 慢性肝炎8.4%)。单克隆抗体免疫酶斑点法检测HS-GGT对肝细胞肝癌诊断有一定价值, 但诊断特异性有待提高。电泳法相比单抗免疫酶斑点检测法检测HS-GGT, 操作简便、无需特殊试剂和设备、易于推广, 但存在良性肝病假阳性率过高的不足, 如何提高免疫法检测HS-GGT特异性有待研究。

2.5 HS-GGT与AFP mRNA联合诊断肝癌 早期诊

断和术后复发仍是肝癌研究的重点^[60-62], 在肝癌发生过程中的早期监测及随肝癌细胞进入外周血的基因标志, 有助于两大问题解决。HS-GGT和AFP mRNA联合分析在肝癌诊断和术后复发监测中具有重要临床价值。从肝癌患者外周血有核细胞中提取总RNA, 以逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增分析AFP mRNA, 同时定量分析患者血HS-GGT水平, 比较他们在肝癌诊断中的临床价值。所设计RT-PCR扩增AFP基因片段大小为159 bp, 肝癌患者外周血AFP mRNA阳性率为60.3%, 显著高于急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝外肿瘤及正常对照组^[63]。另外AFP-mRNA阳性率, 在AFP浓度低于50 mg/L肝癌组中为57.1%, 在伴肝外转移的肝癌组中全数阳性。AFP mRNA阳性与肿瘤大小间无明显相关性, 与HS-GGT联合诊断肝癌阳性率达93.6%^[64]。HS-GGT定量有助于肝癌早期诊断^[26,65], 而外周血AFP mRNA分析, 有助于肝癌远处转移或术后复发的监测^[66-68]。

3 GGT mRNA基因型与肝癌诊断

3.1 GGT mRNA基因型别及其动态变化 肝GGT基因可分为三种亚型: 即胎肝(F)、胎盘(P)和肝癌细胞型(H)亚型^[69]。正常肝、良性肝病及肝转移癌周组织, 以F亚型为主; 肝癌、癌旁及远癌组织中H亚型阳性率显著高于正常及良性肝病肝组织; 肝癌组织F亚型阳性率明显低于正常及良性肝病肝组织。GGT mRNA亚型转化与肝癌发生有密切关系^[70]。应用PCR特异性引物检测, 证实在正常肝脏主要为F亚型, 多数标本为单基因型(F亚型), 部分标本为复合基因型, 复合基因型一般为F与P亚型组合。良性肝病肝组织的GGT mRNA亚型与正常肝组织相似, 主要为F亚型。肝癌组织中主要为H亚型, 癌旁组织及远癌组织中主要为F和H亚型。肝癌癌组织及癌旁、远癌组织H亚型的阳性率明显高于正常肝组织及良性肝病组织, 而肝癌组织F亚型的阳性率则显著低于正常及良性肝病肝组织, 远癌及癌旁肝组织的F亚型阳性率与正常及良性肝病肝组织相似。肝细胞癌变过程中存在着GGT mRNA由F亚型向H亚型的转换。癌旁及远癌组织中H亚型阳性率与癌组织相似, 说明F亚型向H亚型的转化可能发生于癌前期病变。良性肝病者, H亚型阳性可能为肝细胞的癌前期病变, 须观察^[71-73]。

3.2 H亚型与hTERT诊断肝癌 肝癌组织中端粒

酶逆转录酶(hTERT)基因及GGT mRNA H亚型表达, 与肝癌发生关系密切. 应用RT-PCR法检测肝癌组织及癌周组织、良性肝组织、对照肝组织的hTERT与GGT mRNA H亚型, 肝癌组织hTERT阳性率为86.2%, GGT mRNA H亚型阳性率为93.8%, AFP阳性率为61.5%; hTERT在小肝癌组织阳性表达率80.0%, GGT mRNA H亚型阳性表达率为90.0%, 显著高于对照组. 慢性肝炎组、肝硬化组与对照组比较, hTERT、GGT mRNA H亚型阳性表达率虽高, 但差异无显著性. 肝癌组织hTERT、GGT mRNA H亚型联合分析可弥补AFP的不足, 对肝癌具有早期诊断价值. 而在GGT升高的酒精性肝病, 肝组织hTERT呈阴性、GGT mRNA H亚型分布与正常肝组织相似, 绝大多数呈阴性, 与癌组织GGT mRNA H基因亚型分布不同. 端粒酶异常在癌形成中扮演重要角色, hTERT基因检测比AFP敏感、特异性高, 可望成为肝癌早期诊断的理想指标^[74-75].

4 结论

肝癌发生的分子机制复杂, 根本原因在于肝炎病毒的慢性感染、癌基因及癌相关基因的激活及抑癌基因的失活, 引起细胞生长失控, 肝细胞出现持续增殖, 最后导致癌变^[76-78]. 与肝癌诊断相关的标志物很多, 但具特异性诊断价值的不多^[79]. HS-GGT及基因型分析, 对长期慢性肝病患者有癌变倾向, 有助于肝癌早期发现与良恶性肝病的鉴别; 均为肝癌细胞产生, 如持续性升高, 应高度警惕癌变之可能; 作为肝癌特异性强、敏感性高标志, 对AFP阴性或低浓度肝癌及亚临床肝癌, 动态检测有助于肝癌早期诊断; 术后的动态检测, 可作为疗效判断及复发跟踪指标; GGT基因低甲基化倾向对肝细胞癌变可能起促进作用, 有助于探讨肝细胞癌变机制. 但HS-GGT异常表达机制、基因构成和肽链组成尚待研究. 总之, 对GGT基因表达、HS-GGT及GGT基因型分析, 对肝癌早期诊断具有应用前景, 并有助于肝癌发病机制探讨.

5 参考文献

- 1 Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 118-125
- 2 Yu AS, Keeffe EB. Management of hepatocellular carcinoma. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3: 8-24
- 3 Lee JS, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 125-132
- 4 Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide

- variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134
- 5 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
- 6 Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390-395
- 7 Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-1181
- 8 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 385-392
- 9 Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 172: 367-379
- 10 Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 263-355
- 11 Ikeda Y, Taniguchi N. Gene expression of gamma-glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol* 2005; 401: 408-425
- 12 Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, Mathisen O, Bremnes R, Wellman M, Visvikis A, Huseby NE. Heterogeneity in gamma-glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1648: 210-218
- 13 Kitten O, Ferry N. Mature hepatocytes actively divide and express gamma-glutamyl transpeptidase after D-galactosamine liver injury. *Liver* 1998; 18: 398-404
- 14 Yao DF, Dong ZZ. Hepatoma-related gamma-glutamyl transferase in laboratory or clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 9-11
- 15 Yao DF, Dong ZZ, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Wang HM, Meng XY. Abnormal expression of hepatoma-derived gamma-glutamyltransferase subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 564-570
- 16 Tang QY, Yao DF, Lu JX, Wu XH, Meng XY. Expression and alterations of different molecular form gamma-glutamyl transferase and total RNA concentration during the carcinogenesis of rat hepatoma. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 356-358
- 17 刘艳华, 姚登福, 汤琪云, 吴信华, 吴玮, 陆建新, 邱历伟, 孟宪镛. 人肝癌组织中总RNA浓度和GGT异常表达关系的研究. *临床肝胆病杂志* 1999; 15: 215-218
- 18 Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3: 573-588
- 19 Izumi M. Isolation, characterization and clinical evaluation of the gamma-glutamyltransferase associated with hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* 1985; 39: 19-33
- 20 Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39
- 21 Kovalszky I I, Schaff Z, Lapis K, Jeney A. Marker Enzymes of Rat Chemical Hepatocarcinogenesis in Human Liver Tumors. *Pathol Oncol Res* 1996; 2: 56-58
- 22 Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis*

■应用要点

HS-GGT诊断肝癌具有应用前景, 主要有电泳法(定性和定量法)和免疫学(多克隆抗体和单克隆抗体)方法. 电泳法相比单抗免疫酶斑点检测法检测HS-GGT, 操作简便、无需特殊试剂和设备、易于推广, 但存在良性肝病假阳性率过高的不足, 如何提高免疫法检测HS-GGT特异性有待研究.

■名词解释

1 HS-GGT: 肝癌患者血清GGT经阶段梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可分出十多种亚组分(I, I', II, II', β , δ , ϵ , ϕ A, VII B, ϕ C, γ A, γ B), 而其中 I', II, II' 组分对肝癌诊断具有特异性, 被称为肝癌特异性GGT(HS-GGT)。
2 肝GGT基因型: 可分为胎肝(F)、胎盘(P)和肝癌细胞(H)型。正常肝、良性肝病及肝转移癌周组织, 以F亚型为主, 肝癌组织以H亚型为主。

- 23 姚登福, 黄介飞, 孟宪镛, 施公胜, 魏群, 张弘, 肖明兵, 陈澍周. 鼠肝脏癌变过程中GGT及其同工酶的表达与动态变化. 肿瘤 1995; 15: 53-56
- 24 Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 210-219
- 25 Leoni S, Piscaglia F, Righini R, Bolondi L. Management of small hepatocellular carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg* 2006; 69: 230-235
- 26 Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 761-769
- 27 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- 28 汤琪云, 姚登福, 刘艳华. DNA甲基化水平与肝癌发生关系的研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 1999; 8: 166-169
- 29 Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *J Hepatol* 2006; 44: 798-805
- 30 Yao D, Tang Q, Meng X. Relationship between methylation status of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) genes and abnormal expression of its enzyme proteins in tissues of human hepatomas. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 1999; 7: 132-134
- 31 汤琪云, 姚登福, 刘艳华, 孟宪镛, 杨树成, 吴信华, 吴玮, 陆建新. 人肝癌组织中 γ -谷氨酰转移酶异常表达及其基因甲基化程度的研究. 中华消化杂志 1999; 19: 168-171
- 32 Chan AO, Rashid A. CpG island methylation in precursors of gastrointestinal malignancies. *Curr Mol Med* 2006; 6: 401-408
- 33 Zhang C, Li Z, Cheng Y, Jia F, Li R, Wu M, Li K, Wei L. CpG island methylator phenotype association with elevated serum alpha-fetoprotein level in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 944-952
- 34 Sawaki M, Enomoto K, Takahashi H, Nakajima Y, Mori M. Phenotype of preneoplastic and neoplastic liver lesions during spontaneous liver carcinogenesis of LEC rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1857-1861
- 35 姚登福. 肝癌特异性GGT诊断肝癌的研究进展. 国外医学内科学分册 1997; 24: 59-62
- 36 Yao DF, Zhu Y, Wu XH, Wu W, Qiu LW. Clinical values of vascular endothelial growth factor expression and microvascular density analysis in liver cancer specimens. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 92-94
- 37 Kang HJ, Kim BC, Park EH, Ahn K, Lim CJ. The gene encoding gamma-glutamyl transpeptidase II in the fission yeast is regulated by oxidative and metabolic stress. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 609-618
- 38 Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N. Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 5752-5756
- 39 Yao D, Jiang D, Wu X. Experimental study on value of carcino-embryonic gamma-glutamyl transferase isoenzymes for monitoring carcinogenesis of hepatocytes. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2000; 8: 30-32
- 40 姚登福, 卜召祥, 孟宪镛. 外周血基因标志监测肝癌微小转移的临床价值. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 551-555
- 41 Cohen MB, Beckstead JH, Ferrell LD, Yen TS. Enzyme histochemistry of hepatocellular neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 789-794
- 42 Sawabu N, Nakagen M, Yoneda M, Makino H, Kameda S, Kobayashi K, Hattori N, Ishii M. Novel gamma-glutamyl transpeptidase isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *Gann* 1978; 69: 601-605
- 43 Suzuki H. Clinical significance of appearance of serum gamma-glutamyl transpeptidase isozyme. *Gastroenterol Jpn* 1981; 16: 122-128
- 44 王惠民, 姚登福, 杨振华. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 γ -谷氨酰基转移酶. 中华医学检验杂志 1985; 8: 73-76
- 45 黄中伟, 姚登福, 孟宪镛, 肖明兵, 葛政举, 黄介飞, 陈澍周. γ 谷氨酰转移酶同工酶II定量测定对原发性肝癌的诊断价值. 中华消化杂志 1996; 16: 245-246
- 46 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma surgery--review of the past and prospects for the 21st century. *J Surg Oncol* 2005; 91: 95-96
- 47 Xu K, Meng XY, Wu JW, Shen B, Shi YC, Wei Q. Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transferase isoenzyme for hepatocellular carcinoma: a 10-year study. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 991-995
- 48 Yu ZJ, Yu JW, Cai W, Yuan HX, Li XY, Yuan Y, Chen JP, Wu XY, Yao DF. Evaluation of HCPTd1,d14-double passaged intervening chemotherapy protocol for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5221-5225
- 49 Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, Li Y, Chen X. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003; 88: 1878-1882
- 50 Morsi MI, Hussein AE, Mostafa M, El-Abd E, El-Moneim NA. Evaluation of tumour necrosis factor-alpha, soluble P-selectin, gamma-glutamyl transferase, glutathione S-transferase-pi and alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma before and during chemotherapy. *Br J Biomed Sci* 2006; 63: 74-78
- 51 黄中伟, 姚登福, 孟宪镛, 葛政举, 肖明兵, 黄介飞, 陈澎周. γ -谷氨酰转移酶肝癌特异性区带定量检测的临床意义. 中华内科杂志 1995; 34: 123
- 52 Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, Huang JF, Lu JX, Xiao MB, Meng XY. Diagnosis of hepa-tocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyl-transferase. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 743-749
- 53 姚登福, 于志坚, 蒋道荣, 茅国新, 吴信华, 孟宪镛. GGT异常表达机制及定量HS-GGT诊断肝癌临床价值的研究. 中国肿瘤临床 2000; 27: 170-173
- 54 姚登福, 黄介飞, 陈澍周, 黄中伟, 孟宪镛. 肝癌特异性GGT的发生及其定量分析的临床价值. 胃肠病学和肝病学杂志 1997; 6: 78-81
- 55 董志珍, 姚登福, 邱历伟, 吴玮, 吴信华, 孟宪镛. 定量分析肝癌特异性GGT对肝癌诊断和鉴别价值的比较研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2000; 9: 54-56
- 56 姚登福, 黄介飞, 魏群, 张弘, 肖明兵, 江枫, 孟宪镛. 肝癌特异性GGT-II抗体制备及其电泳分析的临床应用. 交通医学 1997; 11: 145-147
- 57 黄介飞, 姚登福, 孟宪镛, 魏群, 倪润洲, 张弘, 肖明兵.

- 肝癌特异性GGT火箭电泳对原发性肝癌的诊断价值. 中华消化杂志 1995; 15: 269-272
- 58 黄介飞, 姚登福, 孟宪镛, 魏群, 倪润洲, 张弘, 肖明兵. 人胎肝GGT抗血清对原发性肝癌的诊断价值. 中华肝脏病杂志 1995; 3: 227-228
- 59 倪润洲, 黄介飞, 肖明兵, 张沛云, 孟宪镛. 单抗免疫酶斑点法检测GGT-II在肝癌诊断中的价值. 癌症 2004; 23: 66-68
- 60 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma--cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- 61 Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, Shiratori Y, Omata M, Makuuchi M. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Hepatology* 2002; 35: 853-860
- 62 Funaki NO, Tanaka J, Seto SI, Kasamatsu T, Kaido T, Imamura M. Hematogenous spreading of hepatocellular carcinoma cells: possible participation in recurrence in the liver. *Hepatology* 1997; 25: 564-568
- 63 姚登福, 汤琪云, 刘艳华, 孟宪镛, 陆建新, 吴信华, 黄介飞. 人肝癌组织GGT异常表达与逆转录巢式PCR分析. 江苏医药 1999; 25: 399-401
- 64 Yao DF, Yao M, Qiu LW, Dong ZZ, Zong L, Meng XY. Comprehensive assessment of circulating AFP mRNA and HS-GGT for diagnosis of hepatocellular carcinoma and monitoring of its metastasis. *Progress on Post-Genome Technologies*, 2006: 456-460
- 65 Pavesi F, Lotzniker M, Scarabelli M, Garbagnoli P, Moratti R. Efficiency of composite laboratory tests in the diagnosis of liver malignancies. *Int J Biol Markers* 1989; 4: 163-169
- 66 董志珍, 姚登福, 杨大明, 于志坚, 吴信华, 吴玮, 邱历伟. HS-GGT和AFP-mRNA联合分析在肝癌诊断中的临床价值. 胃肠病学和肝病杂志 2003; 12: 263-266
- 67 Chen XP, Zhao H, Zhao XP. Alternation of AFP-mRNA level detected in blood circulation during liver resection for HCC and its significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 818-821
- 68 Yao F, Guo JM, Xu CF, Lou YL, Xiao BX, Zhou WH, Chen J, Hu YR, Liu Z, Hong GF. Detecting AFP mRNA in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and hepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 361: 119-127
- 69 Han GQ, Qin CY, Shu RH. The analysis of gamma-glutamyl transpeptidase gene in different type liver tissues. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 276-280
- 70 Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, Zang SC, Furukawa T, Taniguchi N. Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 23: 1093-1097
- 71 韩国庆, 秦成勇, 任万华, 石军, 刘华琳. γ -谷氨酰转移酶mRNA亚型对肝细胞癌变的监测. 中华内科杂志 2002; 41: 160-162
- 72 韩国庆, 秦成勇, 任万华, 石军, 王延军, 刘华琳. 检测 γ -谷氨酰转移酶mRNA亚型在肝癌早期诊断中的临床价值. 癌症 2002; 21: 192-195
- 73 韩国庆, 秦成勇. 肝组织谷氨酰转移酶mRNA亚型的测定及其意义. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 126-128
- 74 姚敏, 姚登福, 吴玮, 邱历伟, 吴信华, 苏小琴, 邹黎. 肝癌组织及外周血单核细胞端粒酶异常对肝癌诊断价值的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2005; 14: 564-567
- 75 秦成坤, 张启华, 徐健, 刘素侠, 韩国庆. 肝癌组织端粒酶逆转录酶hTERT基因及GGT-mRNA-H亚型表达与肝癌早期诊断的研究. 中国现代普通外科进展 2005; 8: 151-153
- 76 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 77 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- 78 Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- 79 Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002; 62 Suppl 1: 57-63

■同行评价

本文引用参考文献充分并适当, 文字表达准确, 流畅, 可读性强, 所得结论具有一定的科学性, 新颖性, 对进一步进行肝癌的基础, 临床研究 and 临床实际应用具有较好的指导作用。

编辑 程剑侠 电编 何基才

多希紫杉醇温敏纳米胶束对人胃癌裸鼠移植瘤的靶向治疗作用

沈泽天, 杨 觅, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞

■背景资料
化疗在肿瘤治疗中占有重要地位, 但由于化疗疗效较低, 毒副作用大, 如果降低给药剂量以减少毒副作用, 又会降低对肿瘤的治疗效果, 为了打破这一僵局, 研究者们一直在考虑尝试新的靶向给药途径。

沈泽天, 杨觅, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤学研究所 江苏省南京市 210008
沈泽天, 2005年南京大学医学院肿瘤学硕士生, 主要研究方向为热靶向化疗。
国家自然科学基金资助项目, No. 30670958
通讯作者: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤学研究所。
baoruiliu@hotmail.com
电话: 025-83304616-21001
收稿日期: 2007-07-31 修回日期: 2007-11-05

Targeting therapy with docetaxel thermosensitive nano-micelles of human gastric cancer xenografts in nude mice

Ze-Tian Shen, Mi Yang, Li-Xia Yu, Xiao-Ping Qian, Bao-Rui Liu

Ze-Tian Shen, Mi Yang, Li-Xia Yu, Xiao-Ping Qian, Bao-Rui Liu, Oncology Center, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670958
Correspondence to: Dr. Bao-Rui Liu, Oncology Center, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. baoruiliu@hotmail.com
Received: 2007-07-31 Revised: 2007-11-05

Abstract

AIM: To study the curative effects of docetaxel thermosensitive nano-micelles on human gastric cancer xenografts in nude mice.

METHODS: Human gastric cancer cell line BGC-823 was implanted into 48 nude mice. Different drugs were injected through the caudal vein in eight groups after establishment of the experimental model. Permanent temperature of the tumor was taken in the thermotherapy group. Tumor growth was monitored once every other day. Dynamic viewing and determining the rate of tumor regression in terms of

tumor weight and volume were used to evaluate therapeutic efficacy. The side effect was evaluated through surveying all the condition and the relative variation in mouse body weight.

RESULTS: Tumor growth speed in the docetaxel thermosensitive nano-micelle thermotherapy group was significantly slower than that in the other groups. Tumor volume and weight regression in the docetaxel thermosensitive nano-micelle thermotherapy group were 81.5% and 85.4%, respectively, which were markedly higher than those of the docetaxel thermosensitive nano-micelle group (32.2% and 37.5%) and the docetaxel injection group (49.2% and 58.0%) (both $P < 0.05$). The drug side effects and toxicity of docetaxel thermosensitive nano-micelle thermotherapy were significantly less than those in the other groups.

CONCLUSION: Docetaxel thermosensitive nano-micelles show good inhibition of tumor growth, which indicates a favorable potential in clinical application.

Key Words: Gastric cancer; Thermosensitive nano-micelle; Docetaxel; Targeting therapy; Thermotherapy

Shen ZT, Yang M, Yu LX, Qian XP, Liu BR. Targeting therapy with docetaxel thermosensitive nano-micelles of human gastric cancer xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3782-3786

摘要

目的: 探讨多希紫杉醇温敏纳米胶束治疗人胃癌裸鼠移植瘤的疗效。

方法: 采用裸鼠BGC-823胃腺癌动物模型, 每组6只, 随机分配至设立的多希紫杉醇非热疗和热疗组, 多希紫杉醇温敏纳米胶束非热疗和热疗组以及生理盐水对照组等共8组, 采用尾静脉给药方式, 并恒温43℃对热疗组肿瘤部位进行热导向化疗, 动态观察并测定肿瘤的体积、瘤质量抑瘤率, 评价治疗效果, 并观察实验期间动物的全身情况及相对体质量变化, 评

价毒副作用。

结果: 多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组人胃癌移植瘤表现出明显抑制, 体积和瘤质量抑瘤率分别为81.5%和85.4%, 显著高于多希紫杉醇温敏纳米胶束非靶向组(32.2%, 37.5%)和多希紫杉醇注射液组(49.2%, 58.0%)($P < 0.05$), 且多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组的小鼠体质量与其他各组比较相对平稳, 且饮食、活动正常, 对正常组织的毒副作用明显减轻。

结论: 温敏纳米胶束具有良好的高效低毒体内抗肿瘤作用, 作为一种新型的药物载体显示了良好的应用前景。

关键词: 胃癌; 温敏纳米胶束; 多希紫杉醇; 靶向治疗; 热疗

沈泽天, 杨觅, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞. 多希紫杉醇温敏纳米胶束对人胃癌裸鼠移植瘤的靶向治疗作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3782-3786

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3782.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 尤其在我国的发病率和死亡率仍居首位^[1]。新近资料显示, 我国胃癌死亡率总体呈上升趋势^[2]。传统的手术治疗、放射治疗、化疗等疗效较差, 5年生存率很低。化疗仍然是胃癌的标准治疗手段之一^[3-5]。然而由于化疗药物对肿瘤细胞缺乏特异性且毒副作用大, 传统途径给药模式由于化疗药物用量大, 大多缺乏药理作用专一性, 对正常组织产生严重的不良反应。因此, 提高药物抗肿瘤效果、减低毒副作用迫在眉睫, 实现这个目标的一个重要方法是将化疗药物与载体相结合^[6-10], 以改变化疗药物在体内分布来提高肿瘤局部的药物浓度, 最大限度的降低非肿瘤部位的药物浓度, 从而减少化疗药物带来的毒副作用。

我们在研究工作中, 采用开环聚合及溶剂蒸发法制备了新型温敏纳米载体, 兼具热靶向和被动靶向性, 在体外显示出良好的肿瘤部位聚集效果^[11]。在前期体外实验的基础上, 本实验首次通过多希紫杉醇温敏纳米胶束对人胃癌裸鼠移植瘤抗癌作用观察, 评价其作为热靶向治疗肿瘤的可行性, 为今后进一步深入研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 动物: BALB/c nu/nu裸鼠(购自北

京维通利华实验动物技术有限公司), SPF级, ♂, 6-7 wk龄, 18-20 g, 动物质量合格证号SCXX(2002-0003)。于南京大学医学院附属鼓楼医院实验动物中心无特殊病原菌(SPF)条件下饲养。人低分化胃腺癌BGC-823细胞株为本室保存。多希紫杉醇(北京协和药厂); 多希紫杉醇温敏纳米胶束(本实验室自行制备)^[11]。RPMI-1640培养基系GIBCO公司产品, 按产品说明书配制, 过滤除菌备用; 胰蛋白酶系华文生物工程公司产品, 以1640培养液配制2.5 g/L浓度备用; 新生小牛血清系兰州民海生物工程公司生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人胃癌BGC-823细胞培养于37℃, 50 mL/L CO₂浓度的培养箱中, 采用含100 mL/L新生小牛血清的RPMI-1640培养液。传代时用2.5 g/L的胰酶消化处理和PBS洗涤。

1.2.2 人胃癌裸鼠移植瘤模型的建立: 人胃癌BGC-823细胞生长至铺满培养瓶80%-90%时, 用2.5 g/L的胰酶消化后收集, 制成单细胞悬液, 悬浮于无血清的RPMI-1640培养液中, 显微镜下计数并调整细胞数至 $4-6 \times 10^{10}$ /L, 分别接种于裸鼠右后下肢皮下, 每只0.1 mL。细胞种植14 d后, 选择肿瘤体积100 mm³左右的裸鼠为实验模型。

1.2.3 实验分组、给药方法: 移植性人胃癌裸鼠48只, 随机分为生理盐水对照组(A)和单纯热疗组(B)、空白温敏纳米胶束非热疗(C)和热疗组(D), 多希紫杉醇非热疗(E)和热疗组(F), 多希紫杉醇温敏纳米胶束非热疗(G)和热疗组(H)等8组, 每组6只, 隔天尾静脉注射给药。各组多希紫杉醇剂量均按10 mg/kg体质量计算。在肿瘤热疗的过程中将裸鼠固定, 暴露右后下肢肿瘤, 将肿瘤部位浸入水浴箱中43℃恒温热疗30 min。

1.2.4 肿瘤体积变化及抑瘤率: 第3, 5, 7, 9, 11 d用游标卡尺测量肿瘤长径a和垂直于a的最大横径b, 用电子天平称量裸鼠体质量。第11 d拉脱颈椎处死裸鼠, 在超净工作台上解剖观察, 剥离瘤体称质量, 同时将肿瘤剥离拍照观察肿瘤体积变化差异。按照以下公式: 瘤体积 = $ab^2/2$, 体积抑瘤率(%) = $[1 - (\text{实验组平均体积变化} / \text{对照组平均体积变化})] \times 100\%$, 瘤质量抑瘤率(%) = $[1 - (\text{实验组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量})] \times 100\%$, 分别计算瘤体积、体积抑瘤率及瘤质量抑瘤率。然后以每组动物移植瘤体积的平均值为纵坐标, 处理时间为横坐标, 绘制移植瘤生长曲线。

1.2.5 实验动物的全身状况和体质量变化: 每日观察各组动物的饮食、活动、皮色等方面的变

■研发前沿
在肿瘤药物靶向治疗领域, 形成了一个新的热靶向药物治疗研究分支, 温敏药物载体介导下的肿瘤热靶向化疗开始受到关注, 他将热疗与化疗相结合, 充分发挥两者的协同作用, 又能实现药物的靶向投递, 达到事半功倍的效果。但选择什么样的材料, 采用什么样的工艺才能达到最佳效果, 是需要努力的方向。

■相关报道
经研究证实, 应用磁靶向过程是血管内血流对磁粒产生的力和磁铁产生磁力的竞争过程。当磁力大于毛细血管(0.05 cm/s)的线性血流速率时, 磁性载体(< 1 μm)被截留在靶部位, 并可能被靶组织的内皮细胞吞噬。已经证明, 在载血流速率为0.55-0.1 cm/s的血管处, 在0.8T(8000GS)的外磁场下, 就足以使含有20%的磁性载体全部滞留。因此, 磁靶向给药系统也是靶向给药系统的研究热点之一。

■创新盘点

本文首次选用温敏纳米胶束为载体,以热为触发机制实现化疗药物的肿瘤靶向投递,并制备温敏多希紫杉醇纳米胶束,证实了载药粒子具有高效低毒的特性,显示了良好的热靶向性。

表 1 各实验组对肿瘤体积增殖抑制效果, 体积抑瘤率, 肿瘤瘤质量和瘤质量抑制率(mean $\pm$ SD, %, $n = 6$)

分组	肿瘤体积(cm^3)	体积抑瘤率(%)	1P	2P	肿瘤质量(g)	质量抑制率(%)	1P	2P
A	0.766 ± 0.145	0	-	0.006	0.60 ± 0.16	0	-	0.001
B	0.655 ± 0.223	14.5	0.084	0.007	0.51 ± 0.12	14.5	0.275	0.002
C	0.597 ± 0.189	22.1	0.072	0.008	0.50 ± 0.16	16.7	0.252	0.004
D	0.528 ± 0.209	31.1	0.055	0.009	0.43 ± 0.13	29.2	0.194	0.005
E	0.389 ± 0.171	49.2	0.038	0.019	0.25 ± 0.11	58.3	0.017	0.023
F	0.322 ± 0.152	58.0	0.021	0.024	0.24 ± 0.15	60.4	0.013	0.036
G	0.519 ± 0.121	32.2	0.058	0.011	0.38 ± 0.19	37.5	0.182	0.008
H	0.142 ± 0.670	81.5	0.006	-	0.09 ± 0.05	85.4	0.001	-

注: 1 与A组相比; 2 与H组相比。

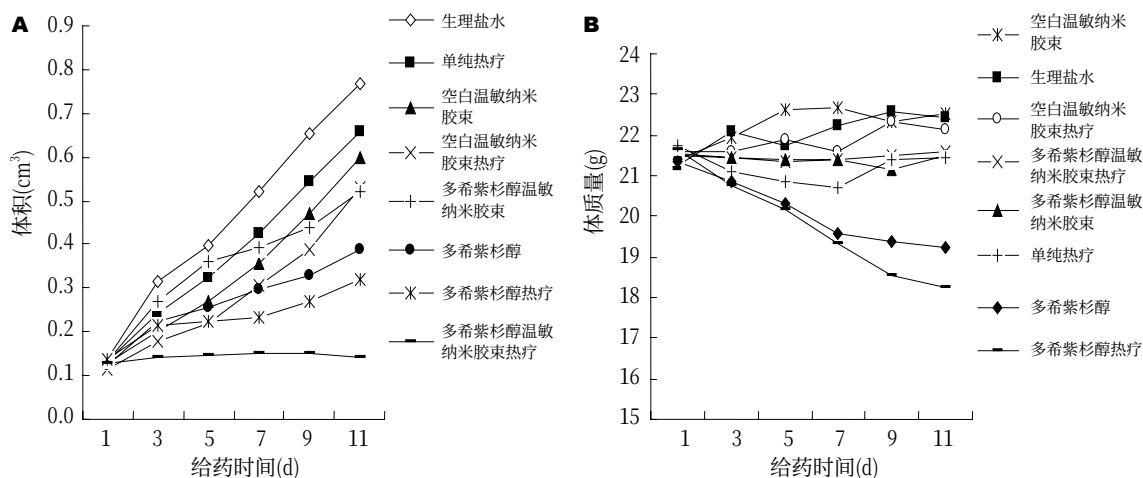


图 1 各实验组肿瘤生长体积和小鼠体质量变化曲线。A: 肿瘤生长体积; B: 小鼠体质量。

化, 隔天测量裸鼠体质量, 观察体质量变化情况, 以每组动物体质量平均值为纵坐标, 处理时间为横坐标, 绘制体质量变化曲线。

统计学处理 通过SPSS11.5统计软件完成所有统计分析, 定量测定结果以mean $\pm$ SD表示, 正态分布资料以 F 检验检测其方差齐性, 单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较多个样本的均数, Dunnett- t 检验检测多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组及生理盐水组与其他实验组均数的差异。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤体积变化及体积抑瘤率 多希紫杉醇、多希紫杉醇热疗、多希紫杉醇温敏纳米胶束非热疗、多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组的体积抑瘤率分别为49.2%, 58.0%, 32.2%, 81.5%; 多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组的体积增长速度明显低于其他各组($P < 0.05$, 表1, 图1A)。

2.2 肿瘤瘤质量及瘤质量抑瘤率 载药温敏纳米胶束热疗后瘤质量明显低于其他实验组

($P < 0.05$), 抑瘤率最高, 与多希紫杉醇组相比, 多希紫杉醇温敏纳米胶束组热疗后瘤质量明显减轻($P < 0.05$), 抑瘤率显著增加, 而载药纳米胶束组未热疗时, 其瘤质量高于多希紫杉醇组($P < 0.05$) (表1)。

2.3 实验期间动物的全身情况及相对体质量变化 在实验期间, 多希紫杉醇和多希紫杉醇热疗组的裸鼠后期反应迟钝, 饮食、活动都较差, 皮肤无光泽, 体质量下降较快。各实验组由于药物毒性的差异显示相应变化, 多希紫杉醇和多希紫杉醇热疗组体质量出现下降, 而多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组的体质量与其他各组比较相对平稳, 且饮食、活动正常(图1B)。

3 讨论

随着人们对肿瘤的认识逐步加强, 以及新型抗肿瘤药物的不断问世, 化疗在肿瘤治疗中的地位正逐步地提高, 成为许多肿瘤的主要治疗手段。但系统化疗的主要问题在于: (1)存在全身的药物再分布; (2)药物缺乏对病变部位的特异

■应用要点

新构建了温敏载药纳米胶束, 可提高对肿瘤的杀伤效果、减少正常组织的毒性。在后续的研究中如果能进一步优化制备工艺, 提高药物的载药量及负载效率, 并进一步考察载药粒子的毒性、生物相容性等方面的参数, 可使让这种新型的靶向制剂尽快走入临床。

亲和性; (3) 用药达到很大剂量才能在靶部位产生一个较高的局部浓度; (4) 因给药量大而对正常组织产生非特异性的毒副作用, 可造成肝肾损伤、骨髓抑制、胃肠道反应等多种毒副作用^[12-13]。药物靶向治疗可在一定程度上解决这个问题, 他使靶部位的药物浓度明显提高, 给药方式简化, 同时可减少用量并使治疗费用降低, 减少药物对全身的毒副作用。温敏药物载体属于靶向给药传递系统的一种新剂型, 被认为是较理想的载体。普通的化疗药物进入体循环后主要分布在肝、脾和骨髓等网状内皮细胞较丰富的器官中, 往往被网状内皮系统(RES)的巨噬细胞吞噬, 造成对实体肿瘤疗效欠佳。

多希紫杉醇(docetaxel, DOC)是第二代紫杉烷类高效抗肿瘤药物, 目前临床上主要应用于转移性乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、晚期胃癌等治疗^[14-17]。多希紫杉醇的主要不良反应有骨髓抑制、液体潴留、血管性水肿、过敏反应、神经毒性反应、消化道反应、皮肤毒性反应, 以及其他副反应^[18-19]。其中以骨髓抑制最为常见, 主要表现为白细胞及血小板的降低。这样, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也产生全身严重的不良反应, 使临床应用受到限制。已有文献证明, 骨髓抑制是剂量相关性的^[20], 即抑制程度与多希紫杉醇的用量成正比。

本文通过首次自行合成的温敏纳米载体, 减轻了原药的过敏反应, 减少RES的吞噬、吸收, 延长药物在体内的循环时间。将药物以温敏纳米材料为载体制成多希紫杉醇温敏纳米胶束, 在足够的体外热场引导下, 随血流运行, 选择性地到达并定位于肿瘤靶区。药物以受控的方式从载体中释放, 然后在肿瘤组织的细胞或亚细胞水平上发挥药效作用。将纳米载体和热靶向两者优点结合起来的温敏纳米载体属于第四代靶向给药系统。温敏纳米载体作为化疗药物的载体应用于恶性肿瘤的治疗, 除具有一般载体的优点外, 还可以通过热疗作用使载体的靶向作用进一步提高。

以荷人胃癌裸鼠作为动物模型, 通过尾静脉注射多希紫杉醇温敏纳米载体, 肿瘤在恒温热疗的情况下, 该组肿瘤生长速度较其他各组明显减慢, 体积抑瘤率和瘤质量抑瘤率高达81.5%和85.4%, 而不热疗时温敏纳米胶束的体积和瘤质量抑瘤率显著降低, 说明加热能明显提高载药温敏纳米胶束的肿瘤抑制作用, 这是由于加热后药物在肿瘤组织中分布、释放及载

体与肿瘤细胞作用均增加所致。同时临床上常用的多希紫杉醇组的体积抑瘤率和瘤质量抑瘤率分别49.2%和58.3%, 热疗和不热疗时差异没有显著性, 而其和多希紫杉醇温敏纳米胶束相比, 差异有显著性(P 值分别为0.0185, 0.0231), 多希紫杉醇温敏纳米胶束的抗肿瘤效果显著高于目前临床上常用的多希紫杉醇注射液。在实验期间多希紫杉醇温敏纳米胶束热疗组体质量与其他各组相比较平稳, 且饮食、活动正常, 而多希紫杉醇和多希紫杉醇热疗组体质量下降比较明显, 可见经改变多希紫杉醇剂型, 其药物毒性明显降低, 并具有高效的肿瘤热靶向性。其机制为在恒定热场作用下多希紫杉醇纳米胶束采用热触发机制靶向给予病灶部位, 而对非靶组织、器官、细胞影响很小, 从而提高疗效和减少药物的毒副作用。

肿瘤热靶向治疗, 可提高对肿瘤的杀伤效果、减少对正常组织的毒性, 具有很好的开发应用前景。当然如果要让多希紫杉醇温敏纳米胶束早日应用于临床, 我们还将进一步优化制备工艺, 提高药物的载药量及负载效率, 并将进一步考察载药纳米胶束的毒性、生物相容性等方面的参数, 希望这一靶向制剂能够真正从实验室走向临床, 为肿瘤治疗提供一种新的途径。

总之, 多希紫杉醇温敏纳米胶束可抑制胃低分化腺癌细胞增殖活性, 同时降低药物的毒副作用; 在其体外抑制肿瘤细胞增殖的基础上^[11], 本实验进一步证实了多希紫杉醇温敏纳米胶束的体内抗肿瘤作用, 为其应用于肿瘤治疗提供了更完善的理论依据。目前热靶向治疗肿瘤, 国内外均处于起步阶段, 温敏纳米载体作为一种新型抗肿瘤药物载体显示了良好的应用前景。

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 乔友林, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠. 中国1990-1992年胃癌死亡调查分析. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 4-8
- 2 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 3 Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, Huenges E, Nawroth T, Arnold W, Parak FG. Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J* 2006; 35: 446-450
- 4 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小朋, 孙培龙. 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1535-1539
- 5 王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化

■名词解释

多希紫杉醇温敏纳米胶束(载体): 药物以温敏纳米材料为载体制成多希紫杉醇温敏纳米胶束, 在足够的体外热场引导下, 随血流运行, 选择性地到达并定位于肿瘤靶区。药物以受控的方式从载体中释放, 然后在肿瘤组织的细胞或亚细胞水平上发挥药效作用。

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 有利于其引申研究.

- 疗药物敏感性的应用研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 997-999
- 6 Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 59-74
- 7 Tyagi P, Wu PC, Chancellor M, Yoshimura N, Huang L. Recent advances in intravesical drug/gene delivery. *Mol Pharm* 2006; 3: 369-379
- 8 Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1640-1665
- 9 Gavini E, Hegge AB, Rassu G, Sanna V, Testa C, Pirisino G, Karlsen J, Giunchedi P. Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: *in vitro/in vivo* studies. *Int J Pharm* 2006; 307: 9-15
- 10 Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm* 2003; 255: 13-32
- 11 Yang M, Ding Y, Zhang L, Qian X, Jiang X, Liu B. Novel thermosensitive polymeric micelles for docetaxel delivery. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 847-857
- 12 Airoidi M, Cattell L, Marchionatti S, Recalenda V, Pedani F, Tagini V, Bumma C, Beatrice F, Succo G, Maria Gabriele A. Docetaxel and vinorelbine in recurrent head and neck cancer: pharmacokinetic and clinical results. *Am J Clin Oncol* 2003; 26: 378-381
- 13 周际昌. 实用肿瘤内科学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 28-30
- 14 Ajani JA. Chemotherapy for advanced gastric or gastroesophageal cancer: defining the contributions of docetaxel. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 1627-1631
- 15 de Bree E, Theodoropoulos PA, Rosing H, Michalakis J, Romanos J, Beijnen JH, Tsiftsis DD. Treatment of ovarian cancer using intraperitoneal chemotherapy with taxanes: from laboratory bench to bedside. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 471-482
- 16 Raez LE, Santos ES, Lopes G, Rosado MF, Negret LM, Rocha-Lima C, Tolba K, Farfan N, Hamilton-Nelson K, Silva O, Roman E. Efficacy and safety of oxaliplatin and docetaxel in patients with locally advanced and metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2006; 53: 347-353
- 17 Lopez M. Metastatic breast cancer: new chemotherapy regimens with taxanes. *Clin Ter* 2005; 156: 311-315
- 18 Lee JJ, Han JY, Lee DH, Kim HY, Chun JH, Lee HG, Yoon SM, Lee SY, Lee JS. A phase II trial of docetaxel plus capecitabine in patients with previously treated non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 761-767
- 19 Guastalla JP 3rd, Dieras V. The taxanes: toxicity and quality of life considerations in advanced ovarian cancer. *Br J Cancer* 2003; 89 Suppl 3: S16-22
- 20 Fossella FV. Overview of docetaxel (Taxotere) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 4-8

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 ●

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研究人员、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>。

体外循环状态下新生小型猪肝细胞的活性

张世昌, 王英杰, 陈志, 刘涛, 刘俊

张世昌, 王英杰, 陈志, 刘涛, 刘俊, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038
张世昌, 博士, 主管技师, 主要从事生物人工肝和肝组织工程的相关基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30470458

通讯作者: 王英杰, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街29号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所。
yingjiewang@yahoo.com

电话: 023-68754475-8062 传真: 023-68754475

收稿日期: 2007-06-19 修回日期: 2007-11-28

Preliminary study of the viability of neonatal mini-porcine hepatocytes in extracorporeal circulation

Shi-Chang Zhang, Ying-Jie Wang, Zhi Chen, Tao Liu, Jun Liu

Shi-Chang Zhang, Ying-Jie Wang, Zhi Chen, Tao Liu, Jun Liu, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30470458

Correspondence to: Ying-Jie Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University of Chinese PLA, 29 Gaotanyan Center Street, Shapingba District, Chongqing 400038, China. yingjiewang@yahoo.com

Received: 2007-06-19 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To observe the viability of neonatal mini-porcine hepatocytes in extracorporeal circulation.

METHODS: A hepatocyte circulation system was constructed with Cello artificial capillary culture equipment and freshly isolated hepatocyte suspensions were circulated at 50 mL/min *in vitro*. The viability, function and morphological characteristics of hepatocytes were examined within 8 hours.

RESULTS: After 4 hours circulation, the viability and adherence ratio of hepatocytes were $76.1\% \pm 1.4\%$ and $62.8\% \pm 1.8\%$, respectively, and the ratio of amino clearance was about $62.7\% \pm 14.6\%$ of that in the control group. However, with time, many fragments of hepatocytes were observed in the circulating suspensions, as

well as a significant increase in lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase ($P < 0.01$). The cell viability and adherence ratio, synthesis of urea and albumin, and the clearance rate of ammonia also decreased significantly ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Porcine hepatocyte suspensions can be applied to BAL system in a circulation condition in order to strengthen the mass exchange. However, these cells need to be changed regularly to maintain cellular viability and the supporting effects of BAL.

Key Words: Hepatocytes; Extracorporeal circulation; Minipig

Zhang SC, Wang YJ, Chen Z, Liu T, Liu J. Preliminary study of the viability of neonatal mini-porcine hepatocytes in extracorporeal circulation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3787-3792

摘要

目的: 观察体外循环状态下新生小型猪肝细胞的活性变化。

方法: 利用Cello培养循环式人工毛细管培养装置构建肝细胞循环系统, 以50 mL/min的流速循环乳猪肝细胞悬液, 分别观察循环8 h内肝细胞形态、活力和功能等的变化。

结果: 循环4 h后, 乳猪肝细胞的活力和贴壁率下降, 分别为 $76.1\% \pm 1.4\%$ 、 $62.8\% \pm 1.8\%$, 氨清除率是对照组的 $62.7\% \pm 14.6\%$, 继续观察发现, 随着循环时间的延长, 悬液中细胞碎片增多, LDH和AST显著升高($P < 0.01$), 细胞活力、贴壁率、白蛋白和尿素合成率、氨清除率等均显著下降($P < 0.05$)。

结论: 乳猪肝细胞悬液循环模式可用于生物人工肝BAL系统。

关键词: 肝细胞; 体外循环; 小型猪

张世昌, 王英杰, 陈志, 刘涛, 刘俊. 体外循环状态下新生小型猪肝细胞的活性. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3787-3792
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3787.asp>

■背景资料

肝功能衰竭是各种严重肝病的终末期表现, 在我国以十分常见的重型肝炎为其典型代表, 病情凶险, 预后极差, 病死率高达60%-80%。原位肝移植或部分肝移植是治疗肝功能衰竭公认的最有效的治疗手段。但由于健康供肝的短缺、昂贵的价格及需要终生应用免疫抑制剂等诸多原因, 大大地限制了原位肝移植在临床上的广泛应用。因此, 多年来, 国外学者长期致力于生物人工肝(BAL)的研究, 以期对肝功能衰竭患者等待肝移植或通过自身肝再生恢复提供过渡的“桥梁”。

■研发前沿

肝细胞是BAL的核心原材料, BAL对肝功能衰竭患者的肝支持作用几乎完全依赖于所用肝细胞的生物学功能. 用于BAL的肝细胞要求以大量、高活性、高密度培养, 并且容易获得, 能有效的发挥肝支持作用. 目前, 生物人工肝治疗肝衰竭过程中的最大困难是人工肝支持治疗时间受限, 一般实施时间为6-8 h, 为了给肝衰竭患者提供更强有力的肝支持, 希望生物人工肝治疗时间愈长愈好. 因此, 研究提供高活性和可随时更换肝细胞的方法已成为生物人工肝研究的热点.

0 引言

保持生物反应器内大量肝细胞的高活性和充分的物质交换是生物人工肝(BAL)治疗肝功能衰竭的关键之一^[1-3]. 目前研究较多并已应用于BAL临床研究的普通中空纤维型反应器^[4-7], 通过微囊包裹、被覆生物基质等方法能够承担大量培养和维持肝细胞高活性的重任^[7-13], 但同时增加营养物质弥散到肝细胞的阻力, 使肝细胞与肝功能衰竭患者血液之间物质交换受限. 有研究报道, 根据流体力学和生物流变学的原理, 肝细胞沿中空纤维管长轴流动, 可与相向流动的患者血浆进行充分的物质交换, 从而有效地提高物质交换效率^[14]. 但肝细胞不像红细胞那样可以任意变形流动, 循环对肝细胞形态和功能的影响尚需进一步观察. 我们利用Cello培养循环式人工毛细管培养系统构建肝细胞循环培养系统, 检测循环状态下肝细胞的形态和功能的变化, 评价循环对肝细胞的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 中国实验小型猪4只, 新生1-7 d, 雌雄不限, 无病原体感染, 由第三军医大学实验动物中心提供. 实验前4 h断乳, 清洁皮毛后备用. IV型胶原酶和台盼蓝由Sigma公司提供; 培养瓶、培养板和离心管为Nuculon公司产品; 小牛血清(NCS)和RPMI1640培养液购于Hyclone公司; Cello培养循环式人工毛细管培养系统购于美国Spectrum公司; 猪白蛋白ELISA检测试剂盒购自美国Bythyl公司, 尿素和氨检测试剂盒购自英国Randox公司.

1.2 方法

1.2.1 消化分离肝细胞: 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉新生中国实验小型猪. 常规方法皮肤消毒, 开腹, 暴露门静脉并注入肝素钠100-150 U. 游离肝脏, 于肝门处剪下取出, 先用前灌流液(含EDTA、无Ca²⁺、Mg²⁺的Hanks液)以80-100 mL/min的速度灌流10-15 min, 再用浓度0.5 g/L胶原酶液以50-70 mL/min的速度灌流10 min. 两种灌流液均保持在37℃-38℃. 灌流结束后, 用剪刀划破肝包膜, 剔除大块纤维结缔组织, 收集细胞悬液, 酌情再置37℃消化10-15 min. 用RPMI-1640培养液终止消化, 3层纱布过滤, 50 g、3 min离心, 洗涤肝细胞3-4次, 获得肝细胞. 台盼蓝拒染实验判断细胞活率>90%者用于实验.

1.2.2 观察肝细胞形态、活力、贴壁率、LDH、AST和细胞功能: 将新分离的肝细胞制成浓度 1×10^9 /L的肝细胞悬液, 并装入循环细胞池

中, 置37℃、50 mL/L CO₂、饱和湿度条件下, 50 mL/min循环8 h. 在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h时相点, 取细胞悬液, 其中0 h为循环前为对照组. 将各组细胞悬液, 稀释1倍分别接种6孔培养板, 置37℃培养箱培养8 h后, 在倒置相差显微镜(Olympus IX-70)下观察肝细胞形态变化. 同时将细胞悬液制成透射电镜标本, 在Philip TECNAI-10型透射电镜下观察肝细胞超微结构的变化. 将各组细胞悬液用台盼蓝拒染实验检测肝细胞活力. 同时接种6孔培养板, 置37℃培养箱培养4 h, 吸弃细胞培养液, 用胰酶消化贴壁细胞制成单个细胞悬液, 用血球计数板分别计数接种细胞数和贴壁细胞数. 根据以下公式计算细胞贴壁率: 细胞贴壁率(%) = (贴壁细胞数/接种细胞数) × 100%. 取2 mL细胞悬液, 离心取上清, 在日立-7020型全自动生化分析仪上检测各组肝细胞培养上清液中草酰乙酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)的水平. 循环肝细胞功能的检测: (1)用特异猪白蛋白抗体ELISA法和脲酶-波氏比色法分别检测收集上清中猪白蛋白和尿素含量. (2)用含5 mmol/L氯化铵无血清RPMI-1640培养液循环肝细胞悬液. 在循环的0 h、2 h、4 h、6 h、8 h后, 从循环系统中取出2 mL细胞悬液, 离心取上清, 用谷氨酸脱氢酶-紫外法检测上清中氨的浓度.

统计学处理 计量资料使用Excel2000和SPSS12.0统计学软件处理, 以mean ± SD表示, 并进行均数 t 检验或 μ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性.

2 结果

2.1 肝细胞形态 倒置相差显微镜观察, 循环2 h的肝细胞贴壁后的形态与对照组即未循环的肝细胞基本相同, 细胞碎片较对照组多, 可见少许漂浮细胞; 循环4 h的肝细胞有较多细胞贴壁, 但漂浮细胞开始增多, 细胞碎片变小; 循环6 h的肝细胞仍有较多细胞贴壁并呈集落状, 漂浮细胞明显增多, 细胞碎片小而多(图1A-D).

透射电镜观察, 对照组的肝细胞膜完整, 微绒毛丰富, 细胞内糖原颗粒丰富, 线粒体机构完整, 可见较多粗面内质网, 较少溶酶体(图2A-B); 循环4 h后细胞膜完整, 微绒毛丰富, 胞内糖原颗粒减少, 线粒体结构完整, 溶酶体增多, 部分细胞肿胀变性或开始蜕变(图2C-D); 循环8 h后正常细胞减少, 仍有较多完整的细胞, 胞膜基本完整, 微绒毛较少, 胞内普遍出现空泡且变大, 胞

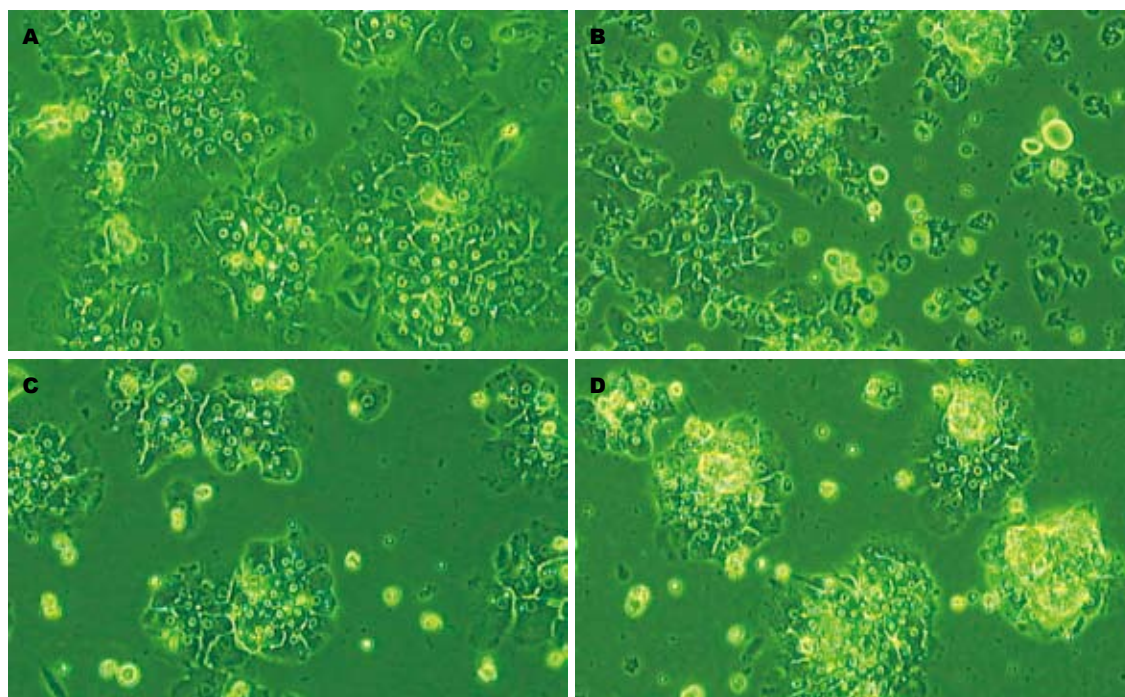


图 1 循环肝细胞培养8 h的细胞形态($\times 200$). A: 对照组; B: 循环2 h; C: 循环4 h; D: 循环6 h.

■相关报道

大多数研究表明单层培养肝细胞的功能随着培养时间延长逐渐下降, 特别是培养肝细胞的CYP活性和mRNA表达下降更为显著. 最近研究认为由于培养肝细胞为了恢复分离过程对肝细胞的损伤并适应新的微环境, 使编码细胞骨架和细胞外基质的基因表达上调, 而与之相应的编码代谢酶的基因表达下调, 导致培养肝细胞功能降低, 提示不贴壁的肝细胞悬液有可能具有更好的功能. Blanchard *et al*的研究认为肝细胞悬液在6 h内比单层培养的肝细胞具有更好地生物转化功能.

表 1 循环过程中肝细胞功能变化

项目	对照	循环时间(h)			
		2	4	6	8
ALB(ng/10 ⁶ cells•h)	436.8±49.7	292.9±106.2 ^a	154.6±46.5 ^a	51.6±42.7 ^a	27.9±6.3 ^a
BUN(umol/10 ⁶ cells•h)	367.1±88.5	187.3±79.3 ^a	133.4±37.6 ^a	26.7±25.9 ^a	32.5±24.7 ^a
AMM(umol/10 ⁶ cells•h)	185.7±27.9	181.1±67.1	116.3±27.2 ^a	37.0±23.7 ^a	19.5±13.0 ^a

^a $P<0.05$ vs 对照组.

质中有溶解灶, 糖原颗粒少见, 见部分线粒体肿胀, 溶酶体增多, 出现蜕变坏死的肝细胞(图2E-F).

2.2 肝细胞活力和贴壁率 循环2 h、4 h、6 h、8 h的肝细胞活力和贴壁率与对照组肝细胞相比有显著降低($P<0.01$), 并随着循环时间的延长而加剧, 8 h循环结束肝细胞的活力和贴壁率约50%左右(图3).

2.3 肝细胞LDH和AST漏出量 循环过程中肝细胞LDH和AST漏出量随着循环时间的延长而迅速升高, 循环2 h、4 h、6 h、8 h的肝细胞LDH和AST漏出量与循环前肝细胞相比有显著差异($P<0.01$), 在8 h循环结束时肝细胞LDH和AST漏出量高达循环前的3倍以上(图4).

2.4 肝细胞功能 与对照组的肝细胞相比, 循环肝细胞白蛋白和尿素合成率显著降低($P<0.05$), 循环时间越长下降的幅度越大, 循环4 h后肝细胞白蛋白和尿素合成率约为循环前的30%, 循环

8 h结束后, 白蛋白和尿素合成率降至循环前的10%以下. 循环2 h后的肝细胞氨清除率与对照组无显著差异, 循环4 h、6 h、8 h后的肝细胞氨清除率较对照组显著降低, 其中循环4 h后肝细胞氨清除率可达循环前的60%, 在循环8 h结束时仅为对照组的10%(表1).

3 讨论

双向物质传输是BAL必须具备的重要特征, 也是治疗肝功能衰竭患者的必备条件^[15]. 双向物质传输功能的欠缺, 将无法实现肝细胞对肝功能衰竭患者的人工肝支持治疗, 同样也不能对培养肝细胞进行营养补充以及保障其活性和功能. 目前, 已用于临床研究的BAL大多将肝细胞与肝功能衰竭患者血液通过半透膜加以阻隔^[16-19], 以增加临床应用的安全性. 从免疫阻隔的角度考虑, 这无疑是最优的方式, 但对双向物质传输而言, 则会增加液体弥散的阻力, 使一些重要物

■应用要点

本文提示, 循环8 h 的肝细胞仍具有较强的细胞功能, 说明将其应用于生物人工肝中发挥高效地双向物质转运的优势, 同时可以随时更换新的肝细胞悬液, 有利提高BAL的肝支持时间和支持效果.

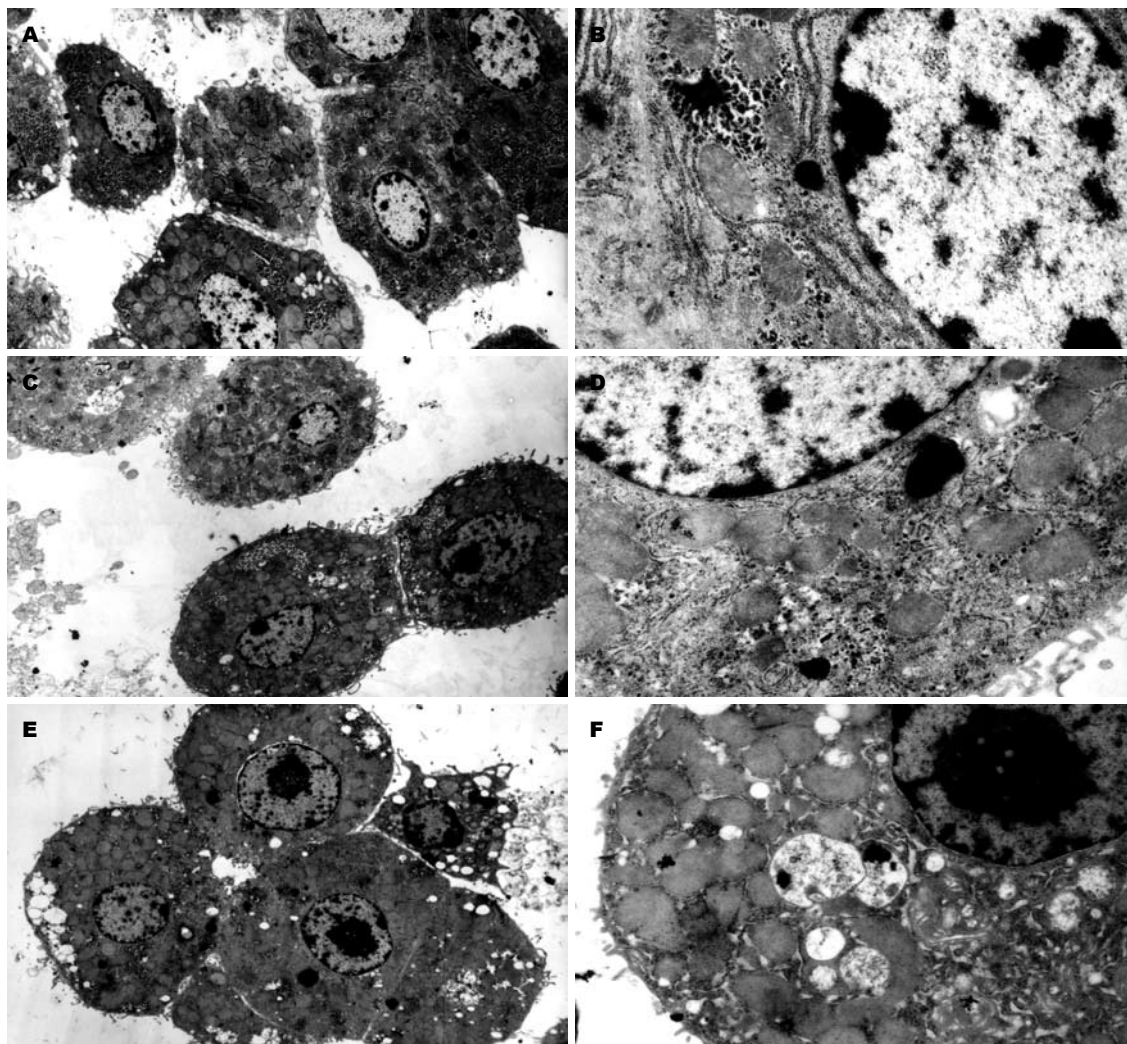


图2 循环肝细胞的超微结构(A, C, E $\times 2100$; B, D, F $\times 10\,000$). A-B: 对照组; C-D: 循环4 h; E-F: 循环8 h.

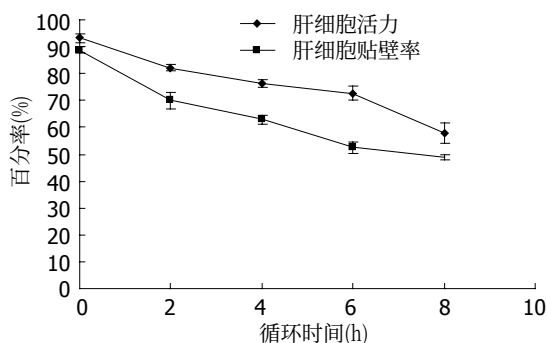


图3 循环对肝细胞活力和贴壁率的影响.

质的双向转运受到限制^[20-22]. Shi *et al*^[14]从流体力学及血液流变学的角度提出, 患者血液与生物反应器内肝细胞隔半透膜而流动最有利于双向物质传输. 但循环肝细胞悬液有可能使细胞受到较大的剪切力以及与管壁的机械摩擦及碰撞, 从而使细胞受损、功能下降.

正常肝脏有窦状间隙的内皮细胞和细胞外基质的保护, 肝细胞能够免受血液的剪切力作

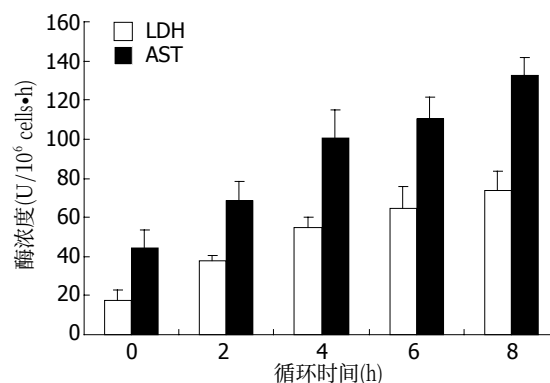


图4 循环过程中肝细胞LDH和AST的变化.

用, 而体外循环的肝细胞必须经受剪切力的作用. 剪切力对不同的细胞作用效果不同^[23-24], 高剪切力可使中性粒细胞形成DNA碎片、细胞膜磷脂酰丝氨酸暴露、功能下降, 导致中性粒细胞凋亡^[25], 而对内皮细胞抑制细胞凋亡并刺激细胞表面分子的表达^[26]. 本研究表明循环4 h 后肝细胞仍具有一定的活力和功能, 乳猪肝细

胞悬液循环模式可用于BAL系统, 以加强肝功能衰竭患者血浆与肝细胞的物质交换. 继续观察发现, 随着循环时间的延长, 细胞碎片增多, LDH和AST显著升高, 细胞活力、贴壁率、白蛋白和尿素合成率、氨清除率显著下降, 表明长时间循环对肝细胞有较大的损伤, 需定期更换肝细胞悬液, 以保持细胞活性和BAL的肝支持效果. Tilles *et al*^[27]的研究结果显示, 高剪切力作用下肝细胞功能迅速下降(这一点与本实验结果基本一致), 低剪切力作用下肝细胞功能维持稳定, 并显著高于高剪切力下肝细胞功能. 从中可以推测肝细胞损伤的主要原因可能是本研究中为了使肝细胞悬液能够循环, 使用了较高的循环速度, 产生较高的剪切力所致, 另一方面是循环的肝细胞与管壁的机械碰撞摩擦作用以及肝细胞通过脉冲泵受到的挤压作用, 共同造成肝细胞的机械损伤, 从而使有完整细胞功能的数量减少.

本研究发现, 循环8 h后存活的肝细胞大部分呈球形聚集, 提示在循环状态下, 肝细胞球形体有可能更有利于抵抗循环的损伤. 有报道认为, 在培养液流动产生低剪切力的条件下培养肝细胞, 可促使肝细胞聚集成球形体, 并具有稳定的功能^[28]. Kan *et al*^[29]研究也证实, 剪切力可以通过激活非实质肝细胞诱导细胞连接和分泌细胞外基质, 促进肝细胞相互聚集形成三维结构, 有利于抵抗剪切力的作用. 根据Fiegel *et al*^[30]的研究结果: 在流速为15 mL/min条件下, 可维持肝细胞数量的稳定并使肝细胞功能显著提高, 提示减慢循环速度可以减轻肝细胞数量和功能的丢失. 同时亦有研究显示适当持续的剪切力有利于保护肝组织的功能^[31]. 因此, 也许通过采用球形体循环和进一步降低循环培养的速度, 减少细胞的损伤, 发挥高效地双向物质转运的优势, 有利于更好地维持循环培养肝细胞活性和BAL的肝支持效果.

4 参考文献

- 1 Chamuleau RA, Poyck PP, van de Kerkhove MP. Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial* 2006; 10: 168-174
- 2 Poyck PP, Hoekstra R, Chhatta A, Bloemendaal LT, van Wijk AC, Galavotti D, van Gulik TM, Chamuleau RA. Time-related analysis of metabolic liver functions, cellular morphology, and gene expression of hepatocytes cultured in the bioartificial liver of the Academic Medical Center in Amsterdam (AMC-BAL). *Tissue Eng* 2007; 13: 1235-1246
- 3 Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T,

- Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 31: 148-151
- 4 Millis JM, Losanoff JE. Technology insight: liver support systems. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 398-405; quiz 434
- 5 Naruse K. Artificial liver support: future aspects. *J Artif Organs* 2005; 8: 71-76
- 6 Pless G, Sauer IM. Bioartificial liver: current status. *Transplant Proc* 2005; 37: 3893-3895
- 7 Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Muller AR, Steinmuller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 2003; 10: 460-469
- 8 Diekmann S, Glockner P, Bader A. The influence of different cultivation conditions on the metabolic functionality of encapsulated primary hepatocytes. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 192-198
- 9 Desille M, Mahler S, Seguin P, Malledant Y, Fremont B, Seville V, Bouix A, Desjardins JF, Joly A, Desbois J, Lebreton Y, Campion JP, Clrment B. Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med* 2002; 30: 658-663
- 10 Rahman TM, Selden C, Khalil M, Diakanov I, Hodgson HJ. Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model. *Artif Organs* 2004; 28: 476-482
- 11 David B, Dufresne M, Nagel MD, Legallais C. In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnol Prog* 2004; 20: 1204-1212
- 12 Ambrosino G, Varotto S, Stefano Basso SM, Galavotti D, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro G, Plebani M, Giron G, Abatangelo G, Donato D, Cestrone A, Marrelli L, Trombetta M, Lorenzelli V, Picardi A, Colantoni A, Van Thiel D, Ricordi C, D'Amico FD. Development of a new bioartificial liver using a porcine autologous biomatrix as hepatocyte support. *ASAIO J* 2002; 48: 592-597
- 13 Sun T, Chan ML, Quek CH, Yu H. Improving mechanical stability and density distribution of hepatocyte microcapsules by fibrin clot and gold nano-particles. *J Biotechnol* 2004; 111: 169-177
- 14 Shi Q, Mitteregger R, Falkenhagen D, Yu YT. A novel configuration of bioartificial liver support system based on circulating microcarrier culture. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 273-291
- 15 Adham M. Extracorporeal liver support: waiting for the deciding vote. *ASAIO J* 2003; 49: 621-632
- 16 van de Kerkhove MP, Poyck PP, Deurholt T, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg* 2005; 22: 254-264
- 17 Poyck PP, Pless G, Hoekstra R, Roth S, Van Wijk AC, Schwartlander R, Van Gulik TM, Sauer

■名词解释

生物人工肝(BAL): 将培养肝细胞置于体外循环装置(生物反应器)中, 当患者血液/血浆流过生物反应器, 通过半透膜或直接接触, 与培养肝细胞进行物质交换, 为肝功能衰竭患者提供肝脏支持功能.

■同行评价

本课题立题紧密
结合临床, 有一定的
创新性, 实验方法
正确, 条理清楚,
结论可靠, 具有
较强的学术价值。

- IM, Chamuleau RA. In vitro comparison of two bioartificial liver support systems: MELS CellModule and AMC-BAL. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 183-191
- 18 Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS 2nd, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239: 660-667; discussion 667-670
- 19 Monga SP, Hout MS, Baun MJ, Micsenyi A, Muller P, Tummalapalli L, Ranade AR, Luo JH, Strom SC, Gerlach JC. Mouse fetal liver cells in artificial capillary beds in three-dimensional four-compartment bioreactors. *Am J Pathol* 2005; 167: 1279-1292
- 20 Hay PD, Veitch AR, Smith MD, Cousins RB, Gaylor JD. Oxygen transfer in a diffusion-limited hollow fiber bioartificial liver. *Artif Organs* 2000; 24: 278-288
- 21 Samuel D, Ichai P, Feray C, Saliba F, Azoulay D, Arulnaden JL, Debat P, Gigou M, Adam R, Bismuth A, Castaing D, Bismuth H. Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 257-264
- 22 Ho Ye S, Watanabe J, Takai M, Iwasaki Y, Ishihara K. High functional hollow fiber membrane modified with phospholipid polymers for a liver assist bioreactor. *Biomaterials* 2006; 27: 1955-1962
- 23 Fernandez P, Bourget C, Bareille R, Daculsi R, Bordenave L. Gene response in endothelial cells cultured on engineered surfaces is regulated by shear stress. *Tissue Eng* 2007; 13: 1607-1614
- 24 Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J. Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G26-34
- 25 Green CE, Pearson DN, Camphausen RT, Staunton DE, Simon SI. Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity beta2-integrin on neutrophils. *J Immunol* 2004; 172: 7780-7790
- 26 Gaucher C, Devaux C, Boura C, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 37: 99-107
- 27 Tilles AW, Baskaran H, Roy P, Yarmush ML, Toner M. Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2001; 73: 379-389
- 28 Torok E, Pollok JM, Ma PX, Vogel C, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Kaufmann PM, Kluth D, Rogiers X. Hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor. *Dig Surg* 2001; 18: 196-203
- 29 Kan P, Miyoshi H, Yanagi K, Ohshima N. Effects of shear stress on metabolic function of the co-culture system of hepatocyte/nonparenchymal cells for a bioartificial liver. *ASAIO J* 1998; 44: M441-444
- 30 Fiegel HC, Havers J, Kneser U, Smith MK, Moeller T, Kluth D, Mooney DJ, Rogiers X, Kaufmann PM. Influence of flow conditions and matrix coatings on growth and differentiation of three-dimensionally cultured rat hepatocytes. *Tissue Eng* 2004; 10: 165-474
- 31 Torii T, Miyazawa M, Koyama I. Effect of continuous application of shear stress on liver tissue: continuous application of appropriate shear stress has advantage in protection of liver tissue. *Transplant Proc* 2005; 37: 4575-4578

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验, (2) 采集数据, (3) 分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章, (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析, (2) 获取研究经费, (3) 行政、技术或材料支持, (4) 指导, (5) 支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

脂联素随原代HSC活化表达的动态变化及其对原代HSC表达MMP-13的影响

于丹, 马红

于丹, 马红, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心 北京市 100050

于丹, 首都医科大学研究生, 从事肝纤维化发生机制的研究。

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

电话: 010-63138727

收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-11-28

Expression of adiponectin during hepatic stellate cell (HSC) activation and the effect of adiponectin on expression of matrix metalloproteinase-13 in primary HSCs

Dan Yu, Hong Ma

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

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

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To study trends in the expression of adiponectin during hepatic stellate cell (HSC) activation and the effects of adiponectin on mRNA and protein expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), which was closely related to liver fibrosis in primary HSCs.

METHODS: We isolated primary HSCs through improved two-step liver *in situ* perfusion, and investigated changes in expression of adiponectin during activation of primary HSCs. MTT was used to study the effect of adiponectin on proliferation of activated HSCs. We chose proper concentration of adiponectin and then divided primary HSCs into five groups according to the concentration of adiponectin. Real-time PCR was used to detect the difference of α -smooth muscle actin, adiponectin and MMP-13 expression between the groups. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the quantity of MMP-13 pro-

tein secreted into the medium.

RESULTS: The survival rate of HSCs showed a linear correlation with adiponectin concentration ($OR = 0.828$). Expression of adiponectin was down-regulated during HSC activation. Adiponectin was able to inhibit the proliferation of HSCs. When the concentration of adiponectin was 500 $\mu\text{g/L}$, MMP-13 mRNA expression, in contrast with that in the control group, increased by 5.54 times. MMP-13 protein expression in adiponectin-treated cells increased significantly in contrast with that in the control group (30.951 $\mu\text{g/L}$ vs 24.127 $\mu\text{g/L}$).

CONCLUSION: Expression of adiponectin was decreased during HSC activation. As a member of the adipokines, adiponectin can exert its potential anti-fibrotic activity through inhibition of HSC proliferation and up-regulation of expression of MMP-13 in primary HSCs.

Key Words: Hepatic stellate cell; Matrix metalloproteinase-13; Liver fibrosis; Real-time polymerase chain reaction; Enzyme linked immunosorbent assay

Yu D, Ma H. Expression of adiponectin during hepatic stellate cell (HSC) activation and the effect of adiponectin on expression of matrix metalloproteinase-13 in primary HSCs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3793-3797

摘要

目的: 探讨脂联素mRNA在原代肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化过程中表达的变化趋势, 以及其对体外培养的原代HSC增殖状况和金属基质蛋白酶-13(MMP-13) mRNA与蛋白表达的影响。

方法: 改良的肝脏二步原位灌注法分离培养原代HSC; 以 α -SMA为原代HSC活化的标志, Real-time PCR方法检测随HSC活化脂联素表达的动态变化; MTT方法检测脂联素对活化HSC增殖的影响, 以外源性脂联素处理原代

■背景资料

脂联素是脂肪因子的一种, 他除了能够促进糖和脂肪代谢之外还具有抗炎、增敏胰岛素和抗动脉粥样硬化等功能。静息态的HSC表达脂联素mRNA, 脂联素对于维持HSC的静息状态具有重要作用, 大量体外试验及动物试验均发现脂联素通过抑制促纤维化形成因子合成, 而发挥抑制纤维化形成的作用; 而临床试验结果却得到不同的结果, 因此脂联素对肝纤维化的作用还需进一步研究证实。

■研发前沿

近年来人们发现肝脏中与肝纤维化密切相关的HSC也能表达脂联素,因此对于脂联素与肝纤维化的研究成为了研究的又一热点。

HSC, 根据脂联素浓度, 分为对照组, 脂联素处理浓度62.5 $\mu\text{g/L}$, 125 $\mu\text{g/L}$, 250 $\mu\text{g/L}$, 500 $\mu\text{g/L}$ 五组, Real-time PCR方法检测MMP-13 mRNA表达; ELISA方法检测原代HSC分泌的MMP-13蛋白量。

结果: HSC存活率的下降与脂联素浓度呈线性相关($OR = 0.828$)。MMP-13 mRNA和蛋白表达水平与外源性加入脂联素浓度正相关, 当脂联素浓度增加至500 $\mu\text{g/L}$ 时, MMP-13 mRNA表达增高至对照组的5.54倍, MMP-13含量增加至30.951 $\mu\text{g/L}$ 显著高于对照组的24.127 $\mu\text{g/L}$, 差异具有显著统计学意义。

结论: 脂联素具有抑制肝纤维化的作用, 其机制可能与抑制HSC增殖和增强MMP-13在HSC细胞的表达有关。

关键词: 肝星状细胞; 基质金属蛋白酶-13; 肝纤维化; 实时荧光聚合酶链反应; 酶联免疫吸附反应

于丹, 马红. 脂联素随原代HSC活化表达的动态变化及其对原代HSC表达MMP-13的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3793-3797

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3793.asp>

0 引言

脂联素是在脂肪组织中特异表达的脂肪因子。静息态的HSC可以表达脂联素, 而活化的HSC不表达脂联素^[1-2]。有研究发现, 脂联素可以维持HSC的静息状态, 使已经活化的HSC重新逆转为静息状态; 还能够抑制血小板衍生生长因子(PDGF)诱导的HSC增生和转移, 减弱转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)的作用, 并可以减少TGF $\beta 1$ 与结缔组织生长因子(CTGF)的基因表达^[3], 这些均提示脂联素可能对肝纤维化具有调节作用, 本实验通过检测脂联素随原代HSC活化表达的动态变化和外源性脂联素处理活化的HSC, 观察其对HSC增殖的影响以及对MMP-13基因和蛋白表达的影响, 观察脂联素对直接影响肝纤维化形成因子的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 成年洁净级 δ Wistar大鼠, 体质量400-500 g, 购自首都医科大学动物室, 普通饲料喂养, 自由饮食; 蛋白酶E, IV型胶原酶购自Sigma公司, Nycodenz购自Sigma公司, DMEM培养基干粉和胎牛血清购自Gibco公司, 脂联素购自Cayman公司, TRIzol RNA提取试剂购

自Invitrogen公司, M-MLV和Oligo(dT)反转录酶和RNase inhibitor购自Promega公司, SYBER GREEN MIX购自ABI公司, ELISA试剂盒购自ALD公司, 紫外凝胶成像仪(BIO RED), PCR仪(Eppendorf), 分光光度计(Amersham Biosciences), 荧光定量PCR仪(ABI, 7300)。

1.2 方法

1.2.1 改良的原位肝脏灌注法分离原代HSC: 体质量约500 g的成年 δ Wistar大鼠, 无菌条件下, 门脉插管, 以D-HANK'S灌注冲洗, 同时将肝脏游离、悬挂。灌入含0.5 g/L IV型胶原酶和10 g/L蛋白酶E的D-HANK'S液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 消化肝脏; 去除筋膜等结构, 并转入含0.5 g/L IV型胶原酶和0.1 g/L蛋白酶E的D-HANK'S液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 振荡消化。细胞悬液经过200 μm 细胞筛, 离心, DMEM冲洗2-3遍后, 180 g/L Nycodenz梯度离心。取中间云雾状细胞层, 至DMEM中离心冲洗后培养于含200 mL/L FBS的DMEM培养基。

1.2.2 MTT: 取处于对数生长期的HSC-T6接种于96孔培养板中(细胞数为每孔 5×10^3 个), 每孔200 μL 培养24 h后, 换无血清加入脂联素浓度大小分为62.5 $\mu\text{g/L}$, 125 $\mu\text{g/L}$, 250 $\mu\text{g/L}$, 500 $\mu\text{g/L}$, 1000 $\mu\text{g/L}$, 2000 $\mu\text{g/L}$, 4000 $\mu\text{g/L}$ 中, 每浓度设平行孔6个, 加入MTT, 孵育4 h后, 用DMSO溶解, 于酶标仪检测A值, 计算药物的体外生长细胞存活率。

1.2.3 Real-time PCR和ELISA方法: TRIzol法抽提RNA, 逆转录。采用SYBR green染料法进行相对定量检测待检指标。检测指标引物序列见表1。溶解曲线检测二聚体保证试验结果可靠性。每个样本6瓶重复, 整个实验重复三次。ELISA方法检测HSC细胞培养上清中MMP-13的含量。

统计学处理 应用SPSS11.5软件, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 分离的原代HSC 分离的原代HSC经荧光显微镜下, 327 nm紫光激发, 可见蓝绿色自发荧光, 确定细胞性质为HSC; 台盼蓝染色HSC细胞存活率大于90%(图1)。

2.2 脂联素对活化的HSC增殖的作用 活化的HSC随脂联素浓度增高, 存活率明显下降。当脂联素浓度增高至1000 $\mu\text{g/L}$ 时, HSC细胞存活率为对照组的88%($P < 0.05$), 并且HSC存活率的下降与脂联素浓度呈线性相关($OR = 0.828$)。当脂

表 1 Real-time PCR试验中, 不同检测指标的引物序列

检测指标	上游引物	下游引物
GAPDH	ccatcactgccactcagaaga	atactatggggtaggaacag
adiponectin	tggtcacaatgggataccg	cccttaggaccaagaacacct
α -SMA	ggtgaaactctgggagatcct	aatggcatctctgtgtcaacc
MMP-13	ggacaagcagctccaagg	ggtccagaccgaggaggt

脂素浓度增加至2000 $\mu\text{g/L}$ 以上时, 细胞存活率降低为对照组的84%以下($P<0.01$)(图2).

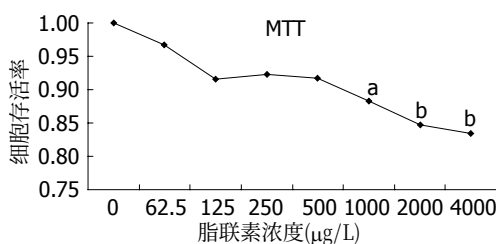
2.3 Real-time PCR和ELISA分别检测脂联素的表达以及MMP-13的蛋白合成量 根据MTT结果, 选取细胞存活率大于90%的脂联素浓度, 作为外源性干预因素处理HSC. 以 α -SMA为HSC活化的标志, 观察随着原代HSC活化, 脂联素mRNA表达的动态变化. 随原代HSC培养天数增加, α -SMA表达逐渐增高, HSC逐渐由静息态转变为活化状态(图3A). 脂联素的表达随 α -SMA的升高进行性降低, 当培养3 d时, 脂联素的表达下降为对照组的30%($P<0.01$), 并且随培养时间延长, 脂联素的表达继续下降, 当培养7 d, 即HSC完全活化后, 脂联素的表达仅为对照组的7%($P<0.01$)(图3B). 以外源性脂联素处理原代HSC, 当脂联素浓度为62.5 $\mu\text{g/L}$ 时, MMP-13 mRNA表达即增长为对照组的2.11倍($P<0.05$), 并且随着脂联素浓度增加, MMP-13的表达增高更加显著, 当脂联素浓度增加至500 $\mu\text{g/L}$ 时, MMP-13 mRNA表达增高至对照组的5.54倍($P<0.01$), MMP-13表达增高的倍数与加入脂联素的浓度正相关(图3C). 细胞培养上清中MMP-13的蛋白含量与脂联素浓度呈正相关, 即MMP-13含量随脂联素浓度增大而增高. 当脂联素浓度增高至500 $\mu\text{g/L}$ 时, MMP-13含量显著高于对照组(30.951 $\mu\text{g/L}$ vs 24.127 $\mu\text{g/L}$, $P<0.05$, 图3D).

3 讨论

肝纤维化是各种病因对肝脏慢性、重复性的损伤所引起的肝脏病理改变^[4]. HSC的活化与转型在肝纤维化的发生中处于中心地位^[5], 活化的HSC能够表达多种细胞因子及受体大量增殖, 大量合成ECM, 表达平滑肌 α -肌动蛋白(α -smooth muscle atine, α -SMA), 并具有收缩功能^[6-7]; 近年来研究表明, HSC还能生成少量基质金属蛋白酶及其抑制剂参与ECM的产生和降解^[8-9], 基质金属蛋白酶(MMPs)与基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)相互作用失衡, 最终导致ECM在肝内过



图 1 荧光显微镜下的原代HSC.

图 2 脂联素对HSC增殖的影响. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

度沉积的结果^[10-12]. 因此促进HSC的凋亡, 一方面HSC数量的减少使ECM分泌减少, 另一方面使活化的HSC分泌的金属蛋白酶抑制剂减少, 促进ECM的降解^[13-14]. MMP-13是大鼠肝脏中活化的HSC、成纤维细胞和Kupffer细胞分泌的最重要的酶, 是I型、III型胶原的主要降解酶^[15]. 动物实验显示, 在肝纤维化形成过程中, MMP-13水平下降, 活性降低, 从而不能有效降解沉积的间质胶原, 导致ECM过度沉积而发生纤维化.

脂联素是脂肪组织中特异表达的脂肪因子. 过氧化物酶激活物增殖受体 γ (PPAR γ)能够调节脂联素基因的转录活性, PPAR的配体能够增加脂联素的mRNA表达和血清脂联素水平^[16-17], 脂联素存在AdipoR1与AdipoR2两种受体^[18], 脂联素通过与两种受体结合发挥增敏胰岛素^[19-20], 抗动脉粥样硬化^[21], 以及抗炎作用^[22-24]. 脂联素还能够促进肝细胞内的脂肪酸氧化, 降低脂肪细胞中脂肪酸的产生, 防止肝细胞中甘油三酯聚

■创新盘点

本文首次报道了脂联素mRNA随HSC活化表达变化进行性减少的过程, 还选取MMP-13作为检测指标, 预测脂联素具有抑制肝纤维化的作用, 得出脂联素能够促进HSC中MMP-13的基因及蛋白表达, 但是还需进一步研究脂联素对其他ECM降解酶的作用, 以全面阐述脂联素与肝纤维化的关系.

■应用要点

脂联素能够促进HSC中MMP-13的mRNA及蛋白表达,提示脂联素可能具有潜在的抗纤维化作用,进一步深入研究脂联素与肝纤维化的关系,以及脂联素发挥抗纤维化作用的信号转导通路,可能为治疗肝纤维化提供新的思路。

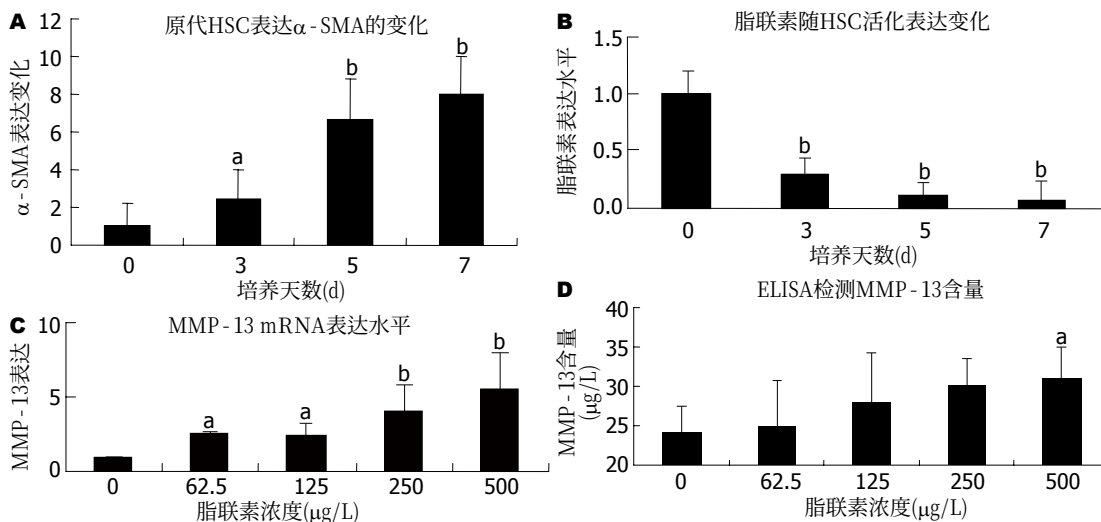


图3 脂联素的表达, MMP-13 mRNA和蛋白合成量的变化。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

集,其中高分子量脂联素主要发挥增敏胰岛素和抗炎的作用^[25-26]。

肝脏中静息态的HSC也可表达脂联素,但脂联素在活化的HSC中并不表达,其具体变化过程未见报道。本实验以 α -SMA作为原代HSC活化的标志,首次对HSC活化过程中脂联素表达的动态变化进行检测,发现脂联素的表达水平随HSC的活化,进行性减少。目前对于脂联素和肝纤维化的关系,报道还很少,根据已有报道,脂联素可以维持HSC的静息状态,使已经活化的HSC重新逆转为静息状态; Kamada *et al*^[3]发现脂联素能够通过抑制促肝纤维化形成因子的合成而抑制肝纤维化。但是临床研究却得出不同的结论, Tietge *et al*^[27]研究发现血清脂联素仅与肝功能下降和肝的血流动力学有关。Kaser *et al*^[28]认为肝硬化时脂联素水平升高是慢性肝病时机体一种抗炎机制的反映。

为了明确脂联素对肝纤维化形成的直接作用,我们以外源性脂联素处理HSC,观察其对活化的HSC增殖的影响,发现脂联素能够抑制活化HSC的增殖,并且这种抑制作用与脂联素的浓度呈正相关,这与Ding *et al*报道的脂联素促进活化的HSC凋亡的结论一致。我们还检测了脂联素对肝脏中降解ECM重要的蛋白酶MMP-13的表达,发现其能够上调HSC中MMP-13 mRNA表达,并促进HSC合成MMP-13,也提示脂联素潜在的抗肝纤维化作用。

本次实验仅选取MMP-13作为检测指标,预测脂联素具有抑制肝纤维化的作用,虽得出脂联素能够促进HSC中MMP-13的基因及蛋白表达,但是并没有探讨脂联素与其他蛋白酶,

及其抑制因子以及胶原表达与沉积的相互作用和作用机制,因此我们还需进一步研究以客观认识脂联素在肝纤维化及其他慢性肝病中发挥的作用。

4 参考文献

- 1 Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-26749
- 2 Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669
- 3 Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796-1807
- 4 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 5 蒋业贵, 李兆申. 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1443-1446
- 6 Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32: 32-38
- 7 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001; 42: 1-8
- 8 Schlaf G, Schmitz M, Heine I, Demberg T, Schieferdecker HL, Gotze O. Upregulation of fibronectin but not of entactin, collagen IV and smooth muscle actin by anaphylatoxin C5a in rat hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1165-1174
- 9 Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic

- stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005; 41: 1074-1084
- 10 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826
 - 11 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
 - 12 Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
 - 13 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
 - 14 Batailler R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
 - 15 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-G249
 - 16 Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003; 52: 1655-1663
 - 17 Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 293-300
 - 18 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
 - 19 Pereira RI, Draznin B. Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway leads to decreased insulin-stimulated adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* 2005; 54: 1636-1643
 - 20 Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947-953
 - 21 Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257: 167-175
 - 22 Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102: 1296-1301
 - 23 Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology* 2005; 146: 3334-3342
 - 24 Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 630-635
 - 25 Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278: 40352-40363
 - 26 Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 2002; 277: 29359-29362
 - 27 Tietge UJ, Boker KH, Manns MP, Bahr MJ. Elevated circulating adiponectin levels in liver cirrhosis are associated with reduced liver function and altered hepatic hemodynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E82-E89
 - 28 Kaser S, Moschen A, Kaser A, Ludwiczek O, Ebenbichler CF, Vogel W, Jaschke W, Patsch JR, Tilg H. Circulating adiponectin reflects severity of liver disease but not insulin sensitivity in liver cirrhosis. *J Intern Med* 2005; 258: 274-280

■同行评价
本文思路较好, 设计合理, 图片清晰, 有一定的可读性。

编辑 程剑侠 电编 何基才

降脂益肝冲剂对NASH大鼠肝脏抵抗素mRNA表达的影响

杨文慧, 赵和平, 段晓燕, 刘婷, 葛姝囡

■背景资料
研究发现约20%的NASH可进展为肝硬化, 其中30%-40%死于肝相关疾病, 部分发生亚急性肝功能衰竭和肝细胞肝癌。目前认为其与代谢综合征密切相关, 属于代谢综合征的肝脏表现。但其发病机制尚不明确, 临床上仍缺乏有效的治疗手段。

杨文慧, 段晓燕, 刘婷, 葛姝囡, 山西医科大学 山西省太原市 030001

赵和平, 山西医科大学第一临床附属医院综合科 山西省太原市 030001

杨文慧, 山西医科大学硕士研究生, 主要从事脂肪肝临床及实验研究。

通讯作者: 赵和平, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一临床附属医院综合科. zhpyx168@126.com

电话: 0351-4639468

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-11-28

Effect of Jiangzhi Yigan Chongji on resistin mRNA in the liver of rats with non-alcoholic steatohepatitis

Wen-Hui Yang, He-Ping Zhao, Xiao-Yan Duan, Ting Liu, Shu-Nan Ge

Wen-Hui Yang, Xiao-Yan Duan, Ting Liu, Shu-Nan Ge, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

He-Ping Zhao, General Department, the First Clinical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Professor He-Ping Zhao, General Department, the First Clinical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. zhpyx@126.com

Received: 2007-09-12 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To explore the effects of resistin in the pathogenesis of a rat model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and to observe the effect of Jiangzhi Yigan Chongji on resistin mRNA in the liver of that model, to explore its mechanism of action.

METHODS: 24 male Wistar rats were randomly divided into three groups (eight rats in each): normal group fed with standard diet, model group, and treated group fed with a high-fat diet. The treated group was given Jiangzhi Yigan Chongji (1 mL/100 g, its concentration is 0.8 g/mL, twice daily) by intragastric administration after 12 weeks. Meanwhile, the normal and model groups were separately given drinking water by the same means. After 17 weeks, they were killed. Resistin mRNA in the liver of the

rat model of NASH induced by high-fat diet was detected with RT-PCR. Level of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) was detected by an automatic biochemistry analyzer; fasting blood glucose (FBG) was detected by glucose oxidase method; and tumor necrosis factor α (TNF- α) and fasting insulin (FINS) in serum were detected by radioimmunoassay. Degrees of steatosis and steatohepatitis were observed.

RESULTS: A positive correlation was found between mRNA expression of resistin and TNF- α , ALT and AST, and the degree of steatohepatitis ($r = 0.873, 0.772, 0.716$ and $0.892, P < 0.05$) in the model group, but had no correlation with ISI. The relative level of resistin mRNA in the liver tissue of the model group (2.14 ± 0.11) was significantly higher than that in the normal group (0.42 ± 0.08), and that in the treated group (0.90 ± 0.06) was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Resistin may play an important role in the damage of NASH. Jiangzhi Yigan Chongji can significantly decrease the expression of resistin mRNA in liver tissue of NASH rats, and resistin may be a pharmacological target.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Jiangzhi Yigan Chongji; Resistin; Rat; Reverse transcription polymerase chain reaction

Yang WH, Zhao HP, Duan XY, Liu T, Ge SN. Effect of Jiangzhi Yigan Chongji on resistin mRNA in the liver of rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3798-3802

摘要

目的: 观察降脂益肝冲剂对非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)大鼠肝脏抵抗素mRNA表达的影响, 并探讨抵抗素在大鼠NASH发病机制中的作用。

方法: 24只♂ Wistar大鼠随机分为3组: 正常组普通饲料喂养, 模型组和治疗组高脂饮食

喂养. 治疗组在高脂饮食12 wk后给予降脂益肝冲剂, 同时模型组和正常组给予等量的生活饮用水灌胃, 17 wk末处死各组大鼠. 观察动物一般情况, 肝组织脂肪变性及炎症活动程度, 测定血清TNF- α 、ALT、AST, 空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS), 并计算胰岛素敏感指数(ISI); RT-PCR法检测肝组织抵抗素mRNA相对含量.

结果: 在正常肝脏组织探测到抵抗素mRNA的微量表达(0.42 ± 0.08), 模型组其表达量显著升高(2.14 ± 0.11 , $P < 0.01$), 与模型组相比治疗组则显著下降(0.90 ± 0.06 , $P < 0.01$). 模型组抵抗素水平与血清TNF- α 、ALT、AST水平、肝脏炎症活动度计分成显著正相关($r = 0.873$, 0.772 , 0.716 , 0.892 , $P < 0.05$), 与ISI无相关. 治疗组上述各项指标均得到显著改善.

结论: 抵抗素与反映肝脏炎症程度及肝功能的指标密切相关, 可能在NASH的发病中起重要作用. 降脂益肝冲剂对NASH有很好的疗效, 抵抗素是其可能的作用靶点.

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 降脂益肝冲剂; 抵抗素; 大鼠; 逆转录聚合酶链反应

杨文慧, 赵和平, 段晓燕, 刘婷, 葛姝因. 降脂益肝冲剂对NASH大鼠肝脏抵抗素mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3798-3802
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3798.asp>

0 引言

抵抗素是一种富含半胱氨酸的分泌性蛋白, 因其可影响与胰岛素作用相关的葡萄糖代谢以及脂代谢, 具有对抗胰岛素的作用而被命名. 新近研究表明他还可作为促炎因子参与炎症的级联反应, 与NASH的发病关系密切. 为此, 本研究采用高脂胆固醇饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型, 观察其肝组织中抵抗素mRNA的表达情况, 对抵抗素在NASH发病机制中的作用进行初步探讨; 同时观察降脂益肝冲剂对肝组织抵抗素mRNA表达的影响, 探讨其可能的分子治疗机制, 为其更广泛的临床应用提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物及饲料配制: (1)选用体质量为160-210 g的清洁级 δ Wistar大鼠24只. 由山西医科大学生制实验室提供. (2)普通饲料: 玉米面35.45%, 白面29.55%, 麸皮12.5%, 豆粉12%, 鱼粉8%, 酵母粉2% (g/100 g)等. 高脂饲料^[1]: 由85%的

普通饲料, 13%的猪油和2%的胆固醇组成. 胆固醇, 成都科龙化工试剂厂产品; 降脂益肝冲剂由丹参、泽泻、何首乌、茯苓、草决明、山楂等18味中药组成, 为无糖颗粒型制剂, 由山西医科大学第一医院生产并提供; 葡萄糖试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司, 胰岛素和TNF- α 测定试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司, 游离脂肪酸(FFA)测试盒购自南京建成生物工程公司, RT-PCR试剂盒购自立陶宛Fermentas公司; PCR引物由上海生物工程公司合成.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备和药物剂量: 将24只大鼠随机分为3组, 每组8只. 正常对照组喂普通饲料, 模型组和治疗组喂高脂饲料. 实验动物自由饮水, 分笼(每笼4只)饲养于(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的动物实验室内. 每天8:00 am-8:00 pm为采光时间, 8:00 am-9:00 am, 4:00 pm-5:00 pm为喂食和给药的时间. 实验第13周开始给予降脂益肝冲剂1 mL/100g, 以0.8 g/mL的浓度溶解ig, 每日2次, 共5 wk. 药物剂量按徐叔云 *et al*^[2]主编“药制实验方法学”计算, 公式: $\text{dB} = \text{dA} \times \text{RB} / \text{RA} \times (\text{WA} / \text{WB})^{1/3}$; [dA, dB分别为人, 大鼠的每公斤体质量剂量(mg/kg), RA, RB分别为人, 大鼠的体形系数(查表可得), WA, WB分别为人, 大鼠的体质量(kg)值]. 按成年人60 kg体质量的剂量(40 g/d)计算出大鼠的药物剂量, 每周根据体质量调整一次剂量. 同时模型组和正常组分别给予等量的生活饮用水ig, 每日2次.

1.2.2 标本采集和处制: 饲养满17 wk, 自由饮水, 禁食12 h后用100 g/L的水合氯醛0.35 mL/100 g体质量经腹腔内注射麻醉后开腹, 腹主动脉取血, 3000 r/min离心15 min分离血清; 迅速取出肝脏, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中反复漂洗, 然后用匀浆器制备匀浆, 1 g肝组织加入9 mL 8.6 g/L NaCl溶液, 经4000 r/min离心10 min后取上清液即为10%的大鼠肝匀浆; 另称取0.1 g肝左叶置于1.5 mL EP管, 均保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用. 取肝左叶, 于40 g/L的多聚甲醛中固定24-48 h, 自来水冲洗24 h, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋切片, 常规HE染色, 光镜下观察肝组织病理变化.

1.2.3 检测方法: 葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG), 放免法测定血清空腹胰岛素(FINS)并计算胰岛素敏感指数($\text{ISI} = \ln[1/(\text{FINS} \times \text{FBG})]$); 放免法测定TNF- α 水平; ALT、AST在全自动生化分析仪(Olympus Au1000)上测定. RT-PCR法检测肝脏抵抗素mRNA表达: (1)按TRIzol试剂盒说

■研发前沿
脂肪细胞因子在其发病机制中的作用日益受到关注, 瘦素、脂联素已发现在肝脏中表达, 抵抗素有成为又一种可在肝脏探及并与NASH发病密切相关的脂肪细胞因子.

■创新盘点

本实验中模型组抵抗素水平与血清TNF- α 、ALT、AST水平、肝脏炎症活动度计分成显著正相关,与胰岛素抵抗无相关。

表 1 各组大鼠血清TNF- α 、ALT、AST、FBS、INS和ISI的变化($n=8$, mean $\pm$ SD)

分组	TNF- α (μ g/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	FBS(mmol/L)	INS(μ U/mL)	ISI
正常组	0.72 $\pm$ 0.14	37.67 $\pm$ 7.17	125.00 $\pm$ 19.70	7.21 $\pm$ 0.92	25.62 $\pm$ 4.61	-5.20 $\pm$ 0.21
模型组	2.37 $\pm$ 0.35 ^b	110.50 $\pm$ 25.65 ^b	273.50 $\pm$ 27.49 ^b	12.98 $\pm$ 4.61 ^b	51.31 $\pm$ 9.38 ^b	-6.42 $\pm$ 0.46 ^b
治疗组	1.69 $\pm$ 0.29 ^{bd}	77.50 $\pm$ 16.11 ^{bd}	226.17 $\pm$ 17.79 ^{bd}	8.50 $\pm$ 2.85 ^{bc}	38.68 $\pm$ 5.06 ^{bc}	-5.75 $\pm$ 0.42 ^c

^b $P<0.01$ vs 正常组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 模型组。

明书从大鼠肝脏中提取总RNA; (2)AMV反转录合成cDNA第一链; (3)PCR扩增: resistin上游引物: 5-CCAGAAGGCACAACCGTCACTA-3; 下游引物5-TCAACCGTCCTCAGGAACCAA-3; PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 37个循环后, 72 $^{\circ}$ C继续延伸10 min, 产物为154 bp. GAPDH上游引物: 5-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3, 下游引物5-AGATCCGAACGGATACATT-3, PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环后, 72 $^{\circ}$ C继续延伸10 min, 产物为308 bp; (4)PCR产物分析: PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(0.5 mg/L)染色后于Tanon Gis 2010图像分析仪扫描分析. 目标基因mRNA的相对含量用目标基因与GAPDH吸光度值 $\times$ 面积的比值表示. (5)用多聚甲醛固定肝组织, 经石蜡包埋, 5 μ m连续切片, 常规苏木精-伊红染色, 光镜下评估脂肪变性程度及计算炎症活动度计分. 肝细胞脂肪变性程度判断标准^[3], 以肝小叶内未见脂滴肝细胞为阴性, 脂滴肝细胞占肝细胞总数小于1/3为+, 1/3-2/3为++, 大于2/3为+++, 几乎均呈脂滴肝细胞为++++. 炎症活动度计分^[4]: 按汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑坏死(PN)及桥接坏死(BN, 包括多小叶坏死)四项指标, 再依病变程度分别计为1、2、3、4分, 因BN、PN的严重度与病变活动度和预后直接相关, 故在计时加倍, 计分公式为: P+L+2(PN+BN).

统计学处理 计量资料用mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析及LSD- t 检验, 等级资料采用秩和检验, 参数间进行Pearson相关分析, 采用SPSS13.0软件处理, $P<0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 一般情况 普通饮食大鼠行动活跃, 被毛整洁, 细密, 柔顺; 高脂饮食组大鼠行动迟缓, 但易激惹; 且模型组大鼠与治疗组相比, 被毛散乱, 粗糙, 缺乏光泽。

表 2 肝脏脂变及炎症活动度

分组	n	肝脂肪变性的程度					炎症活动度计分
		-	+	++	+++	++++	
正常组	8	8	0	0	0	0	0
模型组	8	0	0	1	2	5	7.75 $\pm$ 1.98 ^b
治疗组	8	0	1	4	2	0	2.57 $\pm$ 0.98 ^d

^b $P<0.01$ 模型组 vs 正常组, ^d $P<0.01$ vs 模型组。

2.2 各组大鼠血清TNF- α 、ALT、AST水平的变化 模型组血清TNF- α 、ALT、AST较正常组显著升高(P 值均 <0.01)。与模型组相比, 治疗组TNF- α 、ALT、AST显著下降(P 值均 <0.01)(表1)。

2.3 各组大鼠FBS、INS和ISI水平的变化 模型组与正常组相比FBS、INS明显升高(P 均 <0.01), ISI明显下降($P<0.01$), 用药组与模型组相比FBS、INS明显降低(P 分别 <0.05 和 <0.01), ISI明显升高($P<0.01$)(表1)。

2.4 各组大鼠肝组织抵抗素mRNA表达结果 正常组肝脏可探测抵抗素mRNA的微量表达(0.42 $\pm$ 0.08), 模型组其相对表达量显著升高(2.14 $\pm$ 0.11, $P<0.01$), 与模型组相比, 治疗组抵抗素mRNA的相对表达量显著降低(0.90 $\pm$ 0.06, $P<0.01$), 但仍较正常组偏高($P<0.01$)(图1, 表2)。

2.5 各组大鼠肝组织变化

2.5.1 大体形态观察: 正常组大鼠肝脏呈紫红色, 质地柔软, 被膜光滑, 边缘锐利, 切面光洁, 与周围无粘连; 模型组大鼠肝脏体积明显增大, 呈黄褐色, 被膜紧张, 边缘饱满, 质地稍韧, 与周围组织粘连, 不易分离, 切面有油腻感; 治疗组大鼠肝脏轻度肿大, 呈较浅淡的黄褐色, 被膜较光滑, 边缘较锐利, 切面较光洁, 质地较正常组略差。

2.5.2 组织病理学改变: HE染色光镜下观察, 正常组肝小叶结构完整, 肝细胞呈多边形, 围绕中央静脉呈放射状, 肝窦清晰可见, 肝索排列整齐; 模型组大鼠肝组织弥漫性脂肪变, 小叶结构不清, 界限消失, 肝索排列紊乱, 小叶内和汇管区

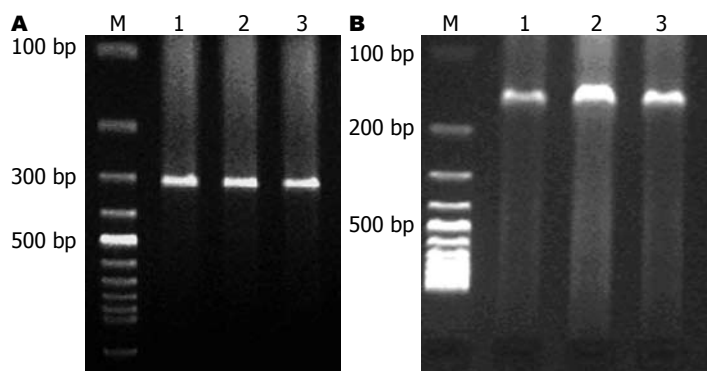


图 1 NASH大鼠肝脏抵抗素mRNA表达。M: DNA Marker; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 治疗组; A: GAPDH(308 bp); B: resistin(154 bp)。

■应用要点
本实验用高脂加胆固醇饮食复制的实验性大鼠NASH模型, 与人类NASH的发病经过相似, 故所研究理论易于推广应用于人类, 从而提供了有效治疗NASH的中成药。

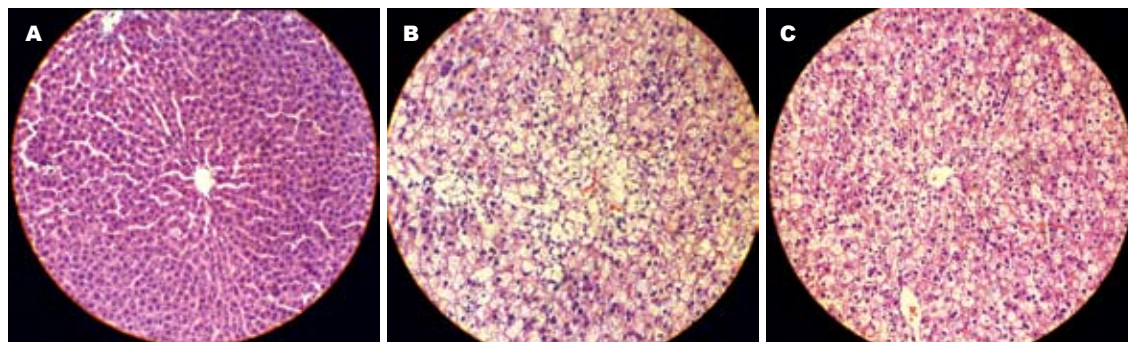


图 2 肝组织(HE × 300). A: 正常组; B: 模型组; C: 治疗组。

不同程度的炎症细胞浸润和坏死; 治疗组大鼠仍可见条索状排列的肝细胞, 脂变程度较模型组明显减轻, 且仅有轻微的炎性细胞浸润, 未见坏死灶。模型组炎症活动度计分明显高于正常组($P < 0.01$), 治疗组炎症活动较模型组明显减轻($P < 0.01$, 图2)。

2.6 模型组抵抗素水平与各项指标相关性分析
在模型组中, 抵抗素mRNA相对表达量与血清TNF- α 、ALT、AST水平、肝脏炎症活动度计分成显著正相关($r = 0.873, 0.772, 0.716, 0.892$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 与ISI无相关性。

3 讨论

研究发现约20%的NASH可进展为肝硬化, 而后者发生原发性肝细胞癌、肝功能衰竭和移植肝复发的概率高达30%-40%^[5]。现在普遍认为肝纤维化和肝硬化只有在NASH的基础上才会发生, 无炎则无硬化。可见探讨其发病机制寻求有效的临床用药, 对阻断NASH向终末期肝病发展具有重要意义。

抵抗素是Steppan *et al*^[6]发现的一种脂肪细胞因子, 因其可诱导胰岛素抵抗而被命名。但也有与之相反或无关的结论^[7-8]。新近研究表明抵抗素还可作为促炎因子参与炎症的级联反应。一般认为, 抵抗素在啮齿类动物主要由白色脂

肪组织表达, 人类主要由外周血单核细胞分泌。而最近研究发现无论大鼠或人类在发生慢性肝损害时均可导致抵抗素在肝脏的显著表达^[9-10]。可见探讨抵抗素在肝脏疾病发生中的作用值得深入研究。

本实验用高脂加胆固醇饮食成功复制了实验性大鼠NASH模型, 此模型与人类NASH的发病经过相似, 故所研究的理论易于推广应用于人类。结果发现: (1)模型组肝细胞普遍发生脂肪变性, 出现汇管区炎症, 炎症细胞以单核细胞为主, 炎症活动度计分明显增高; 血清ALT、AST、TNF- α 显著升高。证实长期高脂饮食为主的营养过度可引起肝脏脂肪浸润及脂肪性肝炎。(2)正常对照组肝脏即有抵抗素mRNA表达, 模型组其表达量显著增高, 提示抵抗素的高表达可能与NASH的发生密切相关。(3)进一步相关分析显示, 模型组抵抗素水平与血清TNF- α 、ALT、AST水平、肝脏炎症活动度计分成显著正相关, 提示抵抗素在导致肝脏炎症变性及肝功能损害中发挥重要作用。(4)模型组抵抗素水平与ISI无相关性, 提示抵抗素在参与NASH发生过程中并非通过影响胰岛素敏感性途径发挥作用, 即其与胰岛素抵抗的直接关联在NASH的发病中并不发挥主要作用。本研究结果与Bertolani *et al*^[10]报道在人类正常对照组可见抵抗素在肝

■同行评价

本文的材料和方法选择比较合适, 结果明确, 图片表格清晰, 条理清楚, 具有一定的科学性和可读性, 进一步充实了该领域的研究.

脏的表达, NASH组表达增强, 且表达量与NASH炎症活动度计分成显著正相关结果一致. 且该实验同时发现抵抗素可刺激肝星状细胞分泌MCP-1、IL-8等细胞因子导致肝脏炎症的发生. 亦支持本实验结论抵抗素可导致肝脏炎症变性及肝功能损害. Pagano *et al*^[11]和Bahr *et al*^[12]在对NAFLD及肝硬化患者的研究中发现血浆抵抗素水平与胰岛素抵抗无相关, 亦与本实验结论一致. 在随后的实验中我们期望可以定位抵抗素在NASH模型大鼠肝脏中的表达细胞, 并进一步探究其分子作用机制, 为NASH发生与防治提供新的理论依据.

降脂益肝冲剂主要由丹参、泽泻、山楂、何首乌、五味子、枸杞子、草决明、柴胡等18味中药组方, 本实验研究表明, 他对NASH具有良好的治疗效果, 可减少TNF- α 的释放减轻肝脏的炎症反应, 降低血清ALT、AST促进肝功能恢复, 升高ISI改善胰岛素抵抗, 以及减轻肝细胞脂变与炎细胞浸润. 而其部分作用的发挥可能与下调肝脏抵抗素mRNA的表达有关, 但其机制不包括改善胰岛素抵抗作用. 这也提示我们以降低抵抗素表达为靶点来治疗胰岛素抵抗相关代谢性疾病仍有待商榷.

4 参考文献

- 1 戴林, 邓彬, 白成, 于洪波, 李爱萍. 吡格列酮对大鼠非酒精性脂肪性肝炎的实验研究. 胃肠病学和肝病杂志 2004; 13: 482-484
- 2 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 178-179
- 3 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062
- 4 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 195-197
- 5 Nakashima T, Sumida Y, Furutani M, Hirohama A, Okita M, Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanoue T. Elevation of serum thioredoxin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; 33: 135-137
- 6 Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312
- 7 Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, Zhu Q, Considine RV. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5452-5455
- 8 Lee JH, Bullen JW Jr, Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E625-E632
- 9 范建高, 方继伟, 陆元善, 田丽艳, 徐正婕. 高脂饮食非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏成脂相关基因表达增强. 中华消化杂志 2006; 26: 320-324.
- 10 Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Gines P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2006; 169: 2042-2053
- 11 Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, Donnini D, Faggian D, Mussap M, Plebani M, Avellini C, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1081-1086
- 12 Bahr MJ, Ockenga J, Booker KH, Manns MP, Tietge UJ. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E199-E206

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 •

WCJD 和 WJG 即将开始实行网络版文章 与该文章发表前纪录的链接

本刊讯 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survivin基因靶向治疗大肠癌

张志宏, 韩盛玺, 邱春华, 强 欧, 陈和平, 张初民, 李 易

张志宏, 韩盛玺, 邱春华, 陈和平, 张初民, 李易, 四川省医学科学院 四川省人民医院消化内科 四川省成都市 610041
强欧, 四川大学华西医院人类多肽研究实验室 四川省成都市 610041
张志宏, 四川省人民医院消化内科主治医师, 主要从事大肠肿瘤的防治方面的研究工作.
通讯作者: 张志宏, 610041, 四川省成都市, 四川省人民医院消化内科. zhang-821@21cn.com
电话: 028-85081923
收稿日期: 2007-05-15 修回日期: 2007-10-23

Effects and mechanisms of survivin-siRNA interference on colon adenocarcinoma cells SW620

Zhi-Hong Zhang, Sheng-Xi Han, Chun-Hua Qiu, He-Ping Chen, Chu-Min Zhang, Yi Li

Zhi-Hong Zhang, Sheng-Xi Han, Chun-Hua Qiu, He-Ping Chen, Chu-Min Zhang, Yi Li, Department of Digestive, Academy of Medical Sciences of Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Ou Qiang, Department of Human Peptide Research, People Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Zhi-Hong Zhang, Department of Digestive, Academy of Medical Sciences of Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhang-821@21cn.com

Received: 2007-05-15 Revised: 2007-10-23

Abstract

AIM: To investigate the effects and mechanisms of survivin-siRNA interference on adenocarcinoma cells SW620.

METHODS: SW620 cells were transfected with survivin-siRNA using Lipofectamine 2000. The mRNA expression levels of survivin and PTEN were detected by RT-PCR and protein expression levels were detected by Western blotting. MTT and flow cytometry were used to analyze proliferation and apoptosis.

RESULTS: Compared with control cells, the mRNA and protein levels of survivin were reduced in siRNA-transfected cells, while PTEN was increased. At 12, 24, 48 hours, the expression of survivin mRNA was downregulated

75%, 93.75% and 97.8%, respectively, compared with that in the controls, and the expression of PTEN mRNA was upregulated 41%, 100%, 128%. The growth of transfected cells was inhibited, while apoptosis was increased.

CONCLUSION: Survivin-siRNA has preferential effects on adenocarcinoma cells.

Key Words: survivin; PTEN; RNA interference; Apoptosis; Flow cytometry

Zhang ZH, Han SX, Qiu CH, Qiang O, Chen HP, Zhang CM, Li Y. Effects and mechanisms of survivin-siRNA interference on colon adenocarcinoma cells SW620. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3803-3808

摘要

目的: 通过RNA干扰观察其对survivin及PTEN在大肠腺癌中表达的差异及对大肠腺癌细胞增殖和凋亡的影响。

方法: 将survivin siRNA用脂质体2000转染SW620细胞, 以荧光定量PCR仪检测survivin和PTEN mRNA的变化, Western蛋白印迹法半定量检测两者的蛋白变化, 同时用MTT法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞的凋亡和细胞周期分布的变化。

结果: 结肠腺癌SW620中免疫组化染色显示survivin呈阳性表达。siRNA作用于SW620细胞, survivin mRNA及蛋白的表达随着作用时间的延长而下调, PTEN mRNA及蛋白的表达随着作用时间的延长而呈现递增趋势, 在12 h, 24 h, 48 h, survivin mRNA分别下调为对照组的75%, 93.75%, 97.8%, PTEN mRNA较对照组上调41%, 100%, 128%, 均与对照组有显著性差异。MTT法检测siRNA干扰对细胞增殖的影响呈现出时间依赖性, 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$), 且作用各时间点之间比较亦有显著性差异($P<0.05$)。流式细胞仪检测细胞的凋亡率随时间的延长而增加。

结论: survivin siRNA作用于结肠腺癌SW620可使survivin mRNA和蛋白的表达下调, 同时使

■背景资料
诱导肿瘤细胞的凋亡是成功治疗肿瘤的基础和关键。survivin作为凋亡抑制因子, 与抑癌基因PTEN作用环节一致, 而生物学效应相反。当组织恶变时, PTEN基因的表达出现下调或缺失, 而survivin则上调。siRNA静默survivin的同时发现PTEN的表达增加及大肠腺癌细胞增殖和凋亡均受影响, 以期探讨大肠癌防治的新途径。

■研发前沿

本文旨在通过用 siRNA 干扰 survivin 的表达, 观察其对大肠癌细胞 survivin 及 PTEN 表达的影响, 同时观察其对大肠癌细胞增殖和凋亡的作用, 借以探讨大肠癌防治的新途径。

PTEN 的表达上调, 两者呈负相关, 同时抑制细胞的增殖及促进细胞发生凋亡。

关键词: 生存素; PTEN; RNA 干扰; 凋亡; 流式细胞仪

张志宏, 韩盛玺, 邱春华, 强欧, 陈和平, 张初民, 李易. RNA 干扰 survivin 基因靶向治疗大肠癌. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3803-3808

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3803.asp>

0 引言

目前普遍认为诱导肿瘤细胞的凋亡是成功治疗肿瘤的基础和关键。在众多调控细胞凋亡的基因中, survivin 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子, 具有在肿瘤组织中表达的高选择性和独特的抗凋亡作用机制, 作为肿瘤治疗的一个特异攻击靶点日益瞩目。作为抑癌基因的 PTEN 与 survivin 均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反, 在维持正常细胞的稳定性中发挥重要作用。当组织恶变时, PTEN 基因常发生突变, 其表达出现下调或缺失, 抑制肿瘤细胞增殖分化能力减弱, 而 survivin 的表达则上调, 促进细胞的增殖和分裂。本文通过探讨以 survivin 为靶向, 通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 观察其对 survivin 及 PTEN 在大肠腺癌中表达的差异及对大肠腺癌细胞增殖和凋亡两者的影响, 进一步探讨大肠癌防治的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 SW620 细胞株购于四川大学华西医院移植免疫实验室。蛋白电泳仪 (Bio-Rad 公司), ECL 半干电转系统 (Amersham 公司, TE70), 荧光定量 PCR 仪 (上海枫岭生物技术 FTC-2000), 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司, ELITE ESP 型), 酶联免疫检测仪 (美国 EL-321e 型), lipofectamine2000, PCR 试剂盒, 兔抗 survivin, PTEN (cell signaling, CST Co.), HRP 标记的 GAPDH survivin 的 siRNA 双链体 (Shanghai GenePharma Co.): Sense 5'-GGA CCA CCG CAU CUC UAC AdTdT-3'; Antisense 5'-UGU AGA GAU GCG GUG GUC CdTdT-3'; PCR 反应引物: SURF1: 5'-gagcggatggccgaggct -3', SURR1: 5'-tgttctctatggggtcgctca-3' (124 bp); PTENF: 5'-GATTCGACTTAGACTTGACCT-3', PTENR: 5'-TTTGCGCGGTGTCATAATGTCT-3' (182 bp)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏及传代: SW620 细胞株用 1640 培养基加胎牛血清, 37°C CO₂ 孵箱培养。

1.2.2 免疫组化: 将 2% 明胶预处理过的无菌盖片放入 6 孔板内, 将细胞接种生长。40 g/L 多聚甲醛固定 30 min。0.1% Triton-X100 5 min 打孔。30 mL/L H₂O₂ 室温避光 10 min。羊血清封闭切片, 37°C 约 20 min。一抗 (1:100), 37°C 孵育 1 h, 4°C 过夜。二抗羊抗鼠抗体 (1:200), 37°C 40 min。加过氧化物酶标记的链酶卵白素抗体 (1:200), 37°C 孵育 30 min。DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 封片。

1.2.3 siRNA 双链体转染: siRNA 转染前 1 d, 将细胞以每孔 2×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 用不含抗生素的 1640 培养基培养。转染当天用无血清培养基稀释 siRNA 双链体, 以 4 μ L 100 pmol/孔的 siRNA 双链体和 8 μ L/孔 lipofectamine2000 按 1:2 体积轻混, 于室温孵育 20 min 以形成脂质体复合物, 每孔 600 μ L 加入 6 孔板中。通过轻轻敲击培养板 30 s 以使之混匀, 将细胞培养板于 37°C 50 mL/L 的 CO₂ 培养箱中孵育 4-6 h 后更换培养液。观察不同时间点的作用。

1.2.4 Western 印迹检测蛋白质: 用含抑制剂的蛋白抽提剂 (1×10^6 个细胞加入 0.1 mL) 抽提蛋白, 收集上清液。蛋白定量为 1.5 μ g/ μ L。10% SDS-聚丙烯酰胺电泳分离蛋白。半干电转法将凝胶上蛋白转移到 PVDF 膜 60 min。封闭液中孵育 1 h。加入 1:1000 稀释的一抗 4°C 过夜。TBST 洗膜 5 min, 共 3 次。加入 1:5000 HRP 标记的二抗及 GAPDH, 37°C 孵育 2 h。进行 ECL 检测。

1.2.5 RT-PCR: TRIzol reagent 提取细胞总 RNA, 参照说明书逆转录后 PCR 扩增, 参照 GenBank 序列设计引物。PCR 反应条件: 94°C 2 min 1 个循环, 后 94°C 20 s, 54°C 20 s, 70°C 30 s, 80°C 20 s, 共 40 个循环。增益率为 1.5。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 噻唑蓝 (MTT) 比色试验: 以 2×10^3 个细胞/孔的浓度接种细胞于 96 孔板, 每孔 100 μ L。置 37°C 的 CO₂ 孵箱中培养 1 d。转染后继续分别培养 24、48、72 h。实验终止前 4 h 加 MTT 20 μ L/孔, 继续 37°C 孵育, 最后弃上清, 加入 DMSO 150 μ L/孔, 振荡 10 min。选择 570 nm 波长, 测定各孔光吸收值。

抑制率 = (1 - 试验组光吸收值 / 对照组光吸收值) $\times$ 100%。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡的影响: 细胞的接种与收集: 将细胞消化计数 2×10^8 /L,

接种于6孔板内, 培养24 h后进行转染. 将待收集细胞悬于4℃预冷的PBS中, 缓缓倒入-20℃预冷乙醇, 4℃过夜. 离心后将与PI染液混合, 4℃放置20-30 min. 过滤检测.

统计学处理 所有统计均采用SPSS10.0软件包进行分析. 细胞增殖抑制结果采用方差分析(*F*检验), 各组间两两比较用LSD分析. 药物对细胞凋亡的作用采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 免疫组化检测细胞中survivin的表达 结肠腺癌SW620中免疫组化染色显示survivin呈阳性表达, 弥漫性分布于胞质中呈棕色颗粒样, 胞核呈蓝色复染状(图1).

2.2 siRNA干扰对survivin及PTEN mRNA表达的影响 用siRNA干扰分别作用于SW620细胞24 h, 48 h, 72 h后, survivin mRNA的表达下调为对照组的75%, 93.75%, 97.8%, 具有显著性差异($P<0.01$)(图2). 而PTEN mRNA的表达则较对照组上调为41%, 100%, 128%, 且差异显著($P<0.01$), 且两者呈现出负相关($P<0.01$).

2.3 siRNA干扰对survivin蛋白表达的影响 用siRNA干扰作用于SW620细胞24-72 h后, survivin蛋白的表达随着作用时间的延长而下调, 与对照组间的差异显著($P<0.01$), 且48 h和72 h与24 h相比较亦有显著差异, 但前两者之间则似乎无明显差异(图3A). PTEN的表达则随时间延长而呈现出递增趋势. 虽然干扰后PTEN的表达较对照仍然升高($P<0.05$), 但程度较survivin蛋白表达下降(图3B).

2.4 siRNA干扰对SW620细胞增殖的影响 用MTT法检测发现siRNA干扰对细胞增殖的影响呈现出时间依赖性. 干扰组对细胞增殖的抑制率与对照组相比有显著差异($P<0.05$). 且各时间点之间比较亦有显著性差异($P<0.05$, 表1).

2.5 siRNA干扰对SW620细胞凋亡的影响 正常生长的细胞表现为不规则的多角形, 融合成集落生长. 经siRNA干扰后, 细胞体积变大, 似乎胞质中颗粒增多, 以后部分细胞从培养瓶壁上脱落下来. 随时间增加, 以上改变明显(图4). 与阴性对照组相比, siRNA干扰作用于细胞48 h后的凋亡率显著增加(图5). 同时用siRNA干扰作用于SW620细胞24-72 h, 细胞的凋亡率随着时间的延长而增加, 72 h达到高峰(表1). 阴性组细胞周期S期43.3%±32%, G₁期48%±2.1%, 而干扰组细胞周

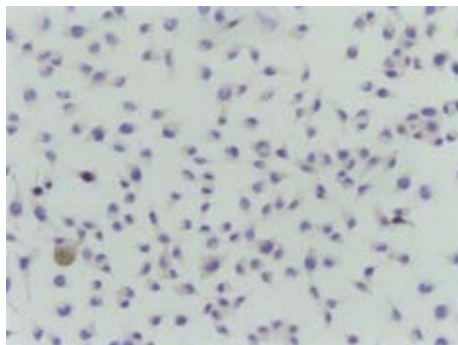


图1 survivin蛋白免疫组化(LsAB染色×100).

表1 MTT法检测siRNA干扰SW620细胞在不同时间点的抑制率, 细胞凋亡率和细胞周期比例(%)

分组	24 h	48 h	72 h
抑制率			
空白组	5.3±0.8	7.6±1.2	9.3±0.9
阴性对照组	8.6±1.2	11.2±2.1	13.5±0.7
siRNA干扰组	14.3±1.5	36.2±3.3	40.6±3.6
凋亡率			
空白组	12±2.1	15.6±1.6	25.3±3.1
阴性对照组	15.2±1.3	16±1.5	28±2.4
siRNA干扰组	25.5±1.9	48.9±4.0	67±3.7
细胞周期比例			
G ₁ 期	52.9±1.8	65.1±4.1	70.2±1.9
S期	38.4±2.7	26.4±2.9	18.3±3.1

期S期缩短, 而G₁期延长, 也在72 h达到高峰(表1).

3 讨论

由小片段的双链RNA分子介导RNA干扰可导致生物细胞内同源基因的特异性静默, 具有高特异性^[1]及高效性. 有研究将其与寡脱氧核苷酸(oligodeoxyribonucleic acids, ODNs)比较, 发现前者最大抑制浓度(IC₅₀)较后者低100-1000倍^[2-3], 并且作用时间延长^[4], 同时通过电穿孔, 局部注射或静脉注射^[5]的方法已经成功将化学合成的siRNA, 表达siRNA的质粒以及病毒等导入哺乳动物, 并不引起全身非特异性反应^[2,6-7]. 2004年美国FDA已经批准将经过修饰的siRNA进行临床新药试验, 用于治疗与年龄相关的黄斑退化性改变的患者^[6]. 目前认为RNA干扰作为研究基因功能的一种重要和常用的技术, 已经广泛用于基因组的研究和临床疾病包括病毒感染、显性遗传疾病、尤其是肿瘤^[8]的治疗研究, 有广阔的前景和应用潜力.

生存素(survivin)是凋亡抑制蛋白(inhibitor

■创新盘点
目前尚无研究直接以siRNA干扰survivin后, 同时观察survivin对相关抑癌基因PTEN表达的影响, 及其对细胞增殖和凋亡的影响.

■应用要点
本文为防治大肠
癌提供了理想的
方法和途径。

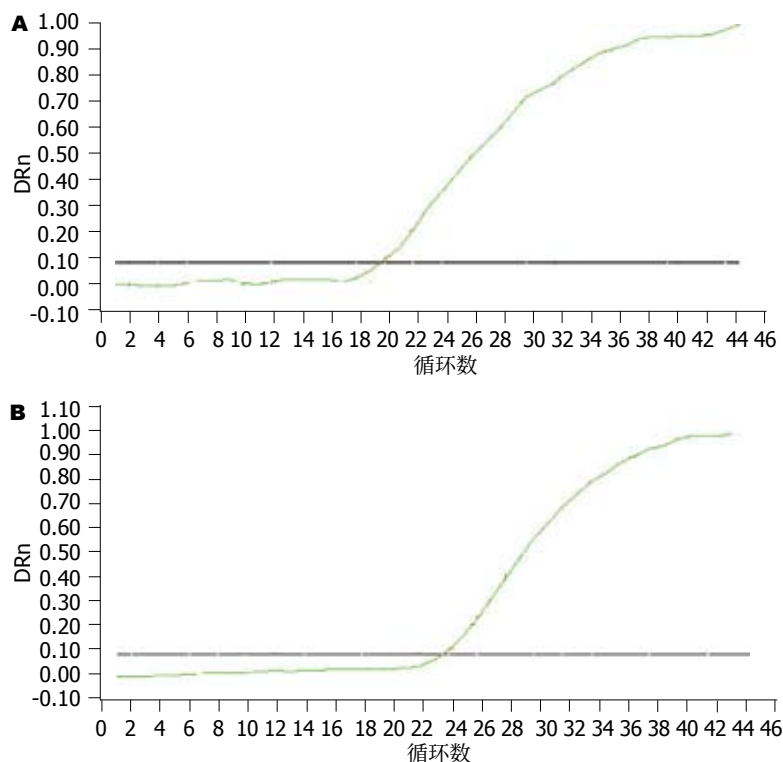


图2 两条线交点为survivin mRNA表达的起跳点. A: 对照组起跳点为20; B: siRNA干扰48 h后起跳点为24. 两者差值 $2^{\Delta\Delta CT} = 1/32$ 提示干扰后survivin的表达下降为前者的1/32倍。

of apoptosis protein, IAP)家族成员之一, 被认为是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子. 不同于其他IAP家族成员主要分布于正常终末分化组织中, survivin在胚胎发育过程中和绝大多数肿瘤组织中表达. 研究发现, survivin在结肠癌组织及癌旁的正常组织中表达阳性率分别为63.5%和29.1%, 有显著差异, 同时发现其阳性表达对疾病的预后具有重要影响^[9-11]. 本实验通过免疫组化及Western蛋白印迹检测发现结肠腺癌细胞株SW620中survivin的表达呈强阳性. 采用针对survivin设计的siRNA干扰结肠腺癌SW620细胞, 则survivin mRNA及蛋白的表达分别下调75%-97.8%和46%-80%. 与报道用针对survivin dsRNA构建的腺病毒转染人软组织肉瘤, 发现其mRNA表达下降了73%-88%, 蛋白表达减少了52%-81%的结果相接近^[12]. 并且有研究报道, siRNA干扰表达于转染后12 h, 高峰出现于36-48 h, 至96 h失效^[13]. 本实验结果与其相似, 高峰出现于48 h左右, 作用至72 h mRNA及蛋白的表达较前者无明显增加.

作为抑癌基因的PTEN在维持正常细胞的稳定性中发挥重要的作用^[14], 与survivin均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反, 在肿瘤中的表达常常减少或缺失^[15-16]. 因其具有对PI3K-PKB/AKT信

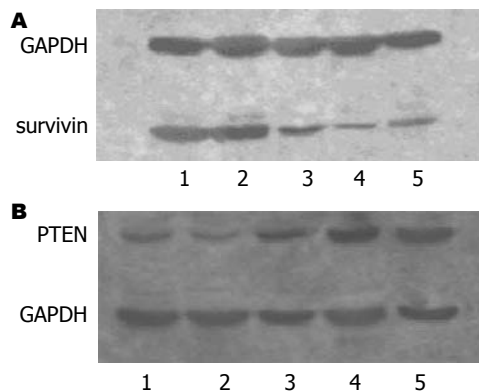


图3 内参GAPDH与目的蛋白的表达. 1-5: 空白, 阴性对照, 作用24 h, 48 h, 72 h. A: siRNA干扰后在内参GAPDH表达稳定的同时, survivin的表达随着作用时间的延长而明显减少; B: 提示干扰后, PTEN的表达增加与survivin的表达相反.

号传导通路的负调控作用而备受关注. 当组织恶变时, PTEN基因常发生突变, 出现下调或缺失, 对PI3K/AKT通路的抑制作用减弱, 则抑制肿瘤细胞增殖分化能力减弱, 而survivin的表达上调, 启动细胞周期, 促进分裂, 使肿瘤细胞的恶性增殖能力增强^[17]. 有研究应用PTEN基因转染神经胶质瘤和卵巢癌可使肿瘤细胞周期阻滞, 诱导细胞凋亡^[18-19]. 本文通过以survivin为靶向的siRNA干扰可以使PTEN mRNA及蛋白分别上调41%-128%及30%-50%, 与survivin的表达呈反

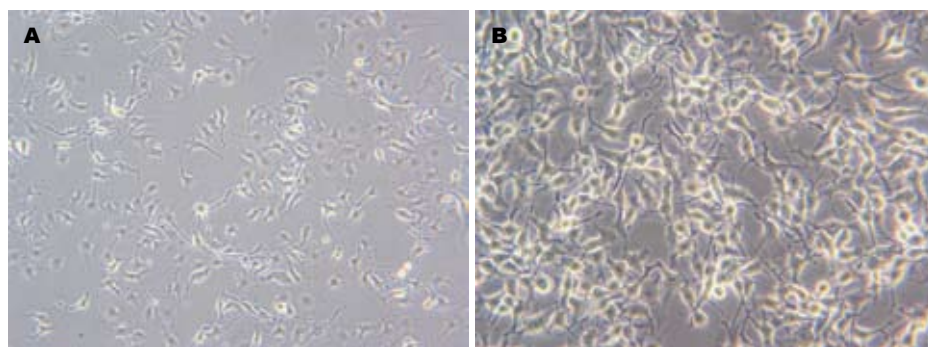


图 4 siRNA干扰前后细胞形态的变化. A: 无干扰时细胞接种后的贴壁生长; B: siRNA干扰48 h后细胞体积变大, 胞质中颗粒增多($\times 200$).

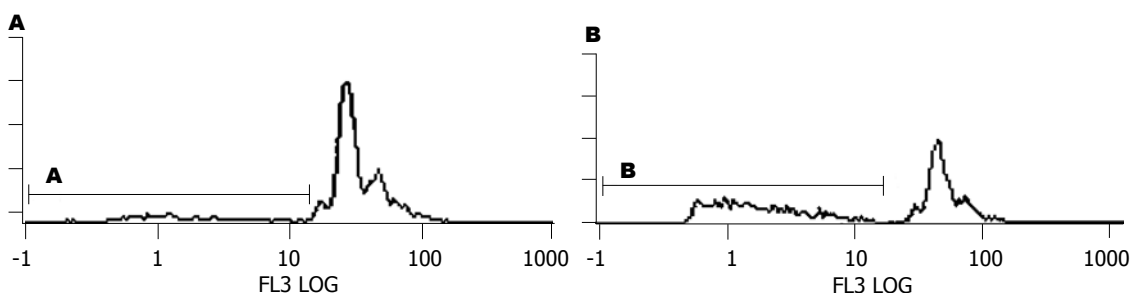


图 5 siRNA干扰前后细胞的凋亡率变化. A: 无干扰时细胞的凋亡峰较低; B: siRNA干扰48 h细胞的凋亡率凋亡峰明显升高.

方向变化, 两者呈负相关. 其上调的幅度的差异认为可能与不同蛋白所具有的代谢半衰期不同有关.

siRNA干扰还可以对细胞的增殖及凋亡发挥影响作用^[20]. 本文发现siRNA干扰可使SW620细胞的增殖明显受抑(14.3%-40.6%), 而对照组为(5.3%-9.3%). 同时促进肿瘤细胞的凋亡, 其凋亡率为25.5%-67%, 并使细胞周期停滞于G₁期, 而S期所占比例则明显减少. 该结果与以前报道认为在细胞中survivin的表达增加可以使细胞从G₁期进入S期, 启动细胞周期^[21], 相反下调survivin的表达可使细胞受阻于G₁期的结论相一致^[22]. 其主要作用机制可能与以下几点相关: (1)survivin可直接与凋亡路径的下游执行酶caspase-3和caspase-7结合而抑制其活性, 阻止由caspase激活剂或凋亡诱导剂诱导的细胞DEVD-cleaving自杀酶的累积, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[23-24]; (2)通过与线粒体释放的凋亡前蛋白, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶二级活化物(second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)结合, 阻断caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导^[25-26]; (3)通过竞争性CDK4/P21结合, 促进S期进程, 同时从CDK中释放出P21, 与procaspase-3形成复合物, 抑制caspase-3的活性^[27]. (4)通过其细胞周期调节作用, 使肿瘤细胞逃避细胞周期G₂/M期检测点的监测, 从而抵抗

DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡, 从而导致肿瘤细胞异常分裂增殖^[28].

总之, 由于survivin在肿瘤组织中所具有的高选择性的表达和独特的抗凋亡的作用机制, 使其作为肿瘤治疗的一个特异的攻击靶点成为可能^[29]. 同时PTEN作为与survivin同一路径的相反的靶点, 保持其自身的稳定性及抑制其发生突变也需要进一步的研究明确. 与反义寡核苷酸相比, RNAi的应用不仅效率远高于前者, 而且持续时间延长. 同时有实验证实, 在小鼠体内反义核酸不发挥作用, 而RNAi的活性却很高, 推测反义核酸可能被体内的核酸降解系统破坏^[4]. 这一实验结果鼓舞了越来越多的学者们对RNAi的进行更深入的研究. 当然, RNAi真正被用于临床仍然还有许多问题亟待解决: 如何保证RNAi的稳态, 选择合适的无毒载体, 最大限度的延长RNAi的效果等, 但无疑RNAi的应用也为肿瘤治疗提供了新的思路和手段.

4 参考文献

- 1 Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 2003; 102: 2236-2239
- 2 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene

■名词解释
小干扰RNA片段 (small interfering RNA, siRNA): 长链的双链RNA进入细胞后, 在细胞胞质内的核酸酶-Dicer的作用下, dsDNA被切割成21-23 bp大小, 后者包括外源性合成的和内源性表达的siRNA.

■同行评价

本文是一篇较好的基础研究文章,选题具有先进性,研究方案设计合理,有十分重要的理论和实践意义。但是文字表述应下功夫,使之更加准确简练。

- expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6347-6352
- 3 McCarthy BA, Mansour A, Lin YC, Kotenko S, Raveche E. RNA interference of IL-10 in leukemic B-1 cells. *Cancer Immunol* 2004; 4: 6
- 4 Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1000-1004
- 5 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178
- 6 Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 787-795
- 7 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 8 Karam JA, Lotan Y, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Shariat SF. Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2007; 70: 482-486
- 9 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 10 Wang TT, Qian XP, Liu BR. Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2784-2790
- 11 Piras F, Murtas D, Minerba L, Ugalde J, Floris C, Maxia C, Colombari R, Perra MT, Sirigu P. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 2007; 50: 835-842
- 12 Kappler M, Bache M, Bartel F, Kotsch M, Panian M, Wurl P, Blumke K, Schmidt H, Meye A, Taubert H. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 186-193
- 13 McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J, Sharp PA. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 169: 5754-5760
- 14 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 15 Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 285-288
- 16 Wu SK, Wang BJ, Yang Y, Feng XH, Zhao XP, Yang DL. Expression of PTEN, PPM1A and P-Smad2 in hepatocellular carcinomas and adjacent liver tissues. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4554-4559
- 17 Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9052-9057
- 18 Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; 58: 5285-5290
- 19 Minaguchi T, Mori T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. Growth suppression of human ovarian cancer cells by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *Cancer Res* 1999; 59: 6063-6067
- 20 Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1170-1174
- 21 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
- 22 Li LP, Liang NC, Luo CQ. Construction of survivin siRNA expression vector and its regulation on cell cycle and proliferation in MCF-7 cells. *Ai Zheng* 2004; 23: 742-748
- 23 Hay BA. Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1045-1056
- 24 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21: 315-320
- 25 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990
- 26 Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7: 163-166
- 27 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-3234
- 28 Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastri PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40
- 29 Zhu K, Qin H, Cha SC, Neelapu SS, Overwijk W, Lizée GA, Abbruzzese JL, Hwu P, Radvanyi L, Kwak LW, Chang DZ. Survivin DNA vaccine generated specific antitumor effects in pancreatic carcinoma and lymphoma mouse models. *Vaccine* 2007; 25: 7955-7961

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

胃癌组织中P27表达与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性

张广建, 寇有为, 王强

张广建, 辽宁省第三人民医院外科 辽宁省开原市 112300
寇有为, 王强, 中国医科大学盛京医院普外科 辽宁省沈阳市 110004
张广建, 硕士, 副主任医师, 主要从事胃肠外科临床工作和研究。
通讯作者: 王强, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院普外科. wangq@cmu2h.com
电话: 024-83955060
收稿日期: 2007-05-16 修回日期: 2007-10-17

Expression of P27 and cyclin D₁ and E expression in gastric cancer

Guang-Jian Zhang, You-Wei Kou, Qiang Wang

Guang-Jian Zhang, Department of Surgery, Third People's Hospital of Liaoning Province, Kaiyuan 112300, Liaoning Province, China
You-Wei Kou, Qiang Wang, Department of General Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Qiang Wang, Department of General Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangq@cmu2h.com
Received: 2007-05-16 Revised: 2007-10-17

Abstract

AIM: To detect the expression of P27 and cyclin D₁ and E expression in gastric cancer, and to provide a new way to diagnose and treat gastric cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to examine the expression of P27, cyclin D₁ and cyclin E proteins in gastric carcinoma ($n = 54$) and normal gastric mucosa ($n = 15$).

RESULTS: Positive immunohistochemistry was seen in 20 of 54 gastric cancer cases and in 11 of 15 normal gastric tissues. P27 expression differed significantly between gastric cancer and normal gastric tissue ($P < 0.05$), had no relation with sex, age, tumor size, invasive depth and differentiation, but had a significant relationship with TNM staging and lymph node metastasis ($P < 0.05$). P27 expression had a negative correlation with cyclin D₁ ($r = -0.332$) and no relationship with cyclin E.

CONCLUSION: The difference in P27 expres-

sion in gastric cancer and normal gastric tissue is remarkable. The expression has a significant relationship with TNM staging and lymph node metastasis. P27 expression has a negative correlation with cyclin D₁ and no relationship with cyclin E expression.

Key Words: Gastric cancer; P27; cyclin D₁; cyclin E

Zhang GJ, Kou YW, Wang Q. Expression of P27 and cyclin D₁ and E expression in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(36): 3809-3814

摘要

目的: 检测胃癌组织中P27的表达及其与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性, 并探讨其意义。

方法: 临床病理资料齐全的胃癌蜡块标本54例, 正常胃黏膜标本15例, 采用SP免疫组化方法检测P27、cyclin D和cyclin E在其中的表达。

结果: 胃癌组织54例中有20例P27表达阳性(37.0%), 正常胃组织中15例有11例P27呈阳性表达(73.3%), 胃癌组织与正常胃组织相比, P27的表达有明显差异($P < 0.05$), 胃癌组织中P27的表达与患者的性别、年龄及肿瘤大小、浸润深度、分化程度无相关性($P > 0.05$), 而与TNM分期及有无淋巴结转移明显相关($P < 0.05$), P27的表达与cyclin D₁的表达呈负相关($r = -0.332$), 而与cyclin E的表达无明显相关性($P > 0.05$)。

结论: 胃癌组织中P27表达与正常胃组织有显著差异, 胃癌组织中P27蛋白表达与淋巴结转移及临床分期密切相关, 与cyclin E的表达呈负相关。

关键词: 胃癌; P27; 周期蛋白D₁; 周期蛋白E

张广建, 寇有为, 王强. 胃癌组织中P27表达与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(36):3809-3814
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3809.asp>

0 引言

细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 其运行受细胞周期调控机制控制。细胞周期抑制蛋白

■背景资料

P27是新近发现的细胞周期抑制蛋白, 在细胞周期调控中起重要作用, 它能够抑制多种cyclin-CDK复合物的激酶活性, 使细胞阻滞于G₁期, 从而抑制细胞增殖, 而胃癌是较常见的消化系统恶性肿瘤之一, 本文检测P27在胃癌中的表达及其与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性。

■相关报道

P27是最近发现的一种细胞周期抑制蛋白,很多文献对此进行了报道,其中与胃癌相关性的研究最多见,但缺乏大宗癌症病例和广泛癌系的研究。

异常表达将导致细胞周期的失控,使细胞获得以增殖过多、凋亡过少为主要形式的失控性生长特征。细胞周期异常可导致肿瘤的发生,肿瘤对细胞周期的影响,一方面表现为对细胞周期监控机制的破坏,另一方面表现为对细胞周期驱动机制的破坏。P27是新近发现的细胞周期抑制蛋白,在细胞周期调控中起重要作用。他能够抑制多种cyclin-CDK复合物(cyclinE-CDK₂、cyclinA-CDK₂、cyclinD-CDK₄等)的激酶活性,使细胞阻滞于G₁期,从而抑制细胞增殖。cyclin D₁和cyclin E是目前研究较为成熟的细胞周期调控因子,研究P27与其二者的相关性是目前细胞周期调控方面的热点。胃癌是较常见的消化系统恶性肿瘤之一,早期诊断困难,临床患者多为进展期或晚期,故其预后差,目前胃癌的发病机制仍不十分清楚。我们检测P27在胃癌中的表达及其与cyclin D₁、cyclin E表达的相关性,并探讨其意义,从而为胃癌的诊断和治疗提供一种新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 选择临床及病理资料齐全的中国医科大学第二附属医院普外科2001-2003年手术切除并经病理证实为胃癌的蜡块标本54例,全部病例术前均未行放化疗,病理均为腺癌。男37例,女17例;年龄38-78(平均60.4)岁;肿瘤的原发灶大小、深度(T)、淋巴结转移(N)由病理学确定,远处转移(M)由病理学和临床确定。组织学分化:高分化19例,中分化17例,低分化18例;局部淋巴结转移:有25例,无29例;根据1997年国际抗癌联盟(UICC)制定的TNM分期标准进行临床分期:Ⅰ期12例,Ⅱ期14例,Ⅲ期16例,Ⅳ期12例。另取正常胃黏膜组15例,标本取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中正常胃黏膜组织,并经病理观察证实且排除重度不典型增生。男10例,女5例,年龄44-77(平均58)岁。将蜡块制成5 μm厚的切片,贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,置于60℃的烤箱内烤片72 h以上。即用型P27兔抗人mAb、cyclin D₁鼠抗人mAb、cyclin E鼠抗人mAb全部购于北京中山生物制品有限公司, S-P试剂盒及DAB显色试剂盒均购自福州市迈新生物技术开发公司。

1.2 方法 常规HE染色,确定标本的组织分化程度。检测P27、cyclin D₁、cyclin E在胃癌组织中表达,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(S-P)免疫组织化学方法,具体操作步

骤:石蜡切片常规脱蜡至水;抗原修复(高温高压法):冲洗,0.01 mol/L pH 6.0枸橼酸盐缓冲液浸泡5 min,高温高压1.5 min,静置自然冷却至室温;阻断内源性过氧化物酶活性:冲洗,30 mL/L H₂O₂ 37℃温箱内孵育30 min;封闭非特异性位点:冲洗,滴加100 mL/L非免疫血清,37℃温箱内孵育30 min,静置自然冷却至室温;滴加一抗,4℃过夜;升至室温,冲洗,滴加生物素标记的二抗,37℃温箱内孵育35 min;冲洗,滴加SP复合物,37℃温箱孵育35 min;冲洗,DAB显色5 min;自来水冲洗;苏木素复染10 min;自来水充分冲洗,10 mL/L盐酸酒精分化2-3 s;自来水冲洗,温水浸泡返蓝30 min;脱水:梯度酒精冲洗;二甲苯Ⅰ、Ⅱ各浸泡5 min;中性树胶封片。对照:用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照,PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。结果判定:细胞胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,以阳性细胞密度最高的区域计数5个高倍视野(×400),计数阳性细胞的百分率。规定阳性细胞比例超过5%为阳性组,小于5%为阴性组。

统计学处理 应用SPSS11.5软件进行统计学处理,各项指标间差别检验均应用 χ^2 检验,组间相关性采用Spearman相关分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中P27的表达 P27表达阳性染色主要定位于胃癌及正常胃组织细胞胞核中,为棕黄色颗粒。在54例胃癌组织中有20例P27表达阳性(37.0%,图1A)。15例正常胃组织中有11例P27呈阳性表达(73.3%,图1B)。胃癌组织与正常胃组织相比,P27的表达有明显差异($P<0.05$)。胃癌组织中P27的表达与患者的性别、年龄及肿瘤大小、浸润深度、分化程度无相关性($P>0.05$),而与TNM分期及有无淋巴结转移明显相关。TNMⅠ、Ⅱ期病例组,P27表达的阳性率为57.7%,TNM分期Ⅲ、Ⅳ期胃癌中的阳性表达率为17.9%,二者之间有显著的差异($P<0.05$)。在有淋巴结转移和无淋巴结转移的胃癌组织中P27表达的阳性率分别为16.0%和55.2%,二者之间有显著的差异($P<0.05$)。说明P27的表达与胃癌的临床分期及淋巴转移有关,恶性程度越高,TNM分期越晚,P27的表达水平越低(表1)。

2.2 胃癌组织P27与cyclin E, cyclin D₁表达的相关性 P27和cyclin E蛋白表达呈负相关, cyclin E阳

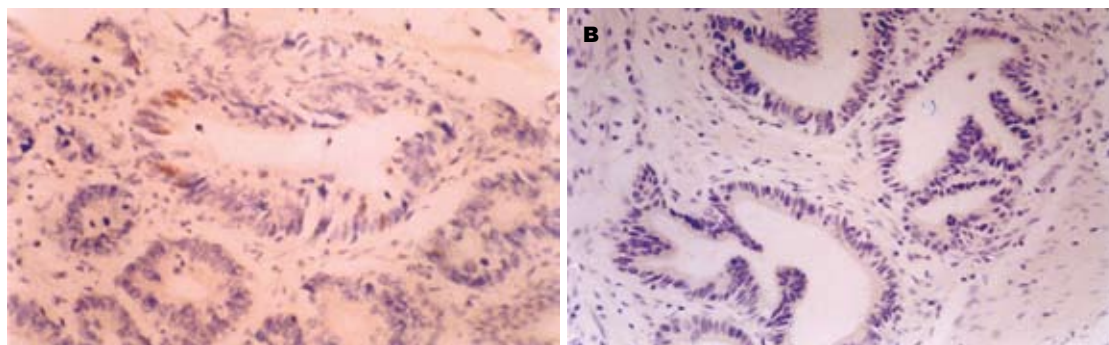


图 1 P27在胃癌组织和正常胃组织中的阳性表达(SP × 400). A: 胃癌组织; B: 正常胃组织.

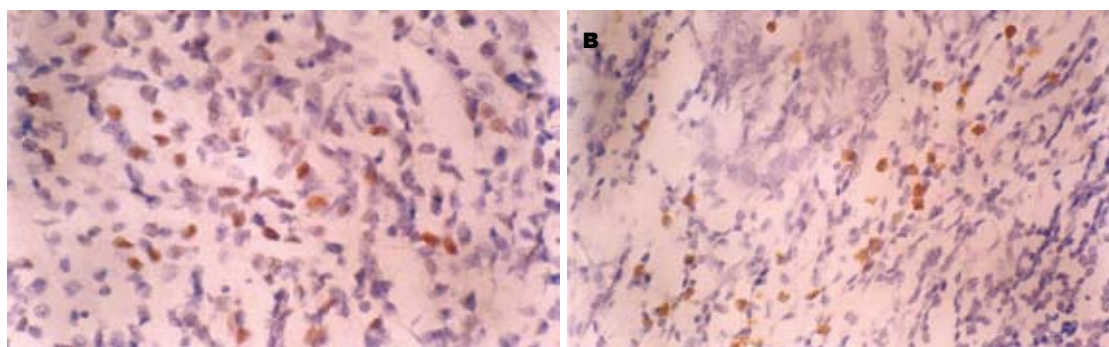


图 2 cyclin E和cyclin D₁在胃癌组织中的表达(SP × 400). A: cyclin E; B: cyclin D₁.

性(图2A)的33例胃癌中P27蛋白阳性8例(24.2%), 显著低于cyclin E阴性而P27蛋白阳性者(57.1%, $P < 0.05$, $r = -0.332$), 二者之间有显著的相关性, 且呈负相关. P27表达与cyclin D₁蛋白的表达无相关性, cyclin D₁阳性(图2B)的31例胃癌中P27蛋白阳性9例(32.1%), cyclin D₁阴性的23例胃癌中P27蛋白阴性11例(47.8%, $P > 0.05$), 二者之间无相关性.

3 讨论

1994年由美国两个研究小组Polyak *et al*^[1]和Toyoshima *et al*^[2]分别分离得到P27蛋白. P27是分子质量为27 kDa的热稳定蛋白质, 为长约594 bp, 编码198个氨基酸的蛋白质^[3]. Pietsenpol *et al*^[4]发现P27基因定位于人染色体12P13, 包括两个外显子和一个内显子. P27作为一个细胞周期负性调控因子, 其水平随着细胞周期进程的改变而改变. 在细胞周期G₁期P27水平最高, 此时P27主要是与cyclin E-CDK2结合, 抑制CDK2的蛋白激酶活性, 进而引起细胞周期停滞在G₁期. 随着细胞进入S期DNA合成达到最高时P27的水平降到最低点^[5]. P27作为CDK抑制因子参与细胞周期的调控—这是P27的主要功能. 其活性的改变直接影响着细胞周期的进程. 对P27活性的调控

可分为转录水平和转录后水平. 在转录水平上的调控, 通过研究发现: (1)Forkhead转录因子可以上调P27的转录水平^[6], 进而引起P27蛋白水平的升高, 导致G₁期的停滞; (2)在黑色素瘤中, P27启动子区域内存在着高度的甲基化, 并且这种甲基化抑制了P27的转录^[7], 但是这种现象是否出现在别的肿瘤中仍有待证实; (3)*c-myc*可以在转录水平上抑制P27的表达, 并且他的抑制区域被定位在P27基因的-20 bp和+20 bp之间^[8]. 对P27活性的调控主要是在转录后水平上进行的. P27转录后水平的调节途径包括对P27蛋白的水解、对P27在细胞中的定位以及对P27被扣留的调控. P27蛋白的水解主要是通过泛素化-蛋白水解途径完成的^[9], 并且此途径是在细胞周期G₀-G₁期以及G₁期-S期转化时对P27蛋白水平进行调控的. 进一步的研究表明: P27自身特异位点的磷酸化对于P27从核内转运至胞质、以及蛋白水解都是必要的^[10]. 调控P27活性的另外一条途径是P27与不同物质的结合会对其活性造成不同的影响. 因此P27的表达水平及活性与肿瘤的发生有密切的关系.

近年来研究发现, P27在肿瘤细胞中的改变主要表现为瘤细胞中游离的P27蛋白量远远低于正常细胞的水平. Kawamata *et al*^[11]报道在早

■创新盘点

本研究结果P27在胃癌组织中的表达与肿瘤分化程度, 浸润深度, cyclin D₁表达无相关性, 与大多发表的文献不一致.

■应用要点

研究P27在胃癌组织中的表达对胃癌的诊断和治疗有重要的现实意义,已提高P27表达的基因治疗技术可加速细胞周期进程,抑制肿瘤细胞增殖,从而为胃癌的辅助治疗提供新的依据。

表 1 P27的表达与胃癌的临床病理特征的相关性

临床病理		<i>n</i>	P27阳性表达 <i>n</i> (%)
男		37	14 (37.8)
女		17	6 (35.3)
年龄	< 60 岁	24	11 (45.8)
	≥ 60 岁	30	9 (30.0)
肿瘤大小	< 5 cm	37	13 (35.1)
	≥ 5 cm	17	7 (41.2)
浸润深度	未达浆膜	15	7 (46.7)
	侵及浆膜	39	13 (33.3)
淋巴转移	(+)	25	4 (16.0) ^b
淋巴转移	(-)	29	16 (55.2)
远隔转移	(+)	12	3 (25.0)
远隔转移	(-)	42	17 (40.5)
TNM分期	I + II	26	15 (57.7) ^b
	III + IV	28	5 (17.9)
分化程度	高分化	19	8 (42.1)
	中分化	17	6
	低分化	18	6

^b $P < 0.01$.

期乳腺癌中P27蛋白水平与预后相关, P27蛋白低表达组的平均生存期为139 mo(死亡率17%), P27蛋白高表达组平均生存期为174 mo(死亡率9%), 他们认为在微小浸润性乳腺癌, P27蛋白表达水平可作为判断患者预后的指标. Ronald *et al* 对86例根治性切除的 I 期- II 期前列腺癌作P27蛋白表达水平检测, 结果在P27蛋白低表达组中, 50%的病例肿瘤复发, 而P27蛋白高表达组中仅22.2%的患者有肿瘤复发^[12]. Margarit *et al* 对淋巴组织及不同类型的淋巴瘤中P27蛋白表达状况作了研究, 结果表明: 淋巴组织中静止的细胞群表达P27蛋白, 而增生的细胞群P27蛋白阴性. 无论淋巴瘤的组织学类型如何, 小的静止细胞P27蛋白阳性, 大的增生细胞P27蛋白阴性^[13]. 所有P27表达水平较高的肿瘤是具有“静止临床行为”的淋巴瘤, 而P27表达低或缺乏者则是具有高度侵袭性的肿瘤. Singh *et al*^[14-15]在研究与Barrett相关的食管腺癌(BAA)时发现, P27蛋白水平下降与腺癌淋巴结转移, 深部浸润、生存率低下有关, 与肿瘤细胞分化程度呈负相关.

在恶性肿瘤的研究中发现, 癌细胞中P27蛋白表达下降与肿瘤的进展、浸润深度、淋巴结转移显著相关^[16-18]. 与肿瘤浸润深度, 大小, 年龄, 性别无明显关系. 本研究结果与之相似, 胃癌组织中P27蛋白阳性率37.0%明显低于正常胃组织73.3%($P < 0.05$). 说明P27表达水平下调可能

促进胃癌的发生. 他在胃癌组织中的表达与淋巴结转移, TNM分期有关, 在无淋巴结转移组P27蛋白阳性率(55.2%)有淋巴结转移组阳性率为16.0%($P < 0.05$). 表明P27蛋白在胃癌的进展过程中逐渐丧失了作为细胞周期负调控因子的抑癌作用, 使得癌细胞具有更高的恶性程度和侵袭力. 另外P27蛋白缺乏还可导致细胞间黏附力下降, 使肿瘤容易转移. P27蛋白在TNM分期III, IV期中的表达水平显著下降, 提示其在胃癌中的低表达是一个有价值的预后因素. 本组P27蛋白的表达与胃癌的淋巴结转移及临床分期呈显著相关, 呈现出低表达与高恶性明显相关, 提示P27蛋白表达水平可能作为反映胃癌恶性程度和预测胃癌预后的重要指标.

cyclin E是一种核蛋白, 最初是从酿酒酵母菌中提取出来的^[19-20]. cyclin E的表达受细胞周期调节, 并在G₁期末达到高峰. 在cyclin D₁和cyclin D₂表达增加后, 与CDK₂联系, 并将其激活, cyclin E/CDK复合物在细胞进入S期前显示出短暂而强烈的酶活性, 并引起RB蛋白的进一步磷酸化, cyclin E/CDK₂复合物的活性被P21, P27/ketalCDIs系列中的成员所调节^[21,22]. 因为细胞周期素在调控细胞周期程序变化中起着非常重要的作用, 控制着细胞周期及细胞增殖, 并有证据证明细胞周期素及与其相关的基因在癌症中的作用^[23,24]. cyclin E的过度表达可引起P27 kipl基因的减少. 本实验中cyclin E蛋白阳性的33例胃癌组织中P27表达阳性8例(24.2%). cyclin E蛋白阴性的21例胃癌组织中P27表达阳性12例(57.1%, $P < 0.05$, $r = -0.332$), 说明二者之间呈显著的负相关. P27蛋白表达越低cyclin E表达越高, P27蛋白表达下调和cyclin E表达上调共同促进肿瘤进展.

cyclin D₁是由位于11q13的CCND₁基因编码的蛋白, 由259个氨基酸组成, 其相对分子质量为34 kDa. cyclin D₁与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)结合, 使视网膜母细胞瘤易感因子(Rb)发生磷酸化, 其构象发生改变而与转录活化因子(E2F)分离, E2F被释放而发挥转录因子效应, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡而癌变^[25]. 本实验中cyclin D₁蛋白阳性的31例胃癌组织中P27表达阳性9例(32.1%). cyclin D₁蛋白阴性的23例胃癌组织中P27表达阳性11例(47.8%, $P > 0.05$), 说明cyclin D₁表达与P27蛋白的表达无相关性.

目前对P27的研究表明, P27蛋白在静止期细胞高表达, 一旦细胞受增殖原刺激, 细胞内

P27蛋白快速下调, 因而认为P27介导了细胞外负性增殖信号向细胞内传导^[26-27]. P27在某些恶性肿瘤中表达降低^[28], 其蛋白表达与反映肿瘤转移恶性生物学行为的指标呈负相关, 说明P27不但可作为反映肿瘤恶性表型的一个指标, 而且可作为恶性肿瘤的重要预后因素, 帮助临床选择易于复发、转移的高危患者, 提高治疗率和生存率. 外源性P27基因可作为目的基因用于肿瘤的基因治疗, 在这方面也有相关报道, 如将外源性P27基因导入星形胶质瘤细胞, 可使外源性P27基因在这些肿瘤细胞内高表达^[29], 明显抑制肿瘤的生长. P27可以抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡及分化成熟, 并且其对细胞增殖的抑制作用强于其家庭成员P21. 因此, 对于肿瘤及其他一些以增殖为病理基础的疾病, P27基因有可能作为一个目的基因^[30], 用于对这些疾病的基因治疗. 然而P27基因及蛋白除具有目前已知的作用外, 他是否还有其他生物作用? 他又是通过何种途径发挥其生物学作用? 各途径间的相互关系如何? P27在胃癌发生发展过程中是如何作用的? 胃癌中P27失活机制如何? 以上问题的解决, 将使P27的作用机制及失活机制更加明了, 从而使人工调节P27表达水平及外部干涉P27作用通路成为可能, 这将为胃癌的基因治疗特别是联合多项基因治疗提供广阔的前景.

4 参考文献

- 1 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of P27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 2 Toyoshima H, Hunter T. P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74
- 3 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. P27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22
- 4 Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD. Assignment of the human P27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995; 55: 1206-1210
- 5 Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995; 267: 1018-1021
- 6 Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of P27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9138-9148
- 7 Worm J, Bartkova J, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J, Bartek J, Guldberg P. Aberrant P27Kip1 promoter methylation in malignant melanoma. *Oncogene* 2000; 19: 5111-5115
- 8 Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R, Freedman LP, Sonenshein GE. Repression of transcription of the P27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 2001; 20: 1688-1702
- 9 Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27. *Science* 1995; 269: 682-685
- 10 Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27. *EMBO J* 1997; 16: 5334-5344
- 11 Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hattay Y, Simpson J, Wilczynski S. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene P27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-2269
- 12 Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M. The cell cycle inhibitor P27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 1259-1263
- 13 Qian X, Jin L, Grande JP, Lloyd RV. Transforming growth factor-beta and P27 expression in pituitary cells. *Endocrinology* 1996; 137: 3051-3060
- 14 Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH Jr, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chaiur DS, Pagano M, Loda M. Loss or altered subcellular localization of P27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 1730-1735
- 15 Lechpammer M, Xu X, Ellis FH, Bhattacharaya N, Shapiro GI, Loda M. Flavopiridol reduces malignant transformation of the esophageal mucosa in P27 knockout mice. *Oncogene* 2005; 24: 1683-1688
- 16 Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271: C982-C993
- 17 Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguella K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991; 66: 1217-1228
- 18 Ge JR, Ren GP, Yao HP. Expression of cyclin D1 and P27kip1 in renal cell carcinoma and its significance. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixue Ban* 2007; 36: 483-487
- 19 Nowee ME, Dorsman JC, Piek JM, Kosma VM, Hamalainen K, Verheijen RH, van Diest PJ. HER-2/neu and P27Kip1 in progression of Fallopian tube carcinoma: an immunohistochemical and array comparative genomic hybridization study. *Histopathology* 2007; 51: 666-673
- 20 Geisen C, Moroy T. The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 39909-39918
- 21 Fujita M, Takeshita H, Sawa H. Cyclin E and CDK2 repress the terminal differentiation of quiescent cells after asymmetric division in *C. elegans*. *PLoS ONE* 2007; 2: e407
- 22 Iacovelli J, Lopera J, Bott M, Baldwin E, Khaled A,

■同行评价
本文设计合理, 结果可信, 有一定的参考价值.

- Uddin N, Fernandez-Valle C. Serum and forskolin cooperate to promote G1 progression in Schwann cells by differentially regulating cyclin D1, cyclin E1, and P27Kip expression. *Glia* 2007; 55: 1638-1647
- 23 Nauman A, Turowska O, Poplawski P, Master A, Tanski Z, Puzianowska-Kuznicka M. Elevated cyclin E level in human clear cell renal cell carcinoma: possible causes and consequences. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 595-602
- 24 Keck JM, Summers MK, Tedesco D, Ekholm-Reed S, Chuang LC, Jackson PK, Reed SI. Cyclin E overexpression impairs progression through mitosis by inhibiting APC(Cdh1). *J Cell Biol* 2007; 178: 371-385
- 25 Takasu S, Tsukamoto T, Ushijima T, Yamashita S, Ogasawara N, Ban H, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M. Cyclin D1 overexpression in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric adenocarcinomas. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59: 171-175
- 26 Denicourt C, Saenz CC, Datnow B, Cui XS, Dowdy SF. Relocalized P27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res* 2007; 67: 9238-9243
- 27 Besson A, Hwang HC, Cicero S, Donovan SL, Gurian-West M, Johnson D, Clurman BE, Dyer MA, Roberts JM. Discovery of an oncogenic activity in P27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev* 2007; 21: 1731-1746
- 28 Cianga C, Cianga P, Cozma L, Diaconu C, Carasevici E. Low P27(Kip1) expression is associated with poor prognostic factors in breast carcinomas. *J BUON* 2002; 7: 117-120
- 29 Chen J, Willingham T, Shuford M, Nisen PD. Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27KIP1. *J Clin Invest* 1996; 97: 1983-1988
- 30 Nickeleit I, Zender S, Kossatz U, Malek NP. P27kip1: a target for tumor therapies? *Cell Div* 2007; 2: 13

编辑 何燕 电编 刘勇

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1-11月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-11-28, 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 2007-11-28)

肝癌组织DNA-PKcs过量表达及其靶向siRNA分子的抗增殖作用

余子建, 徐勤枝, 周丽君, 隋建丽, 张士猛, 安静, 王豫, 周平坤

余子建, 南华大学附属第一医院普外科 湖南省衡阳市 421001
徐勤枝, 隋建丽, 张士猛, 安静, 王豫, 周平坤, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所放射毒理与肿瘤研究室 北京市 100850
周丽君, 中国人民解放军海军总医院中心实验室 北京市 100037
余子建, 主任医师, 教授, 主要从事临床肝胆外科和实验肿瘤研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30500267, 30672429
北京市自然科学基金资助项目, No. 7072057
湖南省卫生厅基金课题资助项目, No. C2005038
通讯作者: 周平坤, 100850, 北京市, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所放射毒理与肿瘤研究室. zhoupk@nic.bmi.ac.cn
电话: 010-66931217
收稿日期: 2007-06-13 修回日期: 2007-11-25

Over-expression of DNA-PKcs in hepatocarcinoma tissues and the antiproliferative effect mediated by down-regulating its expression with siRNA

Zi-Jian Yu, Qin-Zhi Xu, Li-Jun Zhou, Jian-Li Sui, Shi-Meng Zhang, Jing An, Yu Wang, Ping-Kun Zhou

Zi-Jian Yu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Qin-Zhi Xu, Jian-Li Sui, Shi-Meng Zhang, Jing An, Yu Wang, Ping-Kun Zhou, Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Li-Jun Zhou, Center of Clinical Laboratory, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500267, 30672429, and the Natural Science Foundation of Beijing City, No. 7072057, and the Hunan Provincial Bureau of Health, No. C2005038

Correspondence to: Ping-Kun Zhou, Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China. zhoupk@nic.bmi.ac.cn

Received: 2007-06-13 Revised: 2007-11-25

Abstract

AIM: To characterize the difference in DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) expression between hepatocarcinoma tissues and non-tumor liver tissues, and to understand the biological significance of the altered expression of DNA-PKcs in cancer cells.

METHODS: DNA-PKcs expression was exam-

ined in 86 specimens of hepatocarcinoma and hepatic cholangiocarcinoma by immunohistochemistry analysis on tissue-arrays and ordinary pathological tissue slices. DNA-PKcs protein was detected in culture cells by Western blotting analysis. The siRNA was used to silence DNA-PKcs expression in HepG2 cells. Cell proliferation was evaluated by growth curve analysis, and radiosensitivity was tested using a colony-forming ability assay.

RESULTS: Tissue-array analysis showed that the proportions of cases with a DNA-PKcs expression level of < 25% (very low), 25%-50% (low), 51%-75% (medium) and > 75% (high) were 15%, 20%, 23.3% and 41.7%, respectively, among the 60 hepatocarcinoma tissue specimens. The proportions of the 64 normal liver tissues showing these DNA-PKcs expression levels were 68.7%, 10.9%, 12.6% and 7.8%, respectively. This result indicated that DNA-PKcs expression in cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P = 0.0008$). Immunohistochemistry analysis of ordinary pathological tissue slices also showed that DNA-PKcs levels in the hepatocarcinoma and hepatic cholangiocarcinoma tissues (total 26 specimens) were higher than those in the non-tumor liver tissues ($P = 0.001$). Moreover, the cultured human liver cancer cell lines HepG2, 7721 and 7402 also exhibited much higher levels of DNA-PKcs than normal liver LO2 cells. Silencing of DNA-PKcs mediated by siRNA resulted in not only an increased sensitivity of HepG2 cells to ionizing radiation, but also decreased proliferation of HepG2 cells. We further demonstrated that the expression of c-Myc oncoprotein was also depressed following the down-regulation of DNA-PKcs.

CONCLUSION: DNA-PKcs is overexpressed in hepatocarcinoma tissues as well as cultured liver cancer cells. Targeting DNA-PKcs is an anticancer strategy acting through at least two mechanisms: directly decreasing the proliferation of cancer cells via, at least, depressing c-Myc on-

■背景资料

DNA-PKcs与另外2个亚基Ku70和Ku80共同构成DNA-PK复合物,在DNA双链断裂非同源末端连接修复途径中发挥重要作用。有研究报道DNA-PKcs在脑部肿瘤、肺癌、乳腺癌、食管癌、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤组织细胞中高表达。本文也观察到DNA-PKcs异常高表达现象,而且DNA-PKcs在肝胆肿瘤组织中表达水平与肿瘤组织细胞的转移、侵袭性、恶性程度有显著的相关性。

■研发前沿

DNA-PKcs与肿瘤的关系如何,目前的报道存在两个极端:有研究认为DNA-PKcs是抑癌基因,在维持基因组稳定性中发挥着重要作用。另有研究发现由于DNA-PKcs具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性、并可磷酸化多种转录因子和癌基因产物,特别是在癌组织细胞中过量表达的发现,表明其很可能还有癌基因的功能。

coprotein; and sensitizing cancer cells to radiotherapy or chemotherapy with DNA-damaging agents.

Key Words: Hepatocarcinoma; DNA-PKcs; c-Myc; Tissue array; Small interfering RNA; Cell proliferation; Radiosensitization

Yu ZJ, Xu QZ, Zhou LJ, Sui JL, Zhang SM, An J, Wang Y, Zhou PK. Over-expression of DNA-PKcs in hepatocarcinoma tissues and the antiproliferative effect mediated by down-regulating its expression with siRNA. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3815-3821

摘要

目的: 研究肝癌组织中DNA依赖蛋白激酶催化亚基DNA-PKcs的表达差异及其生物学意义。

方法: 用组织芯片和免疫组化法检测肝胆癌组织86例,肝胆管结石切除肝组织17例标本和正常肝组织70例中DNA-PKcs蛋白表达情况,Western blot检测培养细胞中DNA-PKcs表达,Lipofectamine 2000介导DNA-PKcs的siRNA质粒DNA转染,细胞生长曲线分析细胞增殖,克隆形成法分析细胞辐射敏感性。

结果: 组织芯片检测显示,60例肝癌组织细胞中DNA-PKcs阳性表达率<25%(极低表达),25%-50%(低表达),51%-75%(中等表达)和>75%(高表达)分别占15%,20%,23.3%和41.7%,而64例正常肝组织中各DNA-PKcs阳性表达率分别为68.7%,10.9%,12.6%和7.8%,表明癌组织DNA-PKcs的表达水平显著高于正常组织($P = 0.0008$)。26例肝癌组织病理切片的免疫组化结果也显示,其DNA-PKcs表达水平显著高于23例非肿瘤性肝组织($P = 0.001$)。Western blot检测结果显示,体外培养的肝癌细胞HepG2,7721和7402中DNA-PKcs表达水平,同样显著高于正常肝细胞LO2。siRNA分子靶向抑制DNA-PKcs表达,不但显著提高HepG2细胞对电离辐射的敏感性,同时还降低肝癌细胞的增殖速度。随着DNA-PKcs表达的抑制,癌基因c-Myc蛋白表达水平也显著降低。

结论: 肝癌组织细胞中DNA-PKcs表达水平显著高于正常肝组织和非肿瘤性肝病理组织,siRNA抑制DNA-PKcs表达,具有抗癌细胞增殖和放射增敏作用,c-Myc蛋白表达抑制可能是其抗增殖作用的相关机制之一。

关键词: 肝癌; DNA-PKcs; c-Myc; 组织芯片; 小干扰RNA; 细胞增殖; 放射增敏

余子建, 徐勤枝, 周丽君, 隋建丽, 张士猛, 安静, 王豫, 周平坤. 肝癌组织DNA-PKcs过量表达及其靶向siRNA分子的抗增殖作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3815-3821

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3815.asp>

0 引言

DNA依赖蛋白激酶催化亚基(DNA dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs)属于磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)家族蛋白,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性^[1]。DNA-PKcs与另外2个亚基Ku70和Ku80共同构成DNA-PK复合物,在DNA双链断裂非同源末端连接修复(nonhomologous end-joining, NHEJ)途径中发挥重要作用。DNA-PKcs还具有参与V(D)J重组^[1]、维护染色体端粒末端稳定性功能^[2-3]。DNA-PKcs缺陷SCID小鼠和缺陷细胞对电离辐射的敏感性显著增加。由于DNA-PKcs具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,能磷酸化多种蛋白底物^[4-7],如P53,转录因子Sp1,组蛋白H2AX, DNA修复蛋白XRCC4,原癌基因c-jun, c-Myc和c-fos等,显示其是一重要的功能蛋白。

近年来,不断有研究报道DNA-PKcs在脑部肿瘤、肺癌、乳腺癌、食管癌、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤组织细胞中高表达^[7-14]。我们实验室前期研究中,在非小细胞肺癌^[11]和肝胆肿瘤组织^[12]中也观察到DNA-PKcs异常高表达现象,而且DNA-PKcs在肝胆肿瘤组织中表达水平与肿瘤组织细胞的转移或侵袭性、恶性程度有显著的相关性。因此,DNA-PKcs在肿瘤组织中的过量表达的生物学意义,非常值得关注。最近,我们利用siRNA干扰技术沉默人宫颈癌HeLa细胞中DNA-PKcs表达,发现癌基因c-Myc蛋白的表达水平也显著下降^[15],同时部分c-Myc蛋白转录调控靶基因如P21, P27和NDRG1以及其他一些细胞增殖调控相关基因的表达水平也发生改变^[16]。这些结果提示,DNA-PKcs过量表达可能赋予了其新的生物学功能,并具有做为潜在肿瘤标志物和抗癌分子靶标意义。我们采用可靠性更佳的组织芯片技术,结合siRNA干扰技术和肝癌细胞系的研究,进一步研究了我国肝癌患者癌组织细胞中DNA-PKcs表达状况,并探讨DNA-PKcs在肝癌细胞中过表达的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌组织芯片购自陕西超英生物科技有限公司(西安),南华大学附属第一医院普外

科和北京军区总医院病理科肝细胞肝癌和肝内胆管肝癌26例, 肝胆管结石或并发炎症17例, 肝破裂(外伤、囊肿)6例. 病理组织进行石蜡包埋切片. 正常肝细胞LO2、肝癌细胞HepG2, 7721和7402在含100 mL/L新生牛血清的DMEM培养液中培养. DNA-PKcs特异siRNA表达载体及siRNA序列已在前文发表^[15], 其中siRNA-H1和siRNA-H2作用的DNA-PKcs靶序列分别位于该基因的编码催化活性区(11 637-11 655)和功能域间区(12 321-12 339), siRNA-NC阴性对照序列由Ambion公司提供.

1.2 方法 质粒DNA转染前24 h, 接种 5×10^5 HepG2细胞于60 mm的培养皿中, 经Lipofectamine 2000介导DNA-PKcs的siRNA质粒转染HepG2细胞(按试剂盒说明操作). 转染后48 h按 1×10^5 个细胞接种于60 mm的培养皿中, 潮霉素B筛选阳性克隆(250 mg/L), 每3 d更换培养液, 筛选阳性克隆细胞扩大培养, Western blot免疫印迹杂交实验确证. 同时设一阴性对照, 即将与人类编码基因序列无同源性的片段与载体连接转染细胞. 石蜡切片常规法脱蜡至水后, 在30 mL/L的 H_2O_2 溶液中室温温育5-10 min, 消除内源性过氧化物酶活性. 石蜡切片或组织芯片用蒸馏水冲洗并PBS浸泡5 min后, 置于1 mmol/L EDTA(pH8.0)和0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中, 92℃-98℃持续10-15 min进行抗原修复. 滴加含50 mL/L山羊血清工作液稀释的DNA-PKcs抗体(H-163, SC-9051, Santa Cruz公司)(1:50), 4℃过夜. 切片经PBS清洗3次后, 滴加辣根酶标记链卵白素二抗工作液(PV6001, Zymed Laboratories Inc), 37℃温育30 min. DAB显色剂显色后, 苏木精复染, 封片. 显微镜下观察免疫组化染色后的病理切片, 用Mias2000病理工作站图像分析仪记录结果. DNA-PKcs为核蛋白, 细胞核被染成棕黄色的即为阳性表达细胞. 对组织芯片的每一个组织块点或每一张病理切片随机计数5个视野($\times 200$)中DNA-PKcs表达阳性细胞比率. 根据阳性表达率分为4组: <25%(极低表达组), 25%-50%(低表达组), 51%-75%(中等表达组), >75%(高表达组). 数据经统计学 χ^2 检验.

1.2.1 细胞生长和存活率: 胰酶消化、离心收集细胞, 制成细胞悬液, 细胞计数后, 以每孔 1×10^4 接种于24孔板中, 于37℃, 50 mL/L CO_2 培养箱中常规培养. 每天每组细胞取3个孔, 消化后用盼蓝染色, 细胞计数求均值, 绘制生长曲线, 实验重复4次. 采用集落克隆形成率法检测照射细

胞的存活率. 胰酶消化、离心收集对数生长期细胞, 制成一定浓度的细胞悬液, 用 ^{60}Co γ 射线室温下照射不同剂量(剂量率为2.0 Gy/min). 照后即刻根据不同的照射剂量, 接种一定数量的细胞于60 mm直径的培养皿, 每个剂量组3个皿, 置于37℃, 50 mL/L CO_2 孵箱中培养12 d. PBS洗2次, 750 mL/L乙醇固定30-60 min, 自然晾干后Giemsa染色, 计数细胞克隆数(计数 ≥ 50 个细胞的单克隆). 根据接种细胞数进行校正、计算出细胞存活率. 实验重复3次.

1.2.2 免疫印迹(Western blot)分析: 将筛选出的阳性克隆挑出后继续培养, 潮霉素B浓度减半(125 mg/L), 收集细胞用Lysis buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 10 mg/L Noridet P40, 5 mg/L 脱氧胆酸钠, 150 mmol/L NaCl, 蛋白酶抑制剂片剂1片/50 mL Lysis buffer)提取细胞总蛋白, 经考马斯亮兰染色法定量蛋白. 取20 μ g总蛋白上样, 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转移到PVDF膜上; 50 mg/L脱脂奶粉室温封闭1-2 h, 与一抗DNA-PKcs抗体(H-163, SC-9051, Santa Cruz公司)或c-Myc蛋白抗体(9E10, Santa Cruz公司)室温作用1-2 h, 然后与辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用1 h后显影.

统计学处理 SAS 6.12统计软件包进行分析, 配对资料 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 DNA-PKcs在肝胆管癌组织细胞中的表达分析 在该组织芯片中的每例肝癌组织点旁都有相应的正常肝组织做对照. 用普通相机直接拍照或肉眼直观就可看出, 肿瘤组织的免疫组化染色的着色深度, 明显强于正常肝组织(图1A). 显微镜下可更清晰显示出肝癌组织细胞中DNA-PKcs表达水平显著高于正常肝组织细胞(图1B). 肝癌60例中DNA-PKcs阳性表达率水平为 $\leq 25\%$ (极低表达组), 26%-50%(低表达组), 51%-75%(中等表达组), >75%(高表达组)的分别有9例(15%), 12(20%), 14(23.3%), 25(41.7%); 而正常肝组织64例中, 各DNA-PKcs阳性表达率组分别有44例(68.7%), 7(10.9%), 8(12.6%), 5(7.8%). 可见60%以上个体的正常肝组织中DNA-PKcs为极低表达水平, 而肝癌组织中DNA-PKcs的表达阳性率很高, 其中12例患者肝癌组织的DNA-PKcs阳性率细胞超过95%(图1C). 正常肝细胞与肝癌细胞之间DNA-PKcs的表达差异具有显著的统计学意义(χ^2 检验,

■相关报道

Tonotsuka *et al*发现在正常食道上皮层, 只有基底细胞表达DNA-PKcs, 且DNA-PKcs定位在细胞核. 而在食道癌组织中, DNA-PKcs的表达丰度明显高于正常食道上皮, 但表达丰度和细胞定位有异质性, 表明不同分化和进展期的细胞其DNA-PKcs的活性不同. Lee *et al*发现DNA-PKcs在正常的胃黏膜上皮不表达, 但在*H. pylori*相关的胃炎组织、胃上皮肠化生和胃腺瘤组织中呈阳性表达, 79.8%(450/564)的胃癌组织表达DNA-PKcs. 但相关性分析发现DNA-PKcs表达阴性与肿瘤进展和临床预后差显著相关, 提示DNA-PKcs是一种肿瘤抑癌基因. 此结果与本文的结论相反, 推测原因之一是DNA-PKcs作为一把双刃剑, 在不同组织中的作用有选择性, DNA-PKcs缺失导致的DNA损伤修复缺陷, 导致胃癌患者预后差.

■创新盘点

本文建立了siRNA抑制肝癌细胞HepG2中DNA-PKcs表达的细胞模型,发现siRNA沉默DNA-PKcs表达后,肝癌细胞的增殖速度明显减慢、辐射敏感性显著增加。与此同时,进一步证实了DNA-PKcs对c-Myc蛋白表达水平的调节作用,提示DNA-PKcs对细胞增殖的影响至少有部分原因是通过调节c-Myc蛋白表达水平实现的。本文的观察结果为阐述DNA-PKcs在癌细胞中过量表达的生物化学意义和作用机制提供了重要的线索。

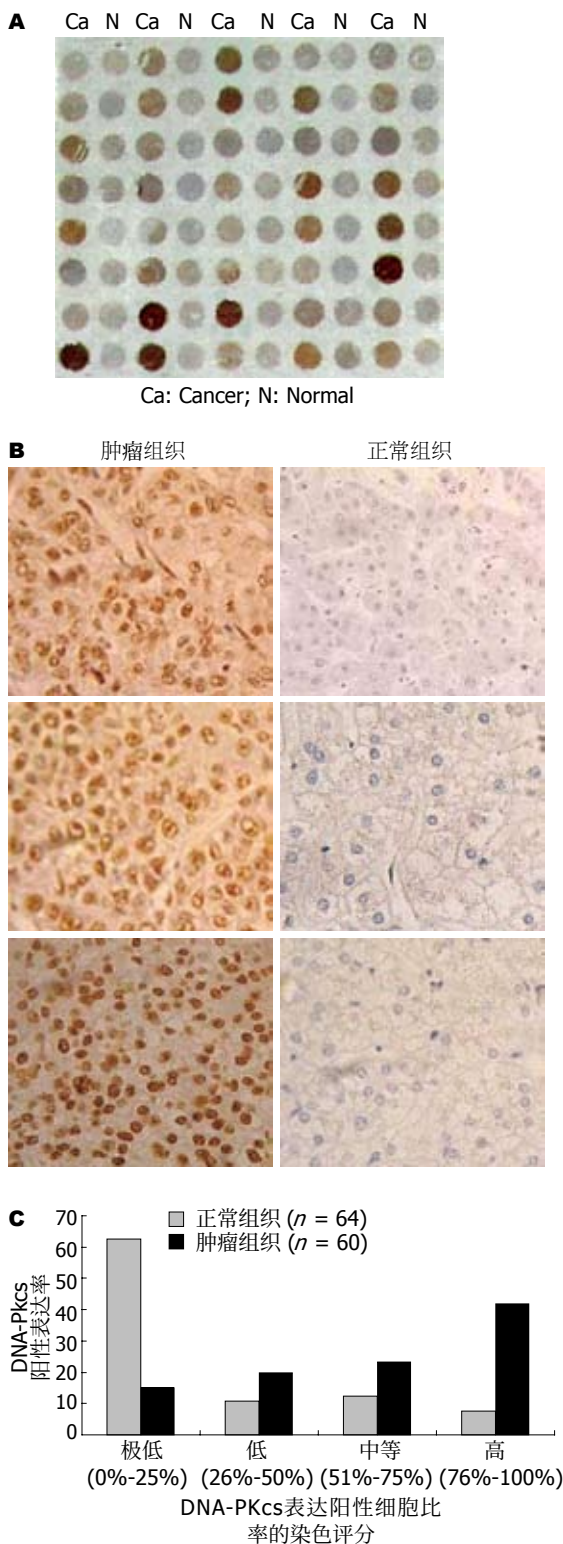


图1 组织芯片免疫组化分析肝组织中DNA-PKcs的表达。A: 组织芯片免疫组化结果的直观图像; B: 部分组织DNA-PKcs表达的显微镜下观察图像(苏木素×100); C: 组织芯片免疫组化的定量分析。

$P = 0.0008$). 肝癌组织除DNA-PKcs阳性表达细胞率明显上升外, 阳性细胞的免疫组化染色深度也显著增强(图1B). 我们还显示癌组织中DNA-PKcs表达水平显著增加(表1).

表1 肝胆管病理组织DNA-PKcs的表达($n = 49$)

组织	n	DNA-PKcs阳性表达率的例数			
		<25%	25%~50%	51%~75%	>75%
肝癌	26	0	2	5	19
肝胆管结石 ^b	17	9	5	2	1
肝破裂 ^b	6	4	2	0	0

^b $P < 0.01$ vs 肝癌(χ^2 检验).

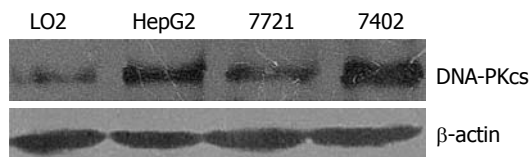


图2 Western blot检测肝癌细胞HepG2, 7721, 7402和正常肝细胞LO2中DNA-PKcs表达。

2.2 培养细胞系中DNA-PKcs表达 肝癌细胞HepG2, 7721, 7402中DNA-PKcs表达水平均明显高于正常肝细胞LO2(图2). 细胞转染DNA-PKcs特异的siRNA表达质粒siRNA-H1或siRNA-H2后, 分别筛选和鉴定出稳定转染克隆细胞系HepG2-H1和HepG2-H2. 提取细胞总蛋白, Western blot检测结果显示, 特异siRNA转染细胞HepG2-H1和HepG2-H2中DNA-PKcs表达水平显著低于转染非特异对照质粒的细胞HepG2-NC(图3A). 与此同时, HepG2-H1和HepG2-H2中癌基因c-Myc蛋白表达水平也显著降低(图3A).

2.2 siRNA抑制DNA-PKcs表达对HepG2细胞增殖和辐射敏感性的影响 特异siRNA抑制DNA-PKcs表达后, HepG2-H1和HepG2-H2细胞的增殖速度与对照HepG2-NC细胞相比, 明显减慢(图3B). 随着⁶⁰Co γ射线照射剂量的增加, 细胞存活率不断降低. 相比之下, DNA-PKcs表达抑制的HepG2-H1细胞对电离辐射的敏感性, 要显著高于对照细胞HepG2-NC(图3C), 如2Gy照射后两株细胞的存活率(SF2)相差7倍, 分别为4.8%和34%.

3 讨论

DNA-PKcs是一重要的DNA双链断裂损伤修复基因, 可以修复辐射或化疗药物导致的肿瘤细胞DNA双链断裂, 使肿瘤细胞具有抗放射治疗和化疗耐受的能力, 因此肿瘤细胞DNA-PKcs的活性已成为临床肿瘤患者治疗方案选择要考虑的因素之一^[17-23]. 我们研究也发现DNA-PKcs缺失的肝癌细胞, 其放射敏感性增强, 提示DNA-PKcs可以作为辐射增敏治疗的靶标. DNA-PKcs

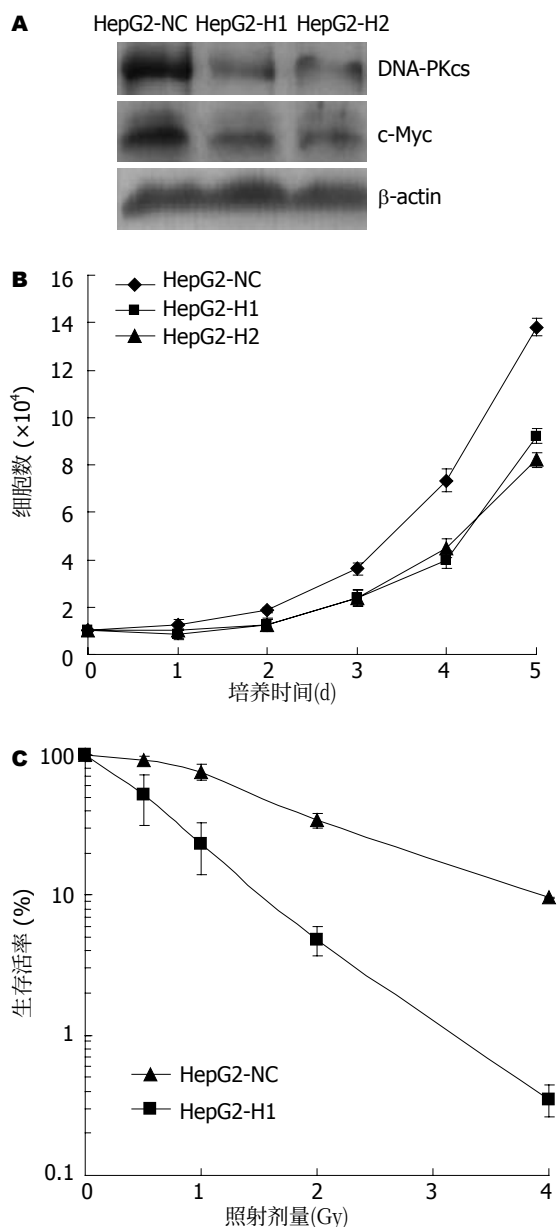


图3 siRNA沉默DNA-PKcs表达及对c-Myc蛋白表达和细胞增殖的影响。A: Western blot检测DNA-PKcs和c-Myc蛋白表达; B: 细胞生长曲线; C: γ 射线照射后细胞存活曲线。HepG2-NC: 转染对照质粒的细胞, HepG2-H1和HepG2-H2为转染表达DNA-PKcs特异siRNA分子质粒DNA的细胞。

与肿瘤的关系如何, 目前的报道存在两个极端: 有研究认为DNA-PKcs除DNA修复和V(D)J重组功能外, DNA-PKcs还具有维持染色体末端稳定性的作用, 因此被认为是抑癌基因, 在维持基因组稳定性中发挥着重要作用^[2-3]。Someya *et al*^[24]检测了93例未经治疗的肿瘤患者和41例健康志愿者外周血淋巴细胞中DNA-PKcs的活性, 结果发现宫颈癌和乳腺癌肿瘤患者的DNA-PKcs的活性显著低于健康志愿者, 且随着DNA-PKcs的活性降低, 染色体异常如双着丝

粒、染色体碎片数量增加, 表明DNA-PKcs活性减弱后, 增加了罹患肿瘤的危险度^[24]。另有研究发现由于DNA-PKcs具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性、并可磷酸化多种转录因子和癌基因产物, 特别是其在癌组织细胞中过量表达的发现, DNA-PKcs很可能还有癌基因的功能。我们通过组织芯片和组织病理的免疫组化分析, 进一步揭示DNA-PKcs在我国肝癌患者的癌组织细胞中过量表达, 而且体外培养细胞的分析结果也显示肝癌细胞中DNA-PKcs表达水平显著高于正常肝细胞。DNA-PKcs蛋白在癌组织中过量表达, 与肿瘤或癌组织的恶性度相关, 提示DNA-PKcs可能具有癌基因的作用^[12,25]。Tonotsuka *et al*^[14]也发现在正常食道上皮层, 只有基底细胞表达DNA-PKcs, 且DNA-PKcs定位在细胞核。而在食道癌组织中, DNA-PKcs的表达丰度明显高于正常食道上皮, 但表达丰度和细胞定位有异质性, 表明不同分化和进展期的细胞其DNA-PKcs的活性不同^[14]。Lee *et al*^[26]应用免疫组化的方法检测非肿瘤性的胃黏膜组织122例、胃腺瘤115例和胃癌切除标本564例, 结果发现DNA-PKcs在正常的胃黏膜上皮不表达, 但在*H. pylori*相关的胃炎组织、胃上皮肠化生和胃腺瘤组织中呈阳性表达, 79.8%(450/564)的胃癌组织表达DNA-PKcs。但相关性分析发现DNA-PKcs表达阴性与肿瘤进展和临床预后差显著相关, 提示DNA-PKcs是一种肿瘤抑癌基因。此结果与我们的结论相反, 推测原因之一是DNA-PKcs作为一把双刃剑, 在不同组织中的作用有选择性, DNA-PKcs缺失导致的DNA损伤修复缺陷, 导致胃癌患者预后差^[26]。

此外, DNA-PKcs除在肿瘤组织细胞中异常高表达外, 还有研究显示, 成熟发育不同时期的细胞或不同增殖活性细胞中DNA-PKcs的表达水平也存在明显的差异^[27-29], 如生殖细胞减数分裂前DNA-PKcs表达明显高于减数分裂后, 而一些没有增殖能力的细胞如Sertoli细胞和Leydig细胞根本不表达DNA-PKcs或非常微弱表达^[27]。增殖活跃的成纤维细胞中DNA-PKcs表达水平显著高于处于静止期的成纤维细胞^[28]。以上均提示DNA-PKcs与细胞增殖活性存在关系, 但其具体机制还不是很清楚。有研究利用基因芯片技术发现, 与DNA-PKcs活性有关的基因大都参与细胞周期调控, 如转录因子E2F1与DNA-PKcs活性正相关, 而E2F1的负调控因子Rbp130则与DNA-PKcs活性呈负相关。当用PHA刺激外周血

应用要点
DNA-PKcs是一重要的DNA双链断裂损伤修复基因, 可以修复辐射或化疗药物导致的肿瘤细胞DNA双链断裂, 使肿瘤细胞具有抗放射治疗和化疗耐受的能力, 因此肿瘤细胞DNA-PKcs的活性已成为临床肿瘤患者治疗方案选择要考虑的因素之一。本文研究也发现DNA-PKcs缺失的肝癌细胞, 其放射敏感性增强, 提示DNA-PKcs可作为潜在肿瘤标志物和抗癌分子靶标意义的靶标。

■名词解释

DNA双链断裂非同源末端连接修复(NHEJ): DNA双链断裂损伤(DSBs)的修复反应是一个多步骤的复杂过程,由多个功能蛋白复合物的交替联合,构成一个完整的修复器(repair machine)来执行功能。在真核细胞中,DSBs修复主要通过两种途径来完成:非同源末端连接(NHEJ)和同源重组(HR)。在NHEJ修复途径中,首先DNA-PK蛋白复合物(Ku70/Ku80/DNA-PKcs)被募集到DNA断裂位点并被激活,并进一步募集和活化其他修复功能蛋白如MRN, Artemis, Fcml等(包括一些不清楚的成分)形成复合物,对“dirty”断裂末端做适当的修剪处理后再募集XRCC4/连接酶IV等,进行连接修复反应。其中的Fcml具有核酸内切酶活性;MRN复合物兼有内切酶/外切酶/解旋酶活性;Artemis具有单链特异的外切核酸酶活性,也参与末端修剪。

淋巴细胞时, E2F1活性增加, 具有促进细胞增殖, 同时可检测到DNA-PKcs活性增加^[30], 提示DNA-PKcs参与细胞增殖的调控。

我们实验室前期利用siRNA干扰技术和抑制剂wortmannin抑制HeLa细胞中DNA-PKcs表达, 发现癌基因c-Myc蛋白表达水平也显著降低, 但其mRNA表达水平不受影响, 提示DNA-PKcs具有调节癌基因c-Myc蛋白表达的功能^[15]。为了对此做更广泛的研究, 我们又建立了siRNA抑制肝癌细胞HepG2中DNA-PKcs表达的细胞模型, 进一步证实了DNA-PKcs对c-Myc蛋白表达水平的调节作用。与此同时, siRNA沉默DNA-PKcs表达后, 肝癌细胞的增殖速度明显减慢、辐射敏感性显著增加。c-Myc蛋白与细胞增殖调控和癌症的发生发展有密切的联系, 甚至在动物模型上, 诱导c-Myc单一基因的表达就能诱发肝癌, 反过来, 抑制c-Myc基因表达能促使肝癌细胞的分化^[31]。因此, DNA-PKcs对细胞增殖的影响至少有部分原因是通过调节c-Myc蛋白表达水平实现的。我们的观察结果为阐述DNA-PKcs在癌细胞中过量表达的生物学意义和作用机制提供了重要的线索。至于DNA-PKcs是如何调控c-Myc蛋白水平的, 我们利用siRNA沉默HeLa细胞DNA-PKcs表达的细胞模型对此做了初步研究, 显示c-Myc蛋白稳定性随DNA-PKcs表达抑制而降低(待发表结果), 更深入的分子调控机制正在探讨之中。

4 参考文献

- Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23: 687-696
- Bailey SM, Brennen MA, Halbrook J, Nickoloff JA, Ullrich RL, Goodwin EH. The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 225-233
- Hande MP. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 116-122
- Iijima S, Teraoka H, Date T, Tsukada K. DNA-activated protein kinase in Raji Burkitt's lymphoma cells. Phosphorylation of c-Myc oncoprotein. *Eur J Biochem* 1992; 206: 595-603
- Karmakar P, Piotrowski J, Brosh RM Jr, Sommers JA, Miller SP, Cheng WH, Snowden CM, Ramsden DA, Bohr VA. Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase *in vivo* and *in vitro*, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277: 18291-18302
- Tuteja R, Tuteja N. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 1-33
- Sakata K, Matsumoto Y, Satoh M, Oouchi A, Nagakura H, Koito K, Hosoi Y, Hareyama M, Suzuki N. Clinical studies of immunohistochemical staining of DNA-dependent protein kinase in oropharyngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Radiat Med* 2001; 19: 93-97
- Stronati L, Gensabella G, Lamberti C, Barattini P, Frasca D, Tanzarella C, Giacobini S, Toscano MG, Santacroce C, Danesi DT. Expression and DNA binding activity of the Ku heterodimer in bladder carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2484-2492
- Shintani S, Mihara M, Li C, Nakahara Y, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 894-900
- Nguyen DC, Parsa B, Close A, Magnusson B, Crowe DL, Sinha UK. Overexpression of cell cycle regulatory proteins correlates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2003; 22: 1285-1290
- 隋建丽, 孙敬芬, 曹珍山, 周平坤, 吴德昌. DNA依赖蛋白激酶在人支气管上皮细胞癌变株和肺癌组织中的异常表达. *中国体视学与图像分析* 2003; 8: 141-145
- 余子建, 隋建丽, 丁映钦, 曹珍山, 周平坤, 吴德昌. 肝胆肿瘤组织中DNA依赖蛋白激酶的表达及意义. *中华肝病杂志* 2004; 12: 652-655
- Hosoi Y, Watanabe T, Nakagawa K, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nagawa H, Suzuki N. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2004; 25: 461-468
- Tonotsuka N, Hosoi Y, Miyazaki S, Miyata G, Sugawara K, Mori T, Ouchi N, Satomi S, Matsumoto Y, Nakagawa K, Miyagawa K, Ono T. Heterogeneous expression of DNA-dependent protein kinase in esophageal cancer and normal epithelium. *Int J Mol Med* 2006; 18: 441-447
- An J, Xu QZ, Sui JL, Bai B, Zhou PK. Downregulation of c-myc protein by siRNA-mediated silencing of DNA-PKcs in HeLa cells. *Int J Cancer* 2005; 117: 531-537
- An J, Xu QZ, Sui JL, Bai B, Zhou PK. Silencing of DNA-PKcs alters the transcriptional profile of certain signal transduction genes related to proliferation and differentiation in HeLa cells. *Int J Mol Med* 2005; 16: 455-462
- Tian X, Chen G, Xing H, Weng D, Guo Y, Ma D. The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa. *Oncol Rep* 2007; 18: 927-932
- Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Bey EA, Boothman DA. Nonhomologous end joining is essential for cellular resistance to the novel antitumor agent, beta-lapachone. *Cancer Res* 2007; 67: 6936-6945
- Ogawa K, Boucher Y, Kashiwagi S, Fukumura D, Chen D, Gerweck LE. Influence of tumor cell and stroma sensitivity on tumor response to radiation. *Cancer Res* 2007; 67: 4016-4021
- Gerweck LE, Vijayappa S, Kurimasa A, Ogawa K, Chen DJ. Tumor cell radiosensitivity is a major determinant of tumor response to radiation. *Cancer Res* 2006; 66: 8352-8355
- Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang KK, Milas L. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 520-528
- Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo

- S, Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res* 2005; 65: 4368-4375
- 23 Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CU, Ullrich RL, Bailey SM, Liber HL. Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett* 2007; 250: 63-73
- 24 Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Yamamoto H, Monobe M, Ikeda H, Ando K, Hosoi Y, Suzuki N, Hareyama M. The association of DNA-dependent protein kinase activity with chromosomal instability and risk of cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 117-122
- 25 Holgersson A, Erdal H, Nilsson A, Lewensohn R, Kanter L. Expression of DNA-PKcs and Ku86, but not Ku70, differs between lymphoid malignancies. *Exp Mol Pathol* 2004; 77: 1-6
- 26 Lee HS, Choe G, Park KU, Park do J, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Altered expression of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) during gastric carcinogenesis and its clinical implications on gastric cancer. *Int J Oncol* 2007; 31: 859-866
- 27 Moll U, Lau R, Sypes MA, Gupta MM, Anderson CW. DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues. *Oncogene* 1999; 18: 3114-3126
- 28 Salminen A, Helenius M, Lahtinen T, Korhonen P, Tapiola T, Soininen H, Solovyan V. Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 712-716
- 29 Sallmyr A, Miller A, Gabdoulkhakova A, Safronova V, Henriksson G, Bredberg A. Expression of DNA-dependent protein kinase in human granulocytes. *Cell Res* 2004; 14: 331-340
- 30 Sakata K, Yamamoto H, Matsumoto Y, Someya M, Hareyama M. cDNA analysis of gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity. *Int J Oncol* 2007; 30: 413-420
- 31 Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop JM, Contag CH, Felsher DW. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431: 1112-1117

■同行评价
本文论文书写规范, 设计合理, 研究方法先进, 结果可靠, 结论合理, 是一篇非常有意义的基础研究论文。

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 ●

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)

Vimentin在胰腺癌细胞中的表达及临床意义

殷涛, 王春友, 熊炯炘, 陶京, 赵刚

■背景资料

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤, 临床治疗效果非常差, 探索胰腺癌的细胞起源可能具有重要意义。本文希望通过探讨胰腺祖细胞标记物vimentin在胰腺癌组织中的表达情况, 从而为胰腺癌的干细胞起源提供线索。

殷涛, 王春友, 熊炯炘, 陶京, 赵刚, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30571817

殷涛, 主治医师, 华中科技大学同济医学院协和医院胰腺外科, 主要从事胰腺病基础与临床的研究。

通讯作者: 王春友, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心。

chunyouwang52@126.com

电话: 027-63436281

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-11-28

Vimentin expression in pancreatic cancer and its clinical significance

Tao Yin, Chun-You Wang, Jiong-Xin Xiong, Jing Tao, Gang Zhao

Tao Yin, Chun-You Wang, Jiong-Xin Xiong, Jing Tao, Gang Zhao, Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571817

Correspondence to: Chun-You Wang, Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. chunyouwang52@126.com

Received: 2007-09-18 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of vimentin in pancreatic cancer and its significance.

METHODS: Vimentin expression was examined in 99 cases of pancreatic carcinoma with immunohistochemistry, and the relationship between vimentin expression and clinicopathology were analyzed. Vimentin expression was investigated by immunofluorescence and Western blot in three pancreatic cancer cells lines: Panc-1, AsPC-1 and BxPc-3. Transwell migration assay was used to analyze the migratory ability of different cells.

RESULTS: Vimentin was detected in 16 cases (16%) of pancreatic cancer. Significant correlation was detected between the expression of vimentin and lymph node metastasis ($P = 0.02$), distant metastasis ($P < 0.001$) and poor dedif-

ferentiation ($P = 0.002$). Vimentin was highly expressed in poorly differentiated pancreatic cancer cells, Panc-1. Besides, vimentin expression was correlated with *in vitro* cell migration.

CONCLUSION: Vimentin expression in pancreatic cancer cells has been identified. The histopathogenesis of pancreatic cancer may be correlated with stem cells. Vimentin may be a marker for predicting the malignancy of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Vimentin; Western blot

Yin T, Wang CY, Xiong JX, Tao J, Zhao G. Vimentin expression in pancreatic cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3822-3825

摘要

目的: 研究vimentin在胰腺癌细胞中的表达及意义。

方法: 采用免疫组织化学的方法检测99例胰腺癌组织中vimentin的表达, 并分析其与临床病理资料的关系。免疫荧光、Western blot分析不同胰腺癌细胞中vimentin的表达, Transwell侵袭小室法检测细胞的运动能力。

结果: 在99例胰腺癌组织中vimentin阳性16例(16%), vimentin的阳性表达和淋巴结转移($P = 0.02$)、远处转移($P < 0.001$)、肿瘤细胞的分化程度($P = 0.002$)存在明显的相关性。Vimentin在低分化的胰腺癌细胞Panc-1中呈高表达, 而在中分化和高分化的胰腺癌细胞AsPC-1和BxPc-3中表达较低。vimentin的表达和细胞体外运动能力相关。

结论: 胰腺祖细胞标记物vimentin在胰腺癌细胞中存在表达, 胰腺癌的发生和干细胞可能存在一定的联系, 并可能预测胰腺癌的恶性程度。

关键词: 胰腺癌; 波形蛋白; 免疫印迹

殷涛, 王春友, 熊炯炘, 陶京, 赵刚. Vimentin在胰腺癌细胞中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3822-3825

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3822.asp>

0 引言

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤, 具有极差的预后: 其5年生存率仅有3%-4%, 术后2年复发率高达95%。虽然经过多年的艰苦探索, 胰腺癌的临床治疗效果并不令人满意, 提示有必要从新的角度认识胰腺癌的起源。大量的研究表明: 胰腺癌的发生和胰管上皮细胞关系密切, 90%的胰腺癌和胰腺导管内皮瘤变(胰腺癌前病变)来源于胰管上皮, 同时胰腺癌细胞还表达导管细胞的表面标记^[1]。我们前期的研究发现: 胰腺新生过程中, 增殖的胰管上皮通过去分化表现出类似于干细胞特性, 从而在胰腺修复过程中发挥作用^[2]。我们推测, 胰腺癌的发生可能和胰腺干细胞之间存在联系。

由于肿瘤组织具有较大的异质性以及分化不成熟的特性, 一些较为原始的干细胞标记分子有可能在肿瘤组织中得到重新表达。胚胎发育和胰腺新生过程中, 增殖的胰管上皮可以高表达vimentin, vimentin有可能是一种处于增殖状态胰腺祖细胞的标记^[3]。为了进一步明确胰腺癌的发生和胰腺干细胞之间的关系, 我们通过免疫组化检测vimentin在胰腺癌组织中的表达情况, 同时分析vimentin在不同分化程度胰腺癌细胞中的表达, 以期对胰腺癌的起源提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 取自1998-03/2004-06武汉协和医院接受胰十二指肠切除住院患者术后的胰腺癌石蜡块标本。99例均经常规病理检查证实为胰腺癌, 其中有42例经病理证实有淋巴结转移, 57例无淋巴结转移; 19例发生远处转移; 高分化27例, 中分化30例, 低分化42例。男性42例, 女性57例。年龄从34-76(中位年龄58)岁。低分化胰腺癌细胞Panc-1、中分化胰腺癌细胞AsPC-1、高分化胰腺癌细胞BxPc-3购自ATCC(American Type Culture Collection)。三种细胞分别用含有100 mL/L新生牛血清(Gibco)的DMEM培养基(Gibco)、置于37℃, 50 mL/L CO₂的细胞培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化: 手术标本经5 μm厚连续切片。vimentin的免疫组化染色行链霉素亲和素-过氧化酶复合物法(SP法)。vimentin mAb(Sigma)工作液浓度为1:100, SP免疫组化试剂盒为Zymed公司产品, 实验程序严格按照说明书进行。TBS代替一抗作为阴性对照。vimentin阳性判断标准以

肿瘤细胞的胞质内出现棕黄色染色为阳性, 在显微镜下随机选取10个高倍视野, 每个视野计数50个细胞, 结果以阳性细胞数所占百分比来表示。考虑到vimentin阳性染色的肿瘤细胞非常少, 只要在肿瘤细胞中发现vimentin的阳性染色则判断为vimentin的阳性^[4]。

1.2.2 免疫荧光: 将细胞制成单细胞悬液, 接种于放有盖玻片的培养皿中, 待细胞铺满盖玻片时取出, PBS洗涤之后用40 g/L的多聚甲醛固定, 含有10 mL/L TritonX-100的PBS预处理15 min后, 1 g/L BSA封闭, vimentin(1:80)37℃孵育1 h, PBS洗3次每次5 min, FITC标记的羊抗兔IgG (Pierce)(1:200稀释)37℃孵育1 h, PBS洗涤之后在荧光显微镜(Olympas)下进行观察。

1.2.3 Western blot: 蛋白的提取按文献[5]所提供的方法进行。用含有相同蛋白的样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后采用半干法转到硝酸纤维素膜上。NC膜用含有50 g/L奶粉的TBS封闭过夜, vimentin一抗37℃孵育1 h(1:600稀释), TBS冲洗之后辣根过氧化物酶标记的二抗37℃封闭1 h, TBS洗涤之后ECL法显色, 洗片。选用β-actin(Santa Cruz)作为内参, 1:400稀释。

1.2.4 细胞迁移能力测定: 不同细胞迁移能力采用Transwell侵袭小室检测(6.5 mm直径, 8 μm孔径的聚碳酸酯膜, Costar), 无血清DMEM调整细胞浓度为 1×10^5 /L, 在上室中加入100 μL细胞悬液, 在下室中加入无血清培养基培养的NIH3T3细胞上清600 μL, 然后在37℃的培养箱中孵育8 h, 取出滤膜, 用预冷的甲醇固定, 棉签擦去滤膜上室未穿透的细胞, 4 g/L的台盼蓝溶液染色, 在200倍光镜下取6个视野计数穿透到细胞背面的细胞数, 每组重复3次, 结果求平均数。

统计学处理 vimentin阳性表达率和临床病理资料之间的相关性分析采用 χ^2 检验, 细胞之间迁移能力差异的比较采用ANOVA检验。P<0.05被认为有统计学意义。应用SPSS11.5统计软件包进行分析。

2 结果

2.1 vimentin在胰腺癌组织中的表达 vimentin在胰腺癌组织中主要表达于肿瘤细胞周围的间质, 有一小部分肿瘤细胞可以表达vimentin(图1, 箭头所标记的细胞)。在99例肿瘤组织中有16例呈vimentin阳性, 阳性率达16%。在正常胰腺组织的上皮成分内未发现有vimentin阳性染色。vimentin的表达和胰腺癌的淋巴结转移(P=0.02)、远处转移(P<0.001)、组织学分级(P=0.002)都存

■研发前沿
干细胞在修复机体损伤的过程中, 受到各种刺激发生基因突变, 获得无限增殖的能力, 在启动肿瘤形成和生长过程中起决定作用。由于肿瘤组织具有较大的异质性以及分化不成熟的特性, 一些较为原始的干细胞标记分子有可能在肿瘤组织中得到重新表达, 探讨这些干细胞标志物在肿瘤组织中的表达情况可能对肿瘤的诊治具有重要意义。

■相关报道

Vimentin是一种间叶细胞的标记分子,在正常的上皮细胞中不表达,然而有学者发现增殖的胰管上皮细胞中表达vimentin, vimentin可能是一种胰腺祖细胞的标记,还有研究认为vimentin的表达可能参与了细胞的运动过程.

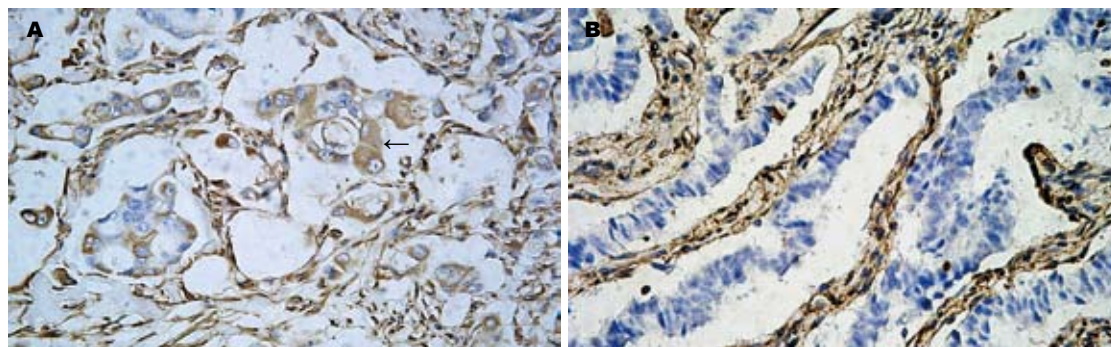


图1 vimentin在胰腺癌中的表达(SP × 200). A: 阳性染色; B: 阴性染色.

在相关性. 在发现有淋巴结转移、远处转移和分化程度较低的病例中vimentin的阳性率较高(表1).

2.2 vimentin在胰腺癌细胞中的表达情况 在低分化的胰腺癌细胞系Panc-1细胞中, vimentin的荧光较强, 而中分化和高分化的胰腺癌细胞AsPC-1和BxPc-3只表达出微弱的荧光(图2). Western blot同样标明: Panc-1细胞中vimentin呈强表达, 而AsPC-1和BxPc-3中表达较弱(图3).

2.3 细胞迁移能力的测定 Panc-1细胞的穿透数为(101 ± 9)个, AsPC-1的穿透数为(81 ± 5)个, BxPc-3的穿透数为(43 ± 7)个, 三组相比差别具有显著意义($P < 0.001$).

3 讨论

肿瘤的发生是机体干细胞在修复损伤的过程中, 由于受到内源或外源的各种刺激, 发生基因突变, 导致其增殖调控通路中某些信号分子发生改变, 具有无限增殖、自我更新及分化的能力, 即形成肿瘤干细胞. 肿瘤干细胞在启动肿瘤形成和生长过程中起决定作用, 因而成为肿瘤恶性生长的源泉^[6]. 肿瘤干细胞理论已经在包括乳腺癌、白血病、肝癌等多种肿瘤中得到证实^[7-9]. 作为一种高度恶性的消化系统肿瘤, 胰腺癌的发生和干细胞是否有关系尚待阐明.

我们的前期研究表明胰腺大部分切除后, 胰腺再生过程中出现了胰腺导管上皮细胞的增殖与分化, 增殖的导管上皮细胞通过去分化表现出干细胞的特性, 进而参与胰腺的新生^[2]. Ko *et al*^[3]学者发现增殖的胰管上皮细胞高表达vimentin, vimentin可以作为一种胰腺祖细胞的标记物. 而vimentin是一种III型中间纤维, 正常情况下只在间叶组织中表达, 而上皮细胞则不表达, 所以vimentin经常被用作一种肿瘤标志物来诊断黑色素瘤.

表1 vimentin在胰腺癌组织中的表达与临床病理资料的关系

	vimentin		P值
	阳性(n = 16)	阴性(n = 83)	
年龄			0.387
≤60岁	9	56	
>60岁	7	27	
性别			0.222
男性	9	33	
女性	7	50	
肿瘤部位			0.272
胰头	13	56	
胰体尾	3	27	
肿瘤大小			0.642
<4 cm	11	52	
≥4 cm	5	31	
肿瘤范围			0.294
T ₁₋₂	4	12	
T ₃₋₄	12	71	
淋巴结转移			0.020
N ₀	5	52	
N ₁	11	31	
远处转移			<0.001
M ₀	6	74	
M ₁	10	9	
病理分级			0.002
高	0	27	
中	3	27	
低	13	29	

为了进一步阐明胰腺癌的发生, 我们通过免疫组化的方法检测了vimentin在胰腺癌细胞中的表达情况. 结果发现: 在99例胰腺癌标本中, 有16例(16%)检测到vimentin的表达. 胰腺癌的发生过程中可能有干细胞的参与. 此外我们还发现vimentin的表达和淋巴结转移、远处转移、以及肿瘤的病理学分级都存在显著的相关性. 在发现有转移以及低分化的肿瘤组织中,

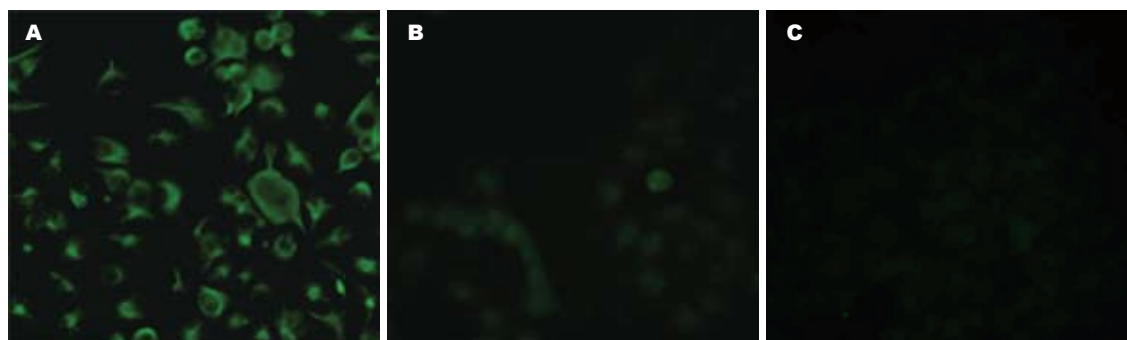


图 2 免疫荧光检测vimentin在胰腺癌细胞中的表达. A: Panc-1; B: AsPC-1; C: BxPc-3.

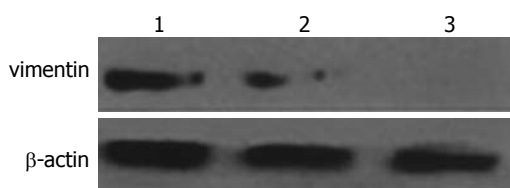


图 3 Western blot检测vimentin在胰腺癌细胞中的表达. 1: Panc-1; B: AsPC-1; C: BxPc-3.

vimentin的阳性表达率较高. vimentin在胰腺癌组织中的表达参与肿瘤的恶性生物学行为, 通过检测术后组织标本中vimentin的表达有可能对胰腺癌的恶性程度作出预测.

关于vimentin阳性肿瘤细胞的来源有多种解释: (1)肿瘤组织中的肌上皮细胞; (2)发生去分化的肿瘤细胞; (3)具有多种分化潜能的肿瘤祖细胞^[10]. 考虑到vimentin阳性肿瘤细胞所占的比例较少, 为了更好的反应vimentin阳性肿瘤细胞的来源、及其在胰腺癌组织中表达的意义, 在本研究中我们采用任何数量肿瘤细胞的vimentin阳性染色, 则为阳性表达的判定标准.

通过Western blot和免疫荧光技术检测vimentin在不同胰腺癌细胞系中的表达时发现: 低分化的胰腺癌细胞Panc-1高表达vimentin, 而中分化、高分化的胰腺癌细胞系AsPC-1、BxPc-3中vimentin的表达水平较低, 细胞系中vimentin的表达情况与胰腺癌组织相符. Lang et al^[4]认为vimentin的表达参与调控上皮细胞的运动, 在需要细胞移动的生理(如修复)或者病理过程(如肿瘤转移)中上皮细胞往往表达vimentin. 而我们也发现vimentin表达量高的细胞Panc-1在体外的迁移能力较强, 而vimentin表达水平低的细胞BxPc-3在体外运动能力较弱, 两者之间存在显著的差异($P < 0.001$). 实际上胰腺癌细胞vimentin表达和临床转移之间的相关性也反映了肿瘤细胞具有较强的运动能力, vimentin在胰腺癌细胞中的表达参与了胰腺癌的侵袭过程.

总之, 我们验证了胰腺祖细胞标志物vimentin在胰腺癌细胞中存在表达, 胰腺癌的发生可能和胰腺干细胞存在一定的联系. 此外vimentin的表达参与胰腺癌的恶性侵袭性生物学过程, 他反映了高侵袭性胰腺癌的一种去分化状态, 有可能作为一种标志物而预测胰腺癌的恶性程度.

4 参考文献

- 1 Grapin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 504-510
- 2 刘涛, 王春友, 许逸卿, 熊炯忻, 万赤丹, 周峰, 陶京, 杨智勇. 大鼠胰腺部分切除后导管细胞增殖规律研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 1215-1216
- 3 Ko SH, Suh SH, Kim BJ, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Son HS, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Bonner-Weir S, Weir GC, Yoon KH, Park CG. Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells. *Pancreas* 2004; 28: 121-128
- 4 Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AA, Villette JM, Stower MJ, Maitland NJ. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002; 52: 253-263
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 870-877
- 6 Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-331
- 7 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 8 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 9 颜政, 方驰华. 人肝细胞癌细胞亚群的克隆分离及异质性机制的初步研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 481-485
- 10 Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 2005; 206: 451-457

■应用要点

vimentin在胰腺癌细胞中的表达提示胰腺癌的发生可能和胰腺干细胞存在内在的联系, 通过检测vimentin在胰腺癌中的表达可能对胰腺癌的恶性生物学行为进行预测.

■同行评价

本文选题符合该领域的研究热点, 设计科学, 合理, 统计处理符合统计学方法, 结论可靠, 建议完善讨论.

编辑 程剑侠 电编 何基才

饮食与溃疡性结肠炎

何新颖, 唐志鹏

■背景资料

饮食因素被认为是溃疡性结肠炎(UC)发生的可能危险因素, 而饮食中的某些成份又对UC有一定的辅助治疗作用。研究表明, 过多摄入红肉、高脂肪和高蛋白饮食与本病的发病和复发有关联。另一方面, 补充益生菌、鱼油和膳食纤维具有较好疗效。

何新颖, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海市 200032

上海市教育委员会第五期重点专科“中医脾胃病学”资助项目, No. J50305

通讯作者: 唐志鹏, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科。zhipengtang@sohu.com

电话: 021-64385700-3925

收稿日期: 2007-08-22 修回日期: 2007-11-30

Diet and ulcerative colitis

Xin-Ying He, Zhi-Peng Tang

Xin-Ying He, Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: the Major Programs of Education on Commission of Shanghai during the 5th Gastrology of Traditional Chinese medicine, No. J50305

Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com

Received: 2007-08-22 Revised: 2007-11-30

Abstract

Dietary factors have been considered as a possible risk factor for ulcerative colitis (UC). Red meat, high fat intake and high protein intake are associated with development and relapse in UC. On the other hand, probiotics, fish oil and dietary fiber have shown good efficacy in the treatment of UC. This paper reviews the updated data on the role of dietary factors in the pathogenesis and treatment of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Diet; Pathogenesis

He XY, Tang ZP. Diet and ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3826-3829

摘要

饮食因素被认为是溃疡性结肠炎发病的危险因素。研究表明, 过多摄入红肉、高脂肪和高蛋白饮食与本病的发病和复发有关联。另一方面, 补充益生菌、鱼油和膳食纤维具有较好疗效。本文综述饮食因素在溃疡性结肠炎发病和治疗中作用的研究进展。

关键词: 溃疡性结肠炎; 饮食; 发病机制

何新颖, 唐志鹏. 饮食与溃疡性结肠炎. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3826-3829

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3826.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性肠道疾病, 多侵及结肠和直肠黏膜, 临床以腹泻、黏液脓血便和腹痛等为主要表现, 病程较长, 常反复发作。本病的病因和发病机制尚不明确, 除遗传易感性和肠道免疫功能异常外, 生活方式变化也是研究的热点课题, 其中饮食因素被认为是UC发生的可能危险因素, 而饮食中的某些成份又对UC有一定的辅助治疗作用^[1-2]。本文综述饮食在UC发病和治疗作用中的研究进展。

1 饮食与溃疡性结肠炎发病的关系

临床流行病学研究结果提示, 虽然尚未明确UC是由何种食物引起, 也无证据显示本病与食物过敏有关, 但已有许多研究表明饮食中的某些成份与UC发病和复发有一定关系, 例如牛奶制品摄入过多而纤维摄入减少可能与本病的复发有关^[3-4]。

1.1 饮食中硫化物与溃疡性结肠炎发病的关系
硫化物对结肠细胞的毒性作用, 可能是结肠炎形成的一个重要机制。随生活水平的提高, 饮食中蛋白质比例增加, 故摄入的含硫氨基酸(包括蛋氨酸、半胱氨酸、胱氨酸以及牛磺酸)明显增多。通过肠道细菌对含硫氨基酸的降解和发酵, 产生多种含硫化合物, 如硫化氢等积聚在肠道, 这些物质会对结肠细胞产生一定的直接毒性作用, 也可能间接地改变其蛋白功能和抗原性^[5]。研究表明^[6-7], 食物中肉类(含丰富的蛋白), 尤其是红肉和加工后肉类的摄入, 增加了UC复发的风险。另外, 由于非有机硫酸盐(包括二氧化硫, 硫化氢, 亚硫酸盐)在贮存和储藏食物和饮料中作为防腐剂广泛的应用, 如白葡萄酒, 汉堡包,

浓缩饮料, 香肠, 啤酒和红酒等^[8], 因此, 这些食物和饮料也增加了UC发生的危险性。

1.2 饮食中脂肪与溃疡性结肠炎发病的关系 摄入过多脂肪或不饱和脂肪酸会损伤结肠黏膜。Reif *et al*^[9]研究显示, UC发病前的脂肪摄入增多, 尤其是动物脂肪和胆固醇。脂肪摄入增多引起的结肠炎症性改变, 也可能会影响胆固醇的吸收和分泌。由于高胆固醇血症形成的高凝状态可使血管痉挛, 血管紧张度增加, 影响黏膜血液供应, 因而造成结肠黏膜损伤^[10]。Geerling *et al*^[11]发现摄入过多的单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸可能会增加UC的发病概率。因此, 脂肪摄入与UC发病有一定关系。

1.3 饮食中糖类与溃疡性结肠炎发病的关系 许多调查显示高糖摄入与UC发病可能有关。Reif *et al*^[9]通过对UC患者发病前食谱的调查, 发现高蔗糖摄入可能会增加患病率。Bianchi Porro *et al*^[12]研究发现, 与正常饮食组相比, 常吃含糖量高食物者患UC的风险性增高, 而合制进食蔬菜和水果的人似乎患UC的风险会减少。Russel *et al*^[13]在一项流行病学调查中发现, 经常摄入含糖量高食物如可乐饮料和巧克力者与UC发病呈正相关, 而经常吃柑橘类水果者与UC发病呈负相关。但是, 高糖饮食导致UC的发病机制还不清楚。

2 饮食对溃疡性结肠炎的治疗作用

饮食能够促进肠道自身愈合, 这是UC治疗的新概念之一^[14]。饮食可以辅助性地治疗UC, 缓解症状, 防止复发, 其作用值得重视。

2.1 益生菌及其制品对溃疡性结肠炎的治疗作用 许多临床和实验研究都提示肠道菌群在UC发病中起重要作用。益生菌(probiotics)是含有足够数量、确定活菌的制剂, 通过移植或定植在宿主的部位来改变其微生物系统并对宿主产生有益的健康影响。大部分益生菌属于人肠道内正常的菌群, 如双歧杆菌属和乳酸杆菌属的细菌。部分益生菌株能够调节体内菌群的平衡, 如一些外来细菌, 像芽孢杆菌、非致病性大肠杆菌。目前临床最常用的益生菌是双歧杆菌和(或)乳酸杆菌的单菌或复合制剂^[15]。益生菌具有生物拮抗、加强肠道上皮屏障功能及调节肠道免疫系统功能^[16-18]。已有研究表明益生菌及其制品在预防和治疗轻、中度UC中可能是有效的^[19-22]。益生菌制剂作为一种比较安全有效的辅助治疗方法, 对其应用于临床治疗UC的前景充满希望。

2.2 丁酸盐对溃疡性结肠炎的治疗作用 肠道中

的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)具有维持结肠上皮屏障功能。丁酸盐为一种由食物成份经微生物发酵所产生的SCFA, 是结肠黏膜尤其是末端结肠黏膜上皮的主要能源来源, 丁酸盐对结肠黏膜具有保护作用。而肠道中氮衍生物和硫化物则会削弱丁酸盐的保护作用^[23]。Bamba *et al*^[24]研制了一种麦芽营养制品(germinated barley foodstuff, GBF), 富含谷氨酰胺和半纤维素, 他可被双歧杆菌、真菌转化为乳酸、醋酸和丁酸, 可以调节结肠运动, 减少腹泻症状。其机制是这类食物可以增加丁酸盐和胆盐的吸收, 减少促炎因子生成, 促进结肠上皮增殖。因此, 可以通过摄入麦麸、燕麦、黄豆及高纤维素谷类等食物, 加强丁酸盐对结肠黏膜的保护作用。

蔬菜和水果似乎有保护肠道黏膜作用, 膳食纤维尤其是水果中的纤维素摄入与UC的发病呈负相关。膳食纤维在肠道内经细菌酵解所产生的丁酸盐仍为其主要来源^[25]。

2.3 多不饱和脂肪酸对溃疡性结肠炎的治疗作用 目前对多不饱和脂肪酸有了新的认识, 饮食中或作为补充剂的鱼油或亚麻油, 已经用于抗炎治疗。Belluzzi *et al*^[26]报道多不饱和脂肪酸可能具有抗炎活性, 能够减少炎症介质白三烯(leukotriene)含量, 抑制UC的免疫反应和炎症过程。Meister *et al*^[27]将7例UC患者进行结肠镜检查, 将活检组织用SHS培养液(含鱼油)在体外培养, 24 h后, 用酶联免疫吸附试验测定IL-1ra和IL-1 β 的浓度, 结果显示UC患者IL-1ra/IL-1 β 的比值显著升高。因此, 鱼油对UC患者的治疗可能有益。Barbosa *et al*^[28]研究 ω -3脂肪酸对UC患者氧化应激反应的作用, 结果显示患者服用柳氮磺胺吡啶(SASP)和 ω -3脂肪酸的效果优于单用SASP。表明 ω -3脂肪酸具有清除氧自由基作用, 能够提高UC的治疗效果。由于人体不能合成亚油酸和亚麻酸, 必须从饮食中补充。因此, 建议患者吃含 ω -3多不饱和脂肪酸的食物对于改善病情是很有帮助的, 如坚果、亚麻籽和鱼油等。

2.4 热水加工过的谷类食物对溃疡性结肠炎的治疗作用 Björck *et al*^[29]分别给予UC患者经热水加工过的谷类食物(hydrothermally processed cereals, HPC)和普通谷类食物, 4 wk后做结肠镜活检, 检测血浆中抗分泌因子(antisecretory factor, AF)水平, 并记录患者治疗前后的临床症状。发现HPC可明显减少腹泻发生率, 而对照组则作用不明显。其原因在于HPC是AF的诱导剂,

■研发前沿
饮食在UC发病和治疗中的作用是近几年来研究的热点课题, 且具有良好的开发前景。需要注意的是, 饮食建议必须是个体的, 他应该根据患者的病程、病变部位和病情程度等而作调整。在UC患者的饮食结构方面, 是否应该以植物来源为主食物取代以动物来源为主食物, 也值得深入研究。

■应用要点

本病的病因和发病机制虽尚不明确,但目前主要是研究遗传易感性和肠道免疫功能,本文将饮食因素纳入是UC发生的可能危险因素,总结了近几年来国外关于饮食在UC发病和治疗作用中的研究进展,有利于UC患者制订合理的饮食结构,改善其营养状况。

可促进内源性AF生成并增强其活性,从而阻止炎症因子过多分泌。因此,摄入这类活性食物后可明显改善UC患者症状。

3 结论

总之,饮食成分在UC的发病和治疗中发挥作用。饮食中的硫化物含量增多,高糖和高脂肪摄入等因素与UC发病有关。如果某种食物可诱发或加重UC的发生,就要尽量避免他。更重要的是要区别真正是对某种饮食过敏,还是对这种食物不耐受或吸收不良,如有些患者对乳糖不耐受或乳糖吸收不良。让患者记食物日记不失为一种好方法,不仅有助于准确找到给患者带来麻烦的食物,而且能够显示患者的饮食是否提供了营养素的合制补充。

恢复和维持良好营养状况是治疗UC的重要原则。许多UC患者存在营养不良。合制的饮食不仅可以起到辅助性治疗作用,而且可以改善UC患者的营养状况。需要注意的是,不存在适合于所有UC患者的单一饮食或进食计划。患者适合于吃哪种食物、不适合于吃哪种食物都必须是个体化的,他应该根据患者的病程、病变部位和病情程度等而作调整。在UC患者的饮食结构方面,是否应该以植物来源为主食物取代以动物来源为主食物,值得深入研究。

4 参考文献

- Lukas M, Bortlik M, Maratka Z. What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgrad Med J* 2006; 82: 620-625
- Korzenik JR. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S59-S65
- Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, Gonzalez-Huix F, Riera J, Gonzalez-Lara V, Dominguez-Abascal F, Gine JJ, Moles J, Gomollon F, Gassull MA. Randomized clinical trial of Plantago ovata seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 427-433
- Sood A, Midha V, Sood N, Kausha V. Self-reported food intolerance in patients with ulcerative colitis in India. *J IACM* 2003; 4: 30-33
- Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1488-1494
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004; 53: 1479-1484
- Tilg H, Kaser A. Diet and relapsing ulcerative

- colitis: take off the meat? *Gut* 2004; 53: 1399-1401
- Magee EA, Edmond LM, Tasker SM, Kong SC, Curno R, Cummings JH. Associations between diet and disease activity in ulcerative colitis patients using a novel method of data analysis. *Nutr J* 2005; 4: 7
- Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 560S-569S
- Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1008-1013
- Bianchi Porro G, Panza E. Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291: 971-972
- Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrugger RW. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 243-249
- Aldhous MC, Meister D, Ghosh S. Modification of enteral diets in inflammatory bowel disease. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 457-461
- Schrezenmeier J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 361S-364S
- Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959-50965
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591
- Perdigon G, Vintini E, Alvarez S, Medina M, Medici M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1999; 82: 1108-1114
- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* 2004; 10: PI126-131
- Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1521-1525
- Gionchetti P, Rizzello F, Lammers KM, Morselli C, Sollazzi L, Davies S, Tambasco R, Calabrese C, Campieri M. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3306-3313
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 56-63
- Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1571-1579
- Bamba T, Kanauchi O, Andoh A, Fujiyama Y. A new prebiotic from germinated barley for nutraceutical treatment of ulcerative colitis. *J*

- Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 818-824
- 25 Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 601-608
- 26 Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 339S-342S
- 27 Meister D, Ghosh S. Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ culture: differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7466-7472
- 28 Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition* 2003; 19: 837-842
- 29 Bj rck S, Bosaeus I, Ek E, Jennische E, L nnroth I, Johansson E, Lange S. Food induced stimulation of the antisecretory factor can improve symptoms in human inflammatory bowel disease: a study of a concept. *Gut* 2000; 46: 824-829

■同行评价
本文综述了饮食因素与UC发生和预防的关系, 内容有一定的新意.

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 •

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 2007-12-28).

Fas/FasL系统表达与结直肠癌的研究进展

史勇, 关景明, 韩丹

■背景资料

大肠癌的发生发展其机制不仅涉及细胞的失控性增殖, 而且与细胞凋亡的调节平衡有关, Fas/FasL是介导细胞凋亡信号转导途径最主要的系统, Fas/FasL可能参与肿瘤发生发展中的免疫逃逸机制及肿瘤细胞对机体免疫细胞杀伤的反击机制。

史勇, 关景明, 韩丹, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 关景明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。

guanjingming0451@yahoo.com.cn

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2007-09-14 修回日期: 2007-11-28

Progress in studies on the Fas/FasL expression system and colon carcinoma

Yong Shi, Jing-Ming Guan, Dan Han

Yong Shi, Jing-Ming Guan, Dan Han, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Jing-Ming Guan, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. guanjingming0451@yahoo.com.cn

Received: 2007-09-14 Revised: 2007-11-28

Abstract

Cell apoptosis or programmed cell death is the term used to describe active cell death to maintain stability under physiological and pathological conditions. Interaction of the death receptor and death ligand is one of the main ways to induce apoptosis, of which, the Fas/FasL system is considered as the major signal transduction pathway to mediate apoptosis. Colon carcinoma is one of the common malignant tumors that are a threat to human health. The occurrence and development of colon carcinoma is related to the regulation imbalance of cell apoptosis. This article reviews the relationship between the Fas/FasL expression system and the occurrence and development of colon carcinoma.

Key Words: Fas/Fas ligand; Cell apoptosis; Colon carcinoma

Shi Y, Guan JM, Han D. Progress in studies on the Fas/FasL expression system and colon carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3830-3835

摘要

细胞凋亡是指在一定生理和病理情况下, 机体

为维护内环境的稳定而发生的主动性细胞死亡过程, 即程序性死亡。由死亡受体与其配体相互作用是引起细胞凋亡的主要途径之一, 其中Fas/FasL系统是被认为最主要的介导细胞凋亡的信号转导途径。大肠癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一, 大肠癌的发生、发展与细胞凋亡的调节失衡有关。本文就Fas/FasL系统表达与结直肠癌发生发展的关系及相关方面研究作一综述。

关键词: Fas/Fas配体; 细胞凋亡; 结直肠癌

史勇, 关景明, 韩丹. Fas/FasL系统表达与结直肠癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3830-3835

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3830.asp>

0 引言

大肠癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一。在欧美国家该病居肿瘤死亡的第2位, 在我国一些大城市也居第3位, 而且发病率呈明显上升趋势^[1]。大肠癌的发生发展是遗传和环境多种因素作用导致结肠黏膜上皮细胞癌变的多步骤、多阶段及多基因参与的过程, 其机制不仅涉及细胞的失控性增殖, 而且与细胞凋亡的调节平衡有关^[2-4]。Fas/FasL是介导细胞凋亡信号转导途径最主要的系统^[5], 近期研究显示Fas/FasL可能参与肿瘤发生发展中的免疫逃逸机制及肿瘤细胞对机体免疫细胞杀伤的反击机制^[6-12]。现就Fas/FasL系统表达与结直肠癌发生发展的关系及相关方面研究作一综述。

1 Fas/FasL介导的细胞凋亡信号传导分子机制

Fas也称APO-1, 属于I型跨膜糖蛋白。人Fas/FasL基因定位于10号染色体q24, cDNA长度为2534 bp, 编码含335个氨基酸残基的糖基化受体蛋白。Fas/Fas的分子结构包括膜外的N末端区3个部分, 其中膜外区为157个氨基酸组成的信号肽区, 其氨基酸序列相对保守且具有膜受体特征, 当与其配体FasL结合后启动凋亡信号的跨膜传递; 跨膜区位于分子结构的中段, 由17个氨基酸残基构成; 而构成胞质区的145个氨基酸残

基与肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor, TNFR1)的同源性近50%, 均含60-70个氨基酸的保守序列, 在传递凋亡信号中发挥关键性作用, 故将该区称为“死亡区域”(death domain, DD). Fas的结构特点说明他属于肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体超家族. Fas分子为非谱系特异性抗原, 广泛表达在活化的T、B淋巴细胞表面, 外周血中性粒细胞、单核细胞, 正常人体的肝脏、肺脏、空回肠、胸腺、肾脏组织中也有表达, 但不同组织中Fas表达的情况不同, 可能与各组织的组织学特点有关^[13].

Fas配体(Fasligand, FasL)全长278个氨基酸, 为II型跨膜糖蛋白, 由胞膜外区、跨膜区和胞质区组成. 其N端150个氨基酸为TNF超家族同源区, 同源性主要表现在形成 β 折叠股的序列, 在 β 折叠股c和d之间有一对保守的二硫键, 对其空间结构的形成有作用; FasL在胞膜外区有4个N糖基化位点, 经过糖基化的FasL的相对分子质量为 36×10^3 - 43×10^3 , FasL的胞质区富含脯氨酸. FasL通过与Fas交联而介导表达Fas的细胞发生凋亡. FasL基因位于1号染色体q23上, cDNA全长1623 bp, 由5个外显子组成. FasL主要表达于活化的T淋巴细胞和NK细胞, 以及免疫豁免区如眼前房、睾丸滋养细胞表面等, 其他细胞如B细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞以及胸腺细胞都不表达FasL^[13].

Fas分子与其配体、单抗或其自身结合均可形成二聚体而启动凋亡信号的传递, Fas分子介导的凋亡信号的传递无需细胞核的参与, 不伴有基因的活化, 并可以导致无核细胞发生凋亡, 这与其他凋亡信号的传递有明显不同. 尽管Fas分子介导凋亡的详细分子生物学机制尚未完全明确, 目前认为其主要过程包括以下步骤^[14-16]: (1) 死亡受体分子的活化. 由于Fas分子中的死亡结构域有相互聚集的倾向, 死亡配体与其相应的死亡受体(Fas与FasL)结合后诱导Fas分子中的死亡结构域与转接器蛋白(adaptor protein)分子中的死亡结构域结合, 转接器蛋白又称Fas分子相关蛋白(Fas associated death domain, FADD). (2) 凋亡酶体(apoptosome)的形成. FADD分子的另一端含有可与胱冬酶原8(pro caspase8)相结合的死亡效应器结构域(death effector domain, DED), 诱导二者的结合, 这样由Fas-FasL-FADD-procaspase8串联构成的复合物称为“凋亡酶体”. (3) 胱冬酶(caspase8)家族的活化. 胱冬酶被认为是凋亡效应器酶, 凋亡酶体中由于胱冬酶原的聚集而

导致自身的水解与活化形成有活性的胱冬酶8(caspase8), 并可以依次激活其同源酶家族中其他酶原形成自身激活瀑布(如caspase8 $\cdots$ caspase6, 7 $\cdots$ caspase3), 而胱冬酶3可以激活DNA降解酶, 降解DNA为特异性片段导致细胞凋亡的发生. Fas系统引起的凋亡是机体免疫系统杀伤病毒感染细胞、肿瘤或同种异体细胞的重要途径, 然而通过该系统引起的细胞毒效应所致的凋亡缺乏抗原特异性, 与细胞是否携带病原无关, 这就是“旁观者效应”.

近年来的研究发现, 虽然某些细胞高表达Fas, 但对Fas介导的凋亡却具有抵抗性, 提示可能Fas的胞内传导通路有障碍或存在Fas的调控因子. 已证明某些凋亡相关基因, 如*Bcl-2*、*Bax*和*P53*与Fas/FasL系统的表达与功能密切相关. 在癌细胞中, Fas激活与p53的完整性有关, 因为Fas基因启动子的激活直接依赖于*P53*基因的转录活性. *Bcl-2*家族的过度表达不会激活Fas的表达, 而*Bax*蛋白与Fas的表达似有协同性, 提示其可能是Fas介导凋亡的下游分子. 而一些蛋白激酶和蛋白磷酸酶通过磷酸化、去磷酸化也可调节Fas信号途径, FAST是一种丝苏氨酸激酶, 通过磷酸化激活后可继续激活核转录因子TIA1, 后者可促进凋亡的发生; FAP1是一种酪氨酸磷酸酶, 可以直接与Fas末端的15个氨基酸结合而抑制其引起凋亡的敏感性. Fas/FasL系统表达不是凋亡唯一途径, 尚有多种途径和多种因素参与细胞凋亡过程.

2 Fas/FasL系统介导的细胞凋亡调节因子与结直肠癌发生

由于遗传和环境多种因素作用导致某些生理因子的缺陷及死亡信号转导调节因子的量变, 引起结直肠黏膜细胞增殖失控和凋亡受阻是结直肠癌腺瘤癌变发生的重要机制之一. Fas/FasL功能活性依赖机体内各种蛋白对他的调节作用, 一些细胞因子可干预Fas/FasL的表达.

p53是一种抑癌基因表达产物, 基因定位于17q13.1, 是一种转录因子, 生理含量很低. 关于p53促进凋亡, 抑癌的分子机制, 近来报道许多细胞凋亡因子基因启动子区存在p53反应元件(p53 responsive element, PRE), 与p53结合后被激活转录表达, 如p53可促进Fas、FasL、Apaf-1DR5和*Bax*表达增高, 促进肿瘤细胞凋亡. p53还可促进细胞内质网颗粒释放TNF- γ 和Fas, 加强凋亡. 在野生型p53介导的凋亡中, Fas/FasL系统的作用存在异质性, 化疗药物导致DNA损

■研发前沿
目前, 此领域的研究重点在于探讨肿瘤的免疫逃逸和反击与Fas/FasL的关系, 更好的寻找治疗肿瘤的新途径.

■相关报道

Fas/FasL系统与肿瘤发病机制的研究是近几年研究的热点,目前大量文献报道,Fas/FasL参与了肿瘤的免疫逃逸和反击的机制。

伤,主要通过凋亡杀死癌细胞。DNA受损后野生型p53(wtp53)基因与Fas基因第一内含子p53反应元件结合活化Fas基因,通过Fas途径介导凋亡^[17]。但Fukazawa *et al*^[17]用腺病毒介导wtp53基因转入结肠癌细胞株(DLD-1和SW620)后24 h, Fas和FasL表达都短暂上调,随之迅速凋亡, Fas mAb对其作用无影响,抗FasL抗体(4H9)无抑制其凋亡过程。PTEN是既p53后在肿瘤中第二个高突变的抑癌基因表达分子,在许多肿瘤组织中PTEN基因呈现杂合子缺失,其在结直肠癌发生发展机制中与Fas/FasL系统的关系尚须进一步研究。

体外研究显示结肠癌细胞株HT29受IFN- γ 和TNF- α 刺激后, Fas和FasL阳性表达细胞数增加。IFN- γ 诱导的Fas和FasL表达呈时间和剂量依赖性。IFN- γ (100 kU/L)和TNF- α (1000 kU/L)显著增加了抗Fas单抗介导的HT29细胞凋亡, caspase-1抑制剂对此凋亡过程有抑制^[19]。O'Connell *et al*^[20]的研究表明IFN- γ 增强了HT29和SW620对FasL等多种凋亡诱导剂的敏感性,其敏感程度与IFN- γ 介导的procaspase-1上调水平呈正相关。细胞因子的干预对有些细胞株影响不大,如SW480的Fas表达不受IFN- γ 和TNF- α 的影响^[21-23]。Bcl-2家族一系列促凋亡成员和抗凋亡成员及caspase家族对Fas/FasL有重要的调节作用。Bcl-2基因由腺病毒转导入结肠癌GC3/c1细胞系后,抑制Fas介导的凋亡^[24]。Bcl-2主要对Fas通过第二条信号途径介导的凋亡有抑制作用。

最新研究表明,已发现7种以上调控Fas/FasL系统中Fas-DISC及活化procaspase-8/10的因子^[25]。Fas相关磷脂合成酶-1(FAP-1)与Fas的负性调节区SD结合,能抑制Fas介导的凋亡,结肠癌细胞株(DLD-1)同时表达Fas和FAP-1,对Fas介导的凋亡形成耐受^[26]。SADS(small accelerator for death signaling,死亡信号转导的加速小分子),是2001年由Obata *et al*及Takahashi *et al*两组学者同时报道新发现的小分子,可加强FADD与procaspase-8间结合力促进凋亡。结肠癌细胞膜虽表达Fas,但因SADS低表达,引起凋亡受阻,与致癌有关。cFL IP(cellular FADD-like IL-1 β converting enzyme/caspase 8-inhibitory protein)在蛋白水平有两种形式cFL IPL和cFL IPS。cFL IPL通过与死亡受体FADD的DED结合抑制Fas介导的细胞凋亡信号转导。最新报道,cFL IP尚可通过结合Raf-1和TRAF1/2分别激活ERK和NF- κ B促进增殖。故cFL IP含量的多少,在Fas介导的信号转导中具有开关作用。据报道与匹配的正常结肠黏

膜相比,结肠腺癌cFL IPL mRNA水平和蛋白密度均显著增加,腺瘤性息肉cFL IPL与正常相比无显著差异,提出cFL IPL高表达是肿瘤特有的现象^[27];在大肠癌细胞中cFL IP表达可能在抑制大肠癌细胞凋亡中发挥重要作用^[28-31]。此外,还发现:FI ST(作用于Fas的丝/苏蛋白激酶),他结合Fas和FADD形成三分子复合物后,磷酸化FADD,抑制procaspase 8的活化而抑制凋亡。FA IM(Fas凋亡抑制因子),抑制Fas介导的凋亡。BAR(bifunctional apoptosis regulator),结合Procaspase-8/10抑制Fas介导的凋亡,抑制Bax引起线粒体介导的凋亡,故称之为双功能凋亡调节因子。Pidd(p53 inducible protein with death domain),是由p53诱导表达的一种最新报道的含有DD的蛋白分子,他借其DD直接结合Fas的DD,引起p53依赖的细胞凋亡。以上四种凋亡调控因子与结直肠癌的关系有待深入研究。

3 Fas/FasL系统表达与结直肠癌的肿瘤免疫

正常肠上皮细胞更新活跃,细胞增殖与凋亡处于动态平衡。有研究发现结肠上皮内淋巴细胞(IEL)表达Fas,对激动型抗Fas抗体敏感,IEL也表达FasL mRNA和蛋白,且能对表达Fas的靶细胞发挥FasL介导的细胞毒作用,提示IEL表达功能性的Fas和FasL,在正常的肠道免疫中发挥作用^[30]。结直肠上皮细胞癌变后凋亡细胞数减少,而凋亡机能的紊乱是导致细胞癌变的一个重要诱因。低分化大肠癌中Fas蛋白的表达低于高分化大肠癌,提示Fas蛋白表达缺失可使细胞凋亡减少,因而凋亡与增生失衡,使得癌细胞生长加快^[31-32]。Kushlinskii *et al*^[33]报道有局部淋巴结转移、肝转移与肺转移的结肠癌患者sFas血清水平有增高倾向,提示sFas可预测结肠癌的临床进展和预后。多数研究表明结直肠癌组织中普遍表达FasL。而且研究表明^[34-35]在结直肠肝转移癌中几乎全部表达FasL,并且表达频率远高于初期未转移大肠癌,而且活性T淋巴细胞数量大为减少,但其机制不明。国内学者近期实验结果表明,FasL在正常大肠黏膜不表达,在大肠腺瘤中表达较低,而在大肠癌中表达显著提高,在大肠癌转移灶中的表达率100%^[36-37],与国外的报道结果一致。Yoong *et al*^[38]推测Fas/FasL系统在大肠癌肝转移中可发挥一定作用,认为肿瘤细胞与淋巴细胞可以相互成为FasL的靶细胞,但由于肿瘤细胞通过细胞内传导通路的中断获得对FasL诱导凋亡的抵抗,自身不进入凋亡却可

以通过FasL反向杀伤淋巴细胞而逃避免疫监视。7/8结肠癌细胞株(HT29、SW620、SW480、T84、CaCo2、LoVo和CoLo205)也表达Fas mRNA, 但表达水平不一致。Shimoyama *et al*^[31]发现80.8%(173/214)结直肠癌组织和40.9%(34/83)结直肠腺瘤组织FasL阳性, 提出FasL的表达是结直肠癌发生的早期事件。多数结肠腺瘤由腺瘤型息肉发展而成, 用DNA末端标记法TUNEL和免疫组化染色观察到结肠腺瘤大多数细胞Fas和FasL联合表达率与TUNEL阳性率无关, 提示结肠细胞在恶性转化的早期即获得对Fas介导的凋亡耐受^[39]。研究表明, 肿瘤组织切片中FasL阳性表达区中肿瘤浸润淋巴细胞的凋亡率比FasL阴性区高, 推测肿瘤细胞可能通过高表达FasL杀伤肿瘤浸润T淋巴细胞(CTL)。可见Fas系统除参与肿瘤免疫外, 还参与肿瘤逃逸免疫作用。

4 Fas/FasL系统表达与结直肠癌化疗

大肠癌患者中即使施行根治手术和辅助化疗后仍有较高的转移发生率, 来自结直肠黏膜的癌细胞在侵袭转移中必须逃逸机体的免疫系统和化疗药物的杀伤, 在适应肿瘤局部微环境条件下才有可能最终形成临床转移灶。在癌症治疗中一些细胞毒药物能诱导肿瘤细胞表达Fas和FasL, 并通过Fas/FasL相互作用诱导肿瘤细胞凋亡, 但在一些类型由抗癌药物诱导的凋亡中, Fas与FasL相互独立发挥细胞毒作用^[40-41]。一些常用化疗药物, 如顺铂、阿霉素、丝裂霉素、氟尿嘧啶和喜树碱等在体外结直肠癌细胞株可增加细胞表面Fas感受器的表达。而且生制浓度的顺铂、丝裂霉素、甲氨蝶呤、米托蒽醌、多柔比星和博来霉素可上调Fas和FasL的表达, 以上研究为改善这些药物的功效提供了新的方向。有研究发现抗癌药物促进Fas聚集及Fas与FADD的结合, FADD可能是诱导细胞毒作用的关键因素^[42-43]。但是, 某些化疗药物一方面诱导肿瘤细胞Fas的表达增加, 提高对凋亡信号的敏感性; 另一方面又可诱导FasL的表达增加。肿瘤细胞FasL可诱导表达Fas的免疫细胞, 特别是肿瘤浸润淋巴细胞发生凋亡。因此, 某些化疗药物对机体来说, 可视为一把双刃剑(double edged sword)^[44]。既可有助于机体清除肿瘤细胞, 又可能促使肿瘤细胞转移, 并使结直肠癌细胞抗药性增强。也有学者认为某些化疗药物使肿瘤细胞Fas表达增加, 是杀伤肿瘤细胞的主要机制之一^[45]。总之, Fas/FasL系统在大肠癌的免疫耐受

和抗癌药物发挥作用中研究结论不完全一致, 尚需在体内条件下深入研究Fas/FasL系统表达与抗肿瘤药物对大肠癌细胞影响的关系, 综合评价化疗药物对机体的作用。

随着Fas/FasL系统的分子生物学基础研究进展, 进一步从结直肠癌细胞逃逸机体免疫监视, 反击机体免疫系统的机制和抗癌药物作用机制的角度来阐明Fas/FasL系统表达所起的作用, 将有助于阐明结直肠癌发生发展机制, 为结直肠癌的治疗提供一种新的思路, 并有助于临床合理地制定治疗方案和预后判断。

5 参考文献

- 1 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 3-9
- 2 Garewal H, Bernstein H, Bernstein C, Sampliner R, Payne C. Reduced bile acid-induced apoptosis in "normal" colorectal mucosa: a potential biological marker for cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56: 1480-1483
- 3 Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 60-66
- 4 沈云芳, 庄蕙, 沈健伟, 陈士葆. 细胞凋亡与肿瘤. 世界华人消化杂志 1999; 7: 267-268
- 5 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456
- 6 Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M, Heemann U. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1047-1054
- 7 Bennett MW, O'Connell J, O'sullivan G, Roche D, Brady C, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 1999; 44: 156-162
- 8 朱强, 邓长生. 结肠癌细胞通过Fas/FasL诱导淋巴细胞发生凋亡. 癌症 2002; 21: 272-275
- 9 王平, 张柏和, 卫立辛, 吴孟超. 表达FasL的肝癌细胞通过Fas/FasL诱导T淋巴细胞发生凋亡. 肿瘤 2004; 24: 437-439
- 10 Houston AM, Michael-Robinson JM, Walsh MD, Cummings MC, Ryan AE, Lincoln D, Pandeya N, Jass JR, Radford-Smith GL, O'Connell J. The "Fas counterattack" is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability. *Hum Pathol* 2007
- 11 Zhu Q, Liu JY, Xu HW, Yang CM, Zhang AZ, Cui Y, Wang HB. Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6125-6129
- 12 Reipert BM, Tanneberger S, Pannetta A, Bedosti M, Poell M, Zimmermann K, Stellamort MT. Increase in autoantibodies against Fas (CD95) during carcinogenesis in the human colon: a hope for the immunoprevention of cancer? *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1038-1042
- 13 Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a

■创新盘点
本文详细介绍了Fas/FasL的特点, 重点介绍了Fas/FasL与肿瘤发生、免疫和化疗的关系。

■应用要点

本文详细介绍Fas/FasL与肿瘤发生发展中的免疫逃逸机制及肿瘤细胞对机体免疫细胞杀伤的反击机制的关系,为肿瘤的进一步研究和治疗提供了新的思路。

- mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-1192
- 14 Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM. Fas ligand promotes tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cell Cycle* 2006; 5: 246-249
- 15 Yao H, Song E, Chen J, Hamar P. Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1718-1725
- 16 Houston A, Waldron-Lynch FD, Bennett MW, Roche D, O'Sullivan GC, Shanahan F, O'Connell J. Fas ligand expressed in colon cancer is not associated with increased apoptosis of tumor cells in vivo. *Int J Cancer* 2003; 107: 209-214
- 17 Shao RG, Cao CX, Nieves-Neira W, Dimanche-Boitrel MT, Solary E, Pommier Y. Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20: 1852-1859
- 18 Fukazawa T, Fujiwara T, Morimoto Y, Shao J, Nishizaki M, Kadowaki Y, Hizuta A, Owen-Schaub LB, Roth JA, Tanaka N. Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2189-2199
- 19 Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998; 58: 2832-2837
- 20 O'Connell J, Bennett MW, Nally K, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Interferon-gamma sensitizes colonic epithelial cell lines to physiological and therapeutic inducers of colonocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; 185: 331-338
- 21 Möller P, Koretz K, Leithäuser F, Brüderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994; 57: 371-377
- 22 Kimura M, Haisa M, Uetsuka H, Takaoka M, Ohkawa T, Kawashima R, Yamatsuji T, Gunduz M, Kaneda Y, Tanaka N, Naomoto Y. TNF combined with IFN-alpha accelerates NF-kappaB-mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 718-728
- 23 Zekri AR, Haleem HA, Esmat GE, Bahnassy AA, El-Din HM, Hafez MM, Sharaby AF, Sharaf H, Zakaria MS. Immunomodulators, sFas and Fas-L as potential noninvasive predictors of IFN treatment in patients with HCV genotype-4. *J Viral Hepat* 2007; 14: 468-477
- 24 Houghton JA, Harwood FG, Gibson AA, Tillman DM. The fas signaling pathway is functional in colon carcinoma cells and induces apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2205-2209
- 25 Petak I, Danam RP, Tillman DM, Vernes R, Howell SR, Berczi L, Kopper L, Brent TP, Houghton JA. Hypermethylation of the gene promoter and enhancer region can regulate Fas expression and sensitivity in colon carcinoma. *Cell Death Differ* 2003; 10: 211-217
- 26 Sawa E, Takahashi M, Kamishohara M, Tazunoki T, Kimura K, Arai M, Miyazaki T, Kataoka S, Nishitoba T. Structural modification of Fas C-terminal tripeptide and its effects on the inhibitory activity of Fas/FAP-1 binding. *J Med Chem* 1999; 42: 3289-3299
- 27 Ryu BK, Lee MG, Chi SG, Kim YW, Park JH. Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. *J Pathol* 2001; 194: 15-19
- 28 高文超, 范列英, 蔡清萍, 王强, 李莉, 王元和. cFLIP蛋白在大肠癌细胞中表达及其对大肠癌细胞凋亡的影响. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 795-797
- 29 Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G, Gigelou F, Lazaris A, Thymara I, Scliri M, Bousboukea K, Michalopoulos NV, Apostolikas N, Konstantinidou A, Tzivras M, Patsouris E. c-FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. *Histopathology* 2007; 51: 150-156
- 30 Morimoto Y, Hizuta A, Ding EX, Ishii T, Hongo T, Fujiwara T, Iwagaki H, Tanaka N. Functional expression of Fas and Fas ligand on human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 84-89
- 31 Shimoyama M, Kanda T, Liu L, Koyama Y, Suda T, Sakai Y, Hatakeyama K. Expression of Fas ligand is an early event in colorectal carcinogenesis. *J Surg Oncol* 2001; 76: 63-68; discussion 69
- 32 Peng ZH, Xing TH, Qiu GQ, Tang HM. Relationship between Fas/FasL expression and apoptosis of colon adenocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 88-92
- 33 Kushlinskii NE, Britvin TA, Abbasova SG, Perevoshchikov AG, Prorokov VV, Kostanyan IA, Knysh VI, Lipkin VM. Soluble Fas antigen in the serum of patients with colon cancer. *Bull Exp Biol Med* 2001; 131: 361-363
- 34 O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Roche D, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer. *J Pathol* 1998; 186: 240-246
- 35 Mann B, Gratchev A, Böhm C, Hanski ML, Foss HD, Demel G, Trojanek B, Schmidt-Wolf I, Stein H, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. FasL is more frequently expressed in liver metastases of colorectal cancer than in matched primary carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 1262-1269
- 36 张伟, 丁尔迅, 王强, 李玉莉, 何金. Fas配体在大肠腺瘤、大肠癌及肝转移中的表达意义. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 12-14
- 37 李世拥, 于波, 安萍, 魏家臣, 张英勇, 蔡惠云. FasL基因表达对结直肠癌细胞肝转影响的研究. *中华外科杂志* 2003; 41: 646-648
- 38 Yoong KF, Afford SC, Randhawa S, Hubscher SG, Adams DH. Fas/Fas ligand interaction in human colorectal hepatic metastases: A mechanism of hepatocyte destruction to facilitate local tumor invasion. *Am J Pathol* 1999; 154: 693-703
- 39 Bennett MW, O'Connell J, Houston A, Kelly J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Fas ligand upregulation is an early event in colonic carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2001; 54: 598-604
- 40 Bergmann-Leitner ES, Abrams SI. Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL. *J Immunol*

- 2000; 164: 4941-4954
- 41 Müllauer L, Gruber P, Sebing D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; 488: 211-231
- 42 Micheau O, Solary E, Hammann A, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem* 1999; 274: 7987-7992
- 43 Zhang W, Ramdas L, Shen W, Song SW, Hu L, Hamilton SR. Apoptotic response to 5-fluorouracil treatment is mediated by reduced polyamines, non-autocrine Fas ligand and induced tumor necrosis factor receptor 2. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 572-578
- 44 Tóth R, Szegezdi E, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Ancian P, Kis-Tóth K, Macsári Z, Fésüs L, Szondy Z. Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD95) ligand are reciprocally regulated by retinoic acid receptor alpha and gamma and involve nur77 in T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1382-1391
- 45 Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 783-789

■同行评价
本文条理清晰, 层次分明, 有一定的借鉴价值。

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

WCJD 和 *WJG* 2008 年对作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 *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。(总编辑: 马连生 2007-12-28)

蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用

刘伟杰, 秦环龙

■背景资料

大肠癌是常见的消化道肿瘤之一, 早期检测和诊断是提高其生存率、改善预后的关键, 但目前仍缺乏特异的筛选标志物。蛋白质组学的迅速发展为解决上述难题提供了可靠的途径。

刘伟杰, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 05DJ14010

通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn

电话: 021-64942226 传真: 021-64701361

收稿日期: 2007-08-06 修回日期: 2007-12-06

Application of proteomic techniques in research on biomarkers for colorectal cancer

Wei-Jie Liu, Huan-Long Qin

Wei-Jie Liu, Huan-Long Qin, Department of General Surgery, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Supported by: Shanghai Science and Technology Commission Funded Projects, No. 05DJ14010

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of General Surgery, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn

Received: 2007-08-06 Revised: 2007-12-06

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in humans, and is often diagnosed at an intermediate or late stage with poor prognosis. Early detection may improve prognosis greatly. Current biomarkers (such as CEA and CA-199) lack sensitivity and specificity for general population screening. Hence, there is a great need for new biomarkers for early detection of CRC. Recently, proteomics has rapidly developed and been applied to every field in the life sciences, especially tumor research. Proteomic techniques give us the possibility to discover early diagnostic and prognostic biomarkers for CRC. In this study, the utilization of proteomics techniques in research on biomarkers for CRC is reviewed briefly.

Key Words: Proteomics; Colorectal cancer; Biomarker

Liu WJ, Qin HL. Application of proteomic techniques in research on biomarkers for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3836-3841

摘要

大肠癌是人类常见的肿瘤之一, 往往被诊断出时已是中晚期, 预后较差。因此, 早期诊断是治疗的关键, 能明显改善预后。虽然当前血清CEA和CA-199等的检测已被广泛应用于大肠癌的筛选, 但其缺乏特异性和敏感性, 这就需要进行进一步寻找新的标志物。近年来, 蛋白质组学的发展已深入到生命科学的各个领域, 尤其应用于肿瘤研究方面, 这就为我们发现新的大肠癌标志物提供了崭新的途径。本文对蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用进展作简要综述。

关键词: 蛋白质组学; 大肠癌; 标志物

刘伟杰, 秦环龙. 蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3836-3841

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3836.asp>

0 引言

大肠癌是常见的消化道肿瘤之一, 死亡率位居发达国家恶性肿瘤死亡率的第2位^[1], 在发展中国家发病率也呈逐年升高趋势^[2]。据调查显示, 目前大肠癌在中国大部分地区已经成为发病率上升最快的恶性肿瘤之一^[3]。由于大部分患者被确诊时已属中晚期, 术后又有一定的复发率, 因此早期诊断和复发的早期检测是其有效治疗的关键。虽然当前血清CEA、CA-199等的检测已被广泛应用于大肠癌的筛选, 但其存在假阳性率和假阴性率高的问题, 缺乏特异性和敏感性。随着后基因组时代的到来, 蛋白质组学(proteomics)迅速发展成为一门新学科。无论是从基因组的局限性, 还是从蛋白质自身研究发展的需要来看, 大规模、全方位的蛋白质组学的研究势在必行^[4-6]。蛋白质组学研究主要依赖三大技术: 蛋白质分离技术、蛋白质鉴定技术和生物信息学^[7-8]。已知细胞从正常状态转变为肿瘤的过程中, 细胞内蛋白质表达谱必然会发生一系列变化, 不同时期蛋白质的表达不同, 蛋白质组学分析技术可从细胞整体水平上检测到这种变化, 这就为寻找早期检测大肠癌肿瘤标

志物提供了一条崭新的途径. 本文就蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用进展作简要综述.

1 蛋白质组学概论及主要技术

1994年, Wilkins首先提出了“蛋白质组(proteome)”概念^[9], 其含义是指一个基因组、一个细胞或组织内表达的全部蛋白质. 蛋白质组学则是一衍生概念, 是指应用各种技术手段来研究蛋白质组的一门新兴学科, 通过对蛋白质的丰度和性质动态变化的考察, 揭示蛋白质的活动规律解释基因调控机制, 从而透视到生命的本质^[5]. 目前, 蛋白质组学研究已广泛应用于肿瘤生物学标记物的筛选和鉴定、肿瘤分类、治疗及肿瘤发生机制等方面^[10]. 其主要的技术方法有:

1.1 双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 2-DE技术是蛋白质组学研究的核心技术之一, 由O'Farrell *et al*^[11]于1975年建立. 他作为一种比较成熟的技术已被广泛应用20余年, 也是目前对蛋白质组分辨率最高、重复性最好的分离技术^[12]. 其基本原理是根据蛋白质的等电点和分子量不同在二维凝胶上将蛋白质分成若干个点, 根据点的位置寻找差异表达蛋白进行质谱鉴定从而发现特异性标记物. 2-DE技术具有分辨率高、重复性好、操作方便和结果直观等优点, 但该技术不易分离极酸或极碱、分子量大于200 ku或小于10 ku、低丰度蛋白、难溶解蛋白和膜蛋白等. 近几年逐渐发展完善的高效液相色谱、差异凝胶电泳、毛细管电泳技术等新技术可以用作对2-DE的补充, 具有更好的重复性和灵敏度^[13-14].

1.2 质谱(mass spectrometry, MS) 1906年, Thomas发明了质谱仪. 20世纪80年代末美国科学家John B•Fenn和日本科学家田中耕一分别开发出电喷雾电离和基质辅助激光解吸电离两种软电离技术, 推动了生物质谱的发展. MS技术的基本原理是通过电离源将蛋白质分子转化为气相离子, 然后利用质谱分析仪的电场和磁场把蛋白质离子分离开, 最后确定离子的质荷比(M/Z)值, 分析鉴定未知蛋白质. 该技术具有高灵敏度、高精度、高通量和易自动化等优点, 不足之处是难于进行N端及C端的氨基酸序列鉴定. 目前常用于鉴定蛋白质的MS技术有: (1)基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS): 利用基质吸收激光的能量使固相的多肽样品离子化, 获得蛋白质的肽质量指纹图(PMF), 然后通过

相应的数据库搜索, 鉴定蛋白质; (2)电喷雾质谱(ESI-MS): 在喷射过程中以连续离子化方式使多肽样品电离; (3)串联质谱(MS/MS): 用于肽段的氨基酸测序; (4)表面增强激光解吸离子化-飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS): 直接在固相吸附蛋白质的芯片表面使用脉冲氮激光能量, 使被捕获的靶蛋白从芯片表面电离出来, 根据靶蛋白在离子装置中的飞行时间测量出其分子质量.

1.3 激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)与蛋白质芯片(protein chip) 激光捕获显微切割技术(LCM)是组织水平上蛋白质组样品制备的一大突破. LCM是在不破坏组织结构, 保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下, 直接从冰冻或石蜡包埋组织切片中获取目标细胞, 可以避免肿瘤组织的异质性对蛋白质分析的影响, 确保研究结果的可靠性. 该技术由Emmert-Buck *et al*^[15]于1996年发明, 是目前较为理想的细胞提取工具. 蛋白质芯片技术是一种高通量、微型化和自动化的蛋白质分析技术, 他无需进行蛋白质分离, 只是利用抗体或其他类型亲和探针构成的芯片进行检测, 可同时检测几千种蛋白质, 效率非常高. LCM和蛋白质芯片联合应用, 能快速应用少量的细胞产生和分析蛋白质谱或指纹, 这样可以评估正常和病理标本的全部变化.

1.4 生物信息学 随着功能基因组研究的深入, 2-DE、MS和蛋白质芯片分析等都将产生高通量的生物信息, 因此需要多种庞大的数据库作为支持, 数据库和分析软件成了蛋白质组学研究不可缺少的信息学手段. 针对不同的研究目的, 蛋白质数据库的种类各不相同, 包括蛋白质2-DE图谱数据库、蛋白质氨基酸序列数据库、蛋白质结构域与家族数据库和蛋白质高级结构及分类数据库等. 其中2-DE图谱数据库是蛋白质组学研究常用数据库, 分析软件有Melanie、PDQuest、Delta2D和Image Master等.

2 蛋白质组学技术在大肠癌肿瘤标志物研究中的应用

随着上述各项技术的不断发展, 蛋白质组学已能动态、整体和定量的观察大肠癌发生发展过程中蛋白质种类、数量的改变, 在寻找大肠癌肿瘤标志物的研究中已得到了广泛应用.

2.1 2-DE和MS的应用是肿瘤标志物研究的主要手段 Stulik *et al*^[16]利用2-DE和MS技术比较了正常和癌变大肠黏膜, 发现大肠癌中肝脂肪酸结

■研发前沿
后基因组时代中, 生命科学的研究重心将从基因组学转移到蛋白质组学. 蛋白质组学在寻找敏感和新的肿瘤生物分子标记物方面有着极为广阔的应用前景.

■创新盘点
SELDI-TOF-MS技术以整个蛋白质组作为检测对象,显示疾病过程中多重蛋白质变化、敏感性和特异性大于单一指标的诊断方法。

合蛋白、肌动蛋白结合蛋白/22- α 平滑肌蛋白和环氧酶2表达下调,而钙结合蛋白S100家族的几个成员(S100A9, S100A8, S100A11)和热休克蛋白70(HSP70)表达上调,且都有统计学意义。Chaurand *et al*^[17]通过MALDI-MS技术对鼠结肠癌变黏膜及正常黏膜进行对照分析,发现的特异性蛋白信号中也包括前述的S100A9, S100A8, S100A11,提示S100蛋白家族在大肠癌形成中可能具有重要意义。Jungblut *et al*^[18]经过2-DE发现一种pI5.6/13 ku的蛋白只在肿瘤组织中表达,该蛋白的两个序列与来自于钙粒蛋白B(calgranulin B)的两个多肽能很好匹配,进一步的研究证实肿瘤和癌变前潜在肿瘤组织中calgranulin B有高热特异性的表达。湘雅医院裴海平 *et al*^[19]通过筛选大肠癌组织与正常大肠组织中的差异表达蛋白,选择在癌组织中高表达的30个点进行质谱和生物信息学分析,鉴定出这些差异蛋白包括谷胱甘-S-转移酶(GST), annexin IV, β -actin, APOA 1蛋白,肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)和HSP27等。这些发现都有可能用作新的生物标记进行结肠癌前病变的筛选和早期发现结肠癌。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一个成员庞大的多肽类蛋白质家族,作为分子伴侣,参与其他蛋白质的折叠、转运和合成等过程,并可与细胞内的其他肽类蛋白质结合,参与细胞的抗损伤、修复和热耐受过程。随着对热休克蛋白研究的不断深入, HSP在肿瘤发生和发展过程中的重要意义已引起广泛关注,现已发现多种HSP在肺癌^[20]、乳腺癌^[21]等多种肿瘤细胞中表达增强,与肿瘤的生物行为^[22]、肿瘤细胞凋亡^[23-24]、肿瘤抗药性^[25]和肿瘤免疫^[26]等密切相关。研究表明HSP与大肠癌之间也有着密切关系。除了前述的HSP70和HSP27外, HSP60、HSP90和HSP10等也相继被发现在大肠癌中呈过度表达^[27-30]。Coghlin *et al*^[31]利用2-DE、MS、免疫组化技术对268例大肠癌患者的肿瘤组织和正常结肠黏膜进行对照研究,发现在肿瘤组织中TCP-1的两个亚基 β 和 ϵ 表达明显上调, TCP-1- β 的过度表达又预示着不良的预后,而TCP-1也正是HSP60家族中的重要一员,在肌动蛋白、微管蛋白的组装和折叠中发挥重要的作用。王少彬 *et al*^[32]研究显示, HSP10在大肠腺瘤、大肠腺癌组织中的表达明显强于正常大肠黏膜组织,在腺瘤转变为腺癌的过程中, HSP10呈持续高表达状态,表明HSP10的高表达可能与大肠癌的发生发展有关。目前认为大肠癌的发生发展

经历原癌基因激活、抑癌基因失活和DNA低甲基化等多基因多步骤的变化过程^[33],其中 ras 基因突变是大肠癌发生的早期启动性事件^[34]。Lin *et al*^[35]研究发现, HSP10与 ras 基因之间存在着密切的关系, HSP10是 ras GTP酶发挥其功能不可缺少的辅助蛋白质之一,在细胞内信号转导通路中起重要作用。所以, HSP10也可能通过与 ras 基因间的作用,介导恶性肿瘤的发生。对HSP的研究已成为分子生物学的一大热点,相信也会成为寻找大肠癌肿瘤标志物的重要突破口。

核基质蛋白(nuclear matrix protein, NMP)也是值得大家关注的一类蛋白。核基质是存在于真核细胞核内的非水溶性纤维蛋白网络系统,其主要成分为非组蛋白,此外还含有少量的RNA和DNA。核基质蛋白在维持细胞核的形态结构、染色体组装、DNA复制和RNA转录等一系列活动中发挥重要作用,并且具有组织细胞特异性和肿瘤相关性。有研究表明^[36]某些抑癌基因如p53等产物可通过与核基质结合参与细胞周期和细胞生长的调节,如果核基质蛋白成分发生改变,则有可能引起癌基因或抑癌基因功能的改变,从而导致细胞生物学行为改变。特异性的NMP最早被发现于膀胱癌^[37]和前列腺癌^[38]等泌尿系统肿瘤,近年来也逐渐被证实存在于其他肿瘤(包括大肠癌)。Brunagel *et al*^[39]利用2-DE鉴定了人大肠癌中特异性NMP指纹的存在。高静 *et al*^[40]应用2-DE、免疫组化方法对12例大肠癌组织及正常大肠组织的NMP成分进行了比较,发现5个特异性NMP只存在于肿瘤组织中,另有3个特异性NMP只在正常组织中出现,同时还发现不同分期的大肠癌NMP表达也存在差异,核基质N4仅见于高分化无淋巴结转移的大肠癌,却在低分化伴有淋巴结转移的大肠癌中消失,提示正常、不同分化程度以及淋巴结转移与否的大肠癌核基质蛋白成分存在差异,在3例低分化伴有局部淋巴结转移者显示CB、MMP-9强阳性,这种差异性核基质蛋白的改变,有可能导致某些基因表达异常,包括酶如CB、MMP-9等的基因异常表达,从而促进肿瘤浸润转移。由此可见,特异性NMP有望成为大肠癌的肿瘤标志物,并可作为肿瘤分期的重要依据。

2.2 蛋白质芯片表面增强激光解析离子化-飞行时间(SELDI-TOF-MS)技术 是蛋白质组学研究中的一种全新的技术平台,在Hutchens *et al*^[41]研究的基础上, Ciphergen Biosystems公司发明了表面增强的激光解析/电离(SELDI)蛋白芯片

质谱技术平台, 主要由蛋白质芯片、飞行质谱和分析软件3部分组成, 具有高通量、多功能、易使用、快速度和低成本的优点, 成为一种快速、可重复、高度敏感、易于采用的分析手段和诊断工具, 也已被广泛应用到大肠癌肿瘤标志物的研究中. Chen *et al*^[42]利用SELDI-TOF-MS技术, 通过对147份血清标本(55例大肠癌和92名健康人)的检测, 发现4个差异表达的蛋白质峰, 通过生物信息学处理后, 利用这4个蛋白质峰组合的蛋白质特征性的表达谱可以将健康人与结肠直肠癌患者区分开, 其敏感性和特异性分别为82.6%和91.9%. Melle *et al*^[43]应用SELDI-TOF-MS技术研究了大肠癌组织和邻近正常黏膜的蛋白质指纹图谱以明确肿瘤特异性改变, 其中垂体腺苷酸环化酶激活肽、核异质性核糖核蛋白A1、黄素还原酶、钙结合蛋白、肿瘤转移抑制基因NM23-H2、亲环素A和平滑肌蛋白22- α 在受检标本中差异有显著意义. Shiwa *et al*^[44]也采用SELDI-TOF-MS技术研究了9种不同组织的肿瘤细胞株的蛋白质表达差异图谱, 结果在结肠癌细胞株中发现了差异蛋白, 并鉴定为 α -胸腺素原, α -胸腺素原的表达水平在结肠癌细胞中明显高于正常结肠黏膜细胞的表达, 提示其可能成为结肠癌诊断有意义的生物标记物. Albrethsen *et al*^[45]应用SELDI-TOF-MS比较结肠癌患者血清和正常人血清的蛋白质指纹图谱及结肠癌组织和正常结肠组织的蛋白质指纹图谱发现, 人中性粒细胞防御素组分(HNP1-3)在结肠癌患者血清中和结肠癌组织蛋白提取物中表达上调, 应用微流检测技术发现从结肠癌组织中提纯的HNP1-3对哺乳动物细胞是致命的, 从而得出结论, HNP1-3作为结肠癌的标记物, 可以和一些现有的方法联合用于诊断结肠癌, 也可作为治疗随访的预后标志物. 王全晖 *et al*^[46]采用SELDI-TOF-MS蛋白芯片技术对64例大肠癌患者手术前后和40名正常人进行了血清蛋白质谱对比分析研究, 发现有42个蛋白质峰具有判断性差别, 其中19个具有显著差别, 通过建立数据库和软件分析, 最终确立了以平均分子质量为5972.67Da、5927.21Da、6113.48Da、5908.55Da、4292.51Da这5个蛋白质组成的模板, 能正确地将大肠癌患者和正常人分组, 正确分组率达80%, 这些经过筛选得到的蛋白质可能成为早期诊断大肠癌重要的标志物.

2.3 LCM和蛋白质芯片技术 在最近的肿瘤研究中, LCM和蛋白质芯片等新技术发挥了重要作

用, 并被应用于大肠癌的研究. Lawrie *et al*^[47]对结肠癌切除标本上的癌组织应用LCM选择性地切取肿瘤细胞, 发现经过LCM处理后所获得的蛋白质状态单一, 更适合于2-DE, 溶解的蛋白质在2-DE胶上保持了预期的移动性, 对MS也无影响. Sreekumar *et al*^[48]应用抗体阵列确定了Lovo结肠癌细胞系的蛋白质表达图谱. Von Eggeling *et al*^[49]将LCM与蛋白质芯片相结合, 比较正常组织与肿瘤组织的蛋白质表达谱差异, 绘制出了蛋白质组表达谱. Kitahara *et al*^[50]联合应用LCM和cDNA微阵列, 研究了结肠直肠癌发生中基因表达的变化, 发现44个基因上调, 191个基因下调.

3 结论

总之, 蛋白质组学在大肠癌肿瘤标记物研究方面取得快速进展, 其技术手段的不断进步加速了标记物的研究步伐. 虽然他仍有不尽完善之处, 例如2-DE还存在蛋白质的丢失、分离容量有限且操作费时和低丰度蛋白难以去除等, 这将影响肿瘤标记物研究的精确性与检出率, 但相信随着研究的深入及样本切割技术、电泳技术、芯片技术、质谱技术和生物信息学等的不断完善与发展, 蛋白质组学技术可以更加快速、灵敏、特异、自动化地进行肿瘤蛋白质组分析, 对大肠癌肿瘤标志物的研究必将取得实质性的进展.

4 参考文献

- 1 Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2137-2150
- 2 Eilstein D, Hedelin G, Schaffer P. Incidence of colorectal cancer in Bas-Rhin, trend and prediction in 2009. *Bull Cancer* 2000; 87: 595-599
- 3 Ji BT, Devesa SS, Chow WH, Jin F, Gao YT. Colorectal cancer incidence trends by subsite in urban Shanghai, 1972-1994. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 661-666
- 4 Alberts B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 1998; 92: 291-294
- 5 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-1861
- 6 Appel RD, Palagi PM, Walther D, Vargas JR, Sanchez JC, Ravier F, Pasquali C, Hochstrasser DF. Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis* 1997; 18: 2724-2734
- 7 Mahon P, Dupree P. Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis* 2001; 22: 2075-2085
- 8 Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y,

■应用要点
热休克蛋白、核基质蛋白等有关蛋白可作为今后重点研究的对象, 希望能从中找到特异性的大肠癌肿瘤标志物.

■名词解释

核基质蛋白: 是存在于真核细胞核内的非水溶性纤维蛋白网络系统, 在维持细胞核的形态结构、染色体组装、DNA复制和RNA转录等一系列活动中发挥重要作用, 并且具有组织细胞特异性和肿瘤相关性。

- Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9390-9395
- 9 Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996; 14: 61-65
- 10 Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J* 2001; 7: 69-78
- 11 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-4021
- 12 Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665-3685
- 13 Wu SL, Hancock WS, Goodrich GG, Kunitake ST. An approach to the proteomic analysis of a breast cancer cell line (SKBR-3). *Proteomics* 2003; 3: 1037-1046
- 14 Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003; 3: 36-44
- 15 Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001
- 16 Stulik J, Koupilova K, Osterreicher J, Knizek J, Macela A, Bures J, Jandik P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma. *Electrophoresis* 1999; 20: 3638-3646
- 17 Chaurand P, DaGue BB, Pearsall RS, Threadgill DW, Caprioli RM. Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 2001; 1: 1320-1326
- 18 Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 1999; 20: 2100-2110
- 19 裴海平, 朱红, 曾亮, 李宜雄. 应用二维电泳和质谱技术筛选大肠癌与正常肠组织的差异表达蛋白. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 748-752
- 20 Cappello F, Di Stefano A, D'Anna SE, Donner CF, Zummo G. Immunopositivity of heat shock protein 60 as a biomarker of bronchial carcinogenesis. *Lancet Oncol* 2005; 6: 816
- 21 Barazi HO, Zhou L, Templeton NS, Krutzsch HC, Roberts DD. Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha 3 beta 1 integrin activation. *Cancer Res* 2002; 62: 1541-1548
- 22 Leonardi R, Pannone G, Magro G, Kudo Y, Takata T, Lo Muzio L. Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002; 9: 261-266
- 23 Dressel R, Grzeszik C, Kreiss M, Lindemann D, Herrmann T, Walter L, Gunther E. Differential effect of acute and permanent heat shock protein 70 overexpression in tumor cells on lysability by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2003; 63: 8212-8220
- 24 Zhao C, Wang E. Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal* 2004; 16: 313-321
- 25 Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett* 2001; 168: 173-181
- 26 Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 185-194
- 27 王树东, 郑长青, 刘明杰. 不同类型热休克蛋白在大肠癌中的表达及其意义探讨. *中国实用内科杂志* 2003; 23: 429-430
- 28 Melle C, Bogumil R, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von Eggeling F. Detection and identification of heat shock protein 10 as a biomarker in colorectal cancer by protein profiling. *Proteomics* 2006; 6: 2600-2608
- 29 Cappello F, Bellafiore M, Palma A, David S, Marciano V, Bartolotta T, Sciume C, Modica G, Farina F, Zummo G, Bucchieri F. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis. *Eur J Histochem* 2003; 47: 105-110
- 30 Cappello F, Bellafiore M, David S, Anzalone R, Zummo G. Ten kilodalton heat shock protein (HSP10) is overexpressed during carcinogenesis of large bowel and uterine exocervix. *Cancer Lett* 2003; 196: 35-41
- 31 Coghlin C, Carpenter B, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI. Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 210: 351-357
- 32 王少彬, 陈俊辉, 陈理明, 黄杰雄, 邱前程. 热休克蛋白10在大肠癌的表达及其临床病理意义. *中国肿瘤临床与康复* 2007; 14: 203-207
- 33 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
- 34 Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297
- 35 Lin KM, Hollander JM, Kao VY, Lin B, Macpherson L, Dillmann WH. Myocyte protection by 10 kD heat shock protein (Hsp10) involves the mobile loop and attenuation of the Ras GTP-ase pathway. *FASEB J* 2004; 18: 1004-1006
- 36 Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 2005; 437: 564-568
- 37 Attallah AM, Sakr HA, Ismail H, Abdel-Hady el-SK, El-Dosoky I. An office-based immunodiagnostic assay for detecting urinary nuclear matrix protein 52 in patients with bladder cancer. *BJU Int* 2005; 96: 334-339
- 38 Lakshmanan Y, Subong EN, Partin AW. Differential nuclear matrix protein expression in prostate cancers: correlation with pathologic stage. *J Urol* 1998; 159: 1354-1358
- 39 Brunagel G, Vietmeier BN, Bauer AJ, Schoen RE,

- Getzenberg RH. Identification of nuclear matrix protein alterations associated with human colon cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2437-2442
- 40 高静, 王娅兰. 大肠癌核基质蛋白变化与其生物学行为的关系. *重庆医科大学学报* 2006; 31: 302-306
- 41 Hutchens TW, Yip TT. Protein interactions with surface-immobilized metal ions: structure-dependent variations in affinity and binding capacity with temperature and urea concentration. *J Inorg Biochem* 1991; 42: 105-118
- 42 Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8380-8385
- 43 Melle C, Osterloh D, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von Eggeling F. Identification of proteins from colorectal cancer tissue by two-dimensional gel electrophoresis and SELDI mass spectrometry. *Int J Mol Med* 2005; 16: 11-17
- 44 Shiwa M, Nishimura Y, Wakatabe R, Fukawa A, Arikuni H, Ota H, Kato Y, Yamori T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 18-25
- 45 Albrechtsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* 2005; 5: 8
- 46 王全晖, 高春芳, 王秀丽, 赵光, 李冬晖, 许洋, 马龙华. 利用SELDI-TOF质谱技术分析大肠癌患者血清蛋白质谱的变化. *中国病理生理杂志* 2005; 21: 1896-1900
- 47 Lawrie LC, Curran S, McLeod HL, Fothergill JE, Murray GI. Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 253-258
- 48 Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* 2001; 61: 7585-7593
- 49 von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques* 2000; 29: 1066-1070
- 50 Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res* 2001; 61: 3544-3549

■同行评价
本文内容新颖, 文笔流畅, 具有较强的可读性.

编辑 李军亮 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.

小檗碱对肝细胞核因子6 mRNA表达及葡萄糖激酶活性的影响

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 陆小红, 董慧, 高志强

■背景资料
肝细胞核因子家族成员变异在糖代谢中的重要调节作用及其变异参与糖尿病发病过程的重要性引起了高度关注。

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 董慧, 高志强, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
陆小红, 湖北天茂集团制剂厂 湖北省荆门市 448000
国家自然科学基金资助项目, No. 30500685
通讯作者: 陆付耳, 430030, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663237 传真: 027-83663237
收稿日期: 2007-08-31 修回日期: 2007-12-13

Effects of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor 6 and glucokinase activity in mouse primary hepatocytes

Zhong-Qing Yan, San-Hua Leng, Fu-Er Lu, Xiao-Hong Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao

Zhong-Qing Yan, San-Hua Leng, Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiao-Hong Lu, Hubei Biocause Pharmaceutical Co., Ltd, Jingmen 448000, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500685

Correspondence to: Fu-Er Lu, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2007-08-31 Revised: 2007-12-13

Abstract

AIM: To observe the expression of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6) and the activity of glucokinase (GK), the key enzyme in glucose metabolism, and to investigate the possible mechanism of berberine in treating type II diabetes.

METHODS: Mouse primary hepatocytes were isolated by an improved single two-step perfusion method. The murine hepatocytes were incubated with berberine (0, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol/L}$) and 1 mmol/L metformin for 24 hours. mRNA expression for HNF6 was determined by

RT-PCR and analyzed by consequent quantification, and the activity of GK was detected by an enzyme kinetics method.

RESULTS: Compared with the negative control group, 1, 3, 10 or 30 $\mu\text{mol/L}$ berberine promoted the expression of HNF6 mRNA (1.00 ± 0.21 , 1.11 ± 0.06 , 1.37 ± 0.10 or 1.40 ± 0.09 vs 0.68 ± 0.02 ; $P < 0.01$). At 10 or 30 $\mu\text{mol/L}$, berberine up-regulated GK activity (0.069 ± 0.082 , 0.080 ± 0.073 vs 0.009 ± 0.007 ; $P < 0.05$). Both of these reached a maximum at a concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$. At 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine, expression of HNF6 mRNA and activity of GK decreased, probably because high-concentration berberine inhibited the growth of primary hepatocytes.

CONCLUSION: It is suggested the effects of berberine in improving glucose metabolism may be associated with its up-regulation of HNF6 mRNA expression and induction of hepatic GK activity.

Key Words: Berberine; Hepatocyte Nuclear Factors; Primary Hepatocytes; Glucokinase; Reverse transcription polymerase chain reaction

Yan ZQ, Leng SH, Lu FE, Lu XH, Dong H, Gao ZQ. Effects of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor 6 and glucokinase activity in mouse primary hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3842-3846

摘要

目的: 观察小檗碱对小鼠原代肝细胞核因子6(HNF6) mRNA表达及葡萄糖代谢关键酶葡萄糖激酶(GK)活性的影响, 探讨小檗碱治疗2型糖尿病的分子机制。

方法: 采用改良两步灌流法培养原代肝细胞, 用不同浓度的小檗碱(0, 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$)和1 mmol/L二甲双胍干预24 h后, 采用MTT比色法观察小檗碱对原代肝细胞增殖的影响; 采用RT-PCR方法检测HNF6 mRNA表达, 同时检测GK的活性。

结果: 与阴性对照组相比, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$

的小檗碱均能促进HNF6 mRNA的表达(1.00 ± 0.21 , 1.11 ± 0.06 , 1.37 ± 0.10 , 1.40 ± 0.09 vs 0.68 ± 0.02 ; $P < 0.01$); 当小檗碱为10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 均可上调GK的活性(0.069 ± 0.082 , 0.080 ± 0.073 vs 0.009 ± 0.007 ; $P < 0.05$); 二者均在30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值. 小檗碱为100 $\mu\text{mol/L}$ 时HNF6 mRNA的表达、GK的活性与阴性对照组无差异, 可能与其抑制肝细胞生长有关.

结论: 小檗碱改善糖代谢的作用可能与其调节HNF6的表达进而调节GK活性有关.

关键词: 小檗碱; 肝细胞核因子; 原代肝细胞; 葡萄糖激酶; 逆转录聚合酶链反应

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 陆小红, 董慧, 高志强. 小檗碱对肝细胞核因子6 mRNA表达及葡萄糖激酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3842-3846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3842.asp>

0 引言

人们在研究鉴定调节肝脏基因表达的时候发现了肝细胞核因子家族成员(hepatocyte nuclear factors, HNFs), 进而发现HNFs变异可引起三种年轻的成人发病型糖尿病(MODY1、MODY3和MODY5)^[1]; 因而HNFs在糖代谢中的重要调节作用及其变异参与糖尿病发病过程的重要性引起了高度关注. HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族, 可引起机体糖和脂质代谢紊乱, 导致II型糖尿病^[2-4], HNF6就是其中之一. 小檗碱是中药黄连的主要成分, 具有广泛的生物化学和药理学作用. 近年来有多项研究表明小檗碱能够促进肝细胞摄取葡萄糖和调节脂质代谢^[5-6]. 本实验从小檗碱与HNF6及GK的关系方面了解其内在联系, 探讨其治疗糖尿病的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: 6-8 wk SPF级昆明种小鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物学部. 小檗碱、IV型胶原酶、胰岛素、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)均购自Sigma公司; 二甲双胍由武汉合中化工制造厂馈赠; 地塞米松购自武汉滨湖双鹤药业; 促肝细胞生长因子购自吉林省辉南辉发制药公司; RPMI 1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、5'-三磷酸腺苷二钠(ATPNa₂)均购自Amresco公司; RT-PCR试剂均为TOYOBO公司产品. ELX800全自动酶标测试仪, OLYMPUS倒置

显微镜, 高精密度电子分析天平, Sigma低温高速离心机, 美国进口水套式CO₂培养箱, Eppendorf梯度PCR仪, 山东高密彩虹分析仪器有限公司半自动生化分析仪.

1.2 方法

1.2.1 原代肝细胞分离和培养: 按照Seglen法^[7]并略加调整. 昆明小鼠腹腔麻醉, 酒精消毒体表, 断头放血后打开腹腔, 使其充分暴露肝脏, 剥离下腔静脉、门静脉, 从下腔静脉匀速灌流预温至37℃的无钙灌流液(NaCl 8.3 g/L, KCl 0.5 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.2513 g/L, EDTA 0.186 g/L, HEPES 2.4 g/L, pH7.4)30 mL; 待其流出液体澄清后, 用止血钳结扎门静脉改作灌流预温至37℃的0.5 g/L IV型胶原酶灌流液(IV型胶原酶0.5 g/L, NaCl 3.9 g/L, KCl 0.5 g/L, CaCl₂ 0.7 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.2513 g/L, HEPES 2.4 g/L, pH7.5)20 mL, 待肝脏表面出现龟背裂纹后停止灌流; 取下肝脏用RPMI 1640(不含血清)培养基终止消化, 用镊子钝性分离肝细胞, 得到的肝细胞混悬液用200目尼龙网滤去不能消化的肝包膜和纤维组织, 500 r/min离心3次, 得到纯度大于90%、活力大于90%的肝细胞. 肝细胞培养液(RPMI 1640培养基, 胎牛血清100 mL/L, 促肝细胞生长因子0.02 g/L, 地塞米松0.005 g/L, 胰岛素0.005 g/L, pH7.4)培养3 d后用于实验.

1.2.2 MTT实验: 将原代肝细胞接种在96孔板中, 加入不同浓度的小檗碱(0, 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$), 1 mmol/L二甲双胍干预, 各组DMSO含量均为0.2%, 且均是无血清培养, 每组各5个复孔. 培养24 h后, 加入0.5%的MTT溶液10 μL . 继续培养4 h, 弃去培养液, 加入100 μL 的DMSO, 充分振荡混匀后, 置于酶标仪上检测490 nm吸光度值.

1.2.3 RT-PCR检测小鼠原代肝细胞、HNF6 mRNA表达: 药物干预细胞24 h后提取RNA, 提取按照说明书操作, 用核酸分析仪检测RNA的浓度和纯度, 取 A_{260}/A_{280} 比值在1.8-2.0的RNA进行实验. 引物自行设计并由上海生工生物工程公司合成, 引物设计见表1. 取2 μg 的RNA逆转录合成cDNA单链进行PCR扩增, 扩增条件为: 94℃预变性5 min; HNF6: 94℃变性1 min, 退火58℃ 1 min, 72℃延伸1 min; β -actin: 94℃变性50 s, 退火54℃ 50 s, 72℃延伸50 s; 扩增的循环数分别为29、34个循环; 最后72℃ 10 min. 扩增产物经16 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像分析仪上进行光密度扫描. 进行电泳条带分析. 以目的条

■研发前沿
HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族, 可引起机体糖和脂质代谢紊乱, 导致2型糖尿病, HNF6就是其中之一, 本实验从小檗碱与HNF6及GK的关系方面了解其内在联系, 探讨其治疗糖尿病的机制.

■相关报道

近年在权威期刊《Science》发表的关于肝细胞核因子家族异常表达和2型糖尿病发生密切相关的论文,揭示HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族,可引起机体糖和脂质代谢紊乱,导致2型糖尿病。

表 1 PCR引物序列和产物长度

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
HNF6	上游 5'CAAATGGCAGGACGAGG3'	434
	下游 5'GTGGTGAACAGATAAGAACG3'	
β-actin	上游 5'TGCCCATCTATGAGGGTTAC3'	579
	下游 5'GGAAGGTGGACAGTGAGGC3'	

带比β-actin的相对积分吸光度值表示结果。

1.2.4 酶活性测定: GK活性用酶法分析的方法检测^[8], 主要步骤如下, 原代肝细胞接种在6孔板中, 待加入不同浓度的药物培养24 h后, 弃去培养液, D-Hanks漂洗3遍后, 用PBS清洗细胞单层3次, 用含K₂HPO₄(20 mmol/L)、EDTA(1 mmol/L)、MgCl₂(110 mmol/L)以及DTT(5 mmol/L)的预冷缓冲液收集细胞并超声破碎处理, 将处理后液体在4℃以12 000 g离心15 min, 收集上清。酶活性检测反应液包括高糖(100 mmol/L)和低糖(0.5 mmol/L)两组, 其组成为: HEPES(50 mmol/L, pH7.4), KCl(100 mmol/L), MgCl₂(7.4 mmol/L), NAD(0.5 mmol/L), 0.05% BSA, G6PDH(3 mg/L), ATP(5 mmol/L), β-mercatoethanol(15 mmol/L)及上述不同浓度葡萄糖。将含GK的上清10 μL加到200 μL反应液中, 并于30℃温育1 h, 加入2 mL NaHCO₃(500 mmol/L, pH9.4)来终止反应。在347 nm发射光、448 nm激发光下测定吸光度A。每个测量中, 以无ATP的0.5和100 mmol/L葡萄糖时的值作为空白管。GK活性用100 mmol/L葡萄糖浓度时的活性减去0.5 mmol/L葡萄糖浓度时的活性。蛋白浓度用考马斯亮蓝试剂盒测定。用以下公式计算GK的活性: (高糖A-低糖A)/(蛋白质量×时间)。

统计学处理 所有数据均采用SPSS13.0软件mean±SD进行分析, 用单因素方差分析进行统计。

2 结果

2.1 分离得到的肝细胞 从小鼠得到的原代肝细胞大多为圆形或类圆形, 少数为不规则形状, 胞质丰富, 其中可见大量颗粒状内容物(图1A)。HE染色可见较多单核、双核细胞及少数三核细胞(图1B)。

2.2 小檗碱对原代肝细胞活力的影响 MTT结果显示随着小檗碱浓度的增加, 存活率逐渐有所下降, 表明其对原代肝细胞的抑制作用增强(表2)。

2.3 小檗碱对原代肝细胞HNF6 mRNA表达的影响 1, 3, 10, 30, 100分别表示小檗碱浓度为1, 3,

表 2 不同浓度小檗碱干预原代肝细胞24 h后存活率比较(n = 6)

小檗碱(mol/L)	A ₄₉₀	存活率(%)
0	1.984±0.114	100.00
1	2.023±0.150	102.02
3	1.671±0.334 ^a	84.39
10	1.628±0.270 ^a	82.24
30	1.530±0.248 ^b	77.37
100	1.505±0.115 ^b	76.01

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 阴性组(0 mol/L)。

10, 30, 100 mol/L; 二甲表示二甲双胍的浓度为1 mmol/L, 与阴性对照组(0 μmol/L)相比, 小檗碱在1, 3, 10, 30 μmol/L时和二甲双胍均能促进HNF6 mRNA的表达(P<0.01), 以30 μmol/L时表达最多(图2)。

2.4 小檗碱对GK活性的影响 0, 1, 3, 10, 30, 100分别表示小檗碱浓度为0, 1, 3, 10, 30, 100 μmol/L, 二甲表示二甲双胍的浓度为1 mmol/L, 由图3可知, 与阴性组(0 μmol/L)比较, 小檗碱能够上调GK活性的表达, 但只有当其浓度为10 μmol/L, 30 μmol/L时其活性才明显增强(P<0.05, 图3), 以30 μmol/L时最高。

3 讨论

小檗碱又名黄连素, 是中药黄连的主要成分, 长期以来在临床中广泛用于治疗消化性溃疡及腹泻^[9-11], 本实验室前期研究发现小檗碱能够促进胰岛β-细胞分泌胰岛素^[12], 并证实小檗碱有降糖和调脂的作用, 其他同行也证实小檗碱可以促进肝细胞摄取葡萄糖和调节脂质代谢^[5-6]。小檗碱用于糖尿病的治疗越来越受到重视。

HNF6在肝脏、胰腺、大脑、脾脏及肠道中均有表达, 他与肝脏内至少227个基因结合, 并可参与肝脏葡萄糖代谢中多种酶的调节。GK是一种已糖激酶, 是葡萄糖代谢的关键酶之一, 其特异性存在于成熟肝细胞和胰岛细胞中。GK活性增强, 促进肝脏葡萄糖磷酸化, 使肝糖原合成能力增加, 抑制肝糖原异生, 从而维持血糖稳定。GK是HNF6下游直接或间接效应因子, 还有人认为HNF6可控制GK基因的表达^[13]。

本实验中观察到, 不同浓度的小檗碱作用于原代肝细胞, 引起HNF6 mRNA及GK活性发生不同的变化, 但总体趋势一致, 即在一定浓度范围内随着小檗碱浓度的增大, HNF6 mRNA的表达增加, GK活性增强, 当小檗碱浓度较高

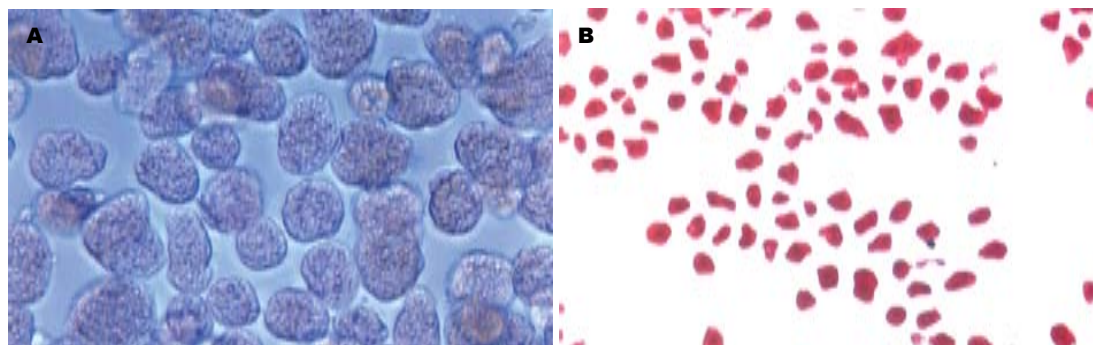


图 1 原代肝细胞. A: 分离纯化的原代肝细胞($\times 400$); B: 原代肝细胞HE染色($\times 100$).

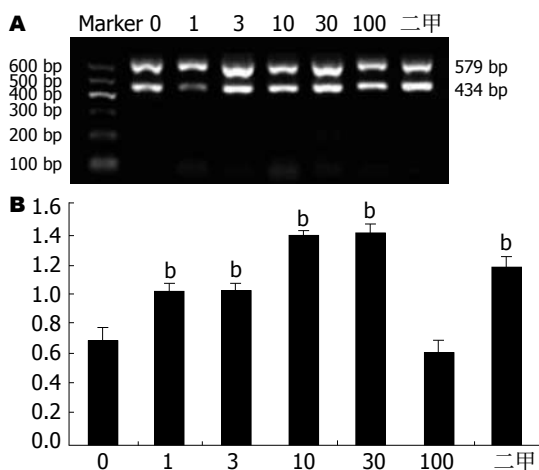


图 2 不同浓度小檗碱HNF6 mRNA表达. A: 各组HNF6 mRNA RT-PCR电泳图; B: 各组对HNF6 mRNA表达的影响($n = 6$, ^b $P < 0.01$).

(100 $\mu\text{mol/L}$)时, HNF6 mRNA的表达与GK的活性反而下降, 这可以提示我们肝细胞核因子的表达、GK的活性与小檗碱呈一定的剂量依赖关系, 即在较低浓度范围内随着小檗碱浓度的增大肝细胞核因子的表达、GK的活性呈上升趋势, 当小檗碱浓度继续增大到某一水平肝细胞核因子的表达、GK的活性反而下降, 这可能与其高浓度抑制原代肝细胞的生长有关. 我们还发现, 与阴性对照组相比, HNF6 mRNA的表达在小檗碱浓度为1, 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时均显著增加($P < 0.01$), GK的活性在小檗碱浓度为10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时才显著增加($P < 0.05$), 二者均在30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值, 也就是说只有当小檗碱浓度达到一定程度时才使HNF6 mRNA表达、GK的活性均明显增加. 小檗碱浓度发生变化引起HNF6 mRNA表达、GK的活性发生变化; 而GK又是HNF6的直接或间接效应因子, 从实验中也发现GK的活性与HNF6 mRNA表达变化趋势基本一致; 两者合二为一小檗碱可能先作用于HNF6, 通过HNF6的变化来调节其下游的肝细

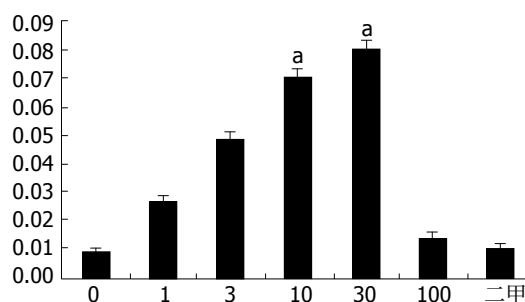


图 3 不同浓度小檗碱对GK活性的影响. ^a $P < 0.05$

胞代谢关键酶GK的活性, 从而达到调节糖代谢的作用. 但是由于他们之间相互作用, 机制十分复杂, 我们还不能确定他们之间是否存在直接因果关系, 其机制有待进一步研究. 另外本实验也观察到二甲双胍虽然也使HNF6 mRNA有一定程度增加, 但并未引起GK活性的增强, 这可能与使其HNF6 mRNA表达量未达到一定程度有关.

总之, 小檗碱能够调节HNF6的表达, 进而调节肝脏葡萄糖激酶的活性, 从而发挥其治疗糖尿病的作用, 因此HNF6可能是小檗碱治疗糖尿病的关键靶点之一. 但是小檗碱如何调控HNF6和糖脂代谢相关激酶的表达以及这些他们之间的相互作用关系有待进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001; 345: 971-980
- 2 Kulkarni RN, Kahn CR. Molecular biology. HNFs-linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science* 2004; 303: 1311-1312
- 3 Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303: 1378-1381
- 4 Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M. Regulation of a transcription factor network

■应用要点
小檗碱分子机制的研究有助于提高其临床应用的合理性, 为进一步筛选和研发具有降糖调脂作用且具我国特色的小檗碱类衍生物提供依据.

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 层次清楚, 有较好的参考价值.

- required for differentiation and metabolism. *Science* 1998; 281: 692-695
- 5 Yin J, Hu R, Chen M, Tang J, Li F, Yang Y, Chen J. Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. *Metabolism* 2002; 51: 1439-1443
- 6 Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med* 2004; 10: 1344-1351
- 7 Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83
- 8 Aalinkeel R, Srinivasan M, Kalhan SC, Laychock SG, Patel MS. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1999; 277: E1061-E1069
- 9 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2806-2808
- 10 杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富. 大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 608-611
- 11 Pan LR, Tang Q, Fu Q, Hu BR, Xiang JZ, Qian JQ. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1334-1338
- 12 Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 496-502
- 13 Lannoy VJ, Decaux JF, Pierreux CE, Lemaigre FP, Rousseau GG. Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia* 2002; 45: 1136-1141

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)

丹酚酸B对肝纤维化大鼠TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平, 温州医学院附属第一医院
浙江省温州市 325000
通讯作者: 卢明芹, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一
医院感染内科. lmq0906@163.com
电话: 0577-88078232
收稿日期: 2007-08-31 修回日期: 2007-11-08

Effect of salvianolic acid B on levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in rats with liver fibrosis

Ming-Qin Lu, Chen-Wei Pan, Ji Li, Yong-Ping Chen

Ming-Qin Lu, Chen-Wei Pan, Ji Li, Yong-Ping Chen, Department of Infection Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China
Corresponding to: Ming-Qin Lu, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. lmq0906@163.com
Received: 2007-08-31 Revised: 2007-11-08

Abstract

AIM: To observe the levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in the livers of rats with hepatic fibrosis, and the effects of salvianolic acid B (SA-B) on it.

METHODS: An animal model of hepatic fibrosis was established by injecting DMN (dimethyl nitroxide) solution into the abdominal cavity for four continuous weeks. Levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in liver tissue were assessed by S-P immunohistochemical staining using polyclonal antibodies against TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2. Pathological characteristics of liver tissue were observed by microscopy after hematoxylin-eosin and Masson staining. Levels of ALT, AST and Alb were detected using an auto-biochemical analytical tool in the laboratory test department of our hospital. Serum levels of HA, LN were detected by radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: Compared with rats in the liver fibrosis group, the pathologic manifestations of those in the SA-B-treated group improved

significantly. The levels of ALT, AST, HA and LN in the treated group were significantly lower than those in the liver fibrosis group (87.0 ± 28.7 U/L vs 190.4 ± 27.4 U/L, 85.6 ± 25.3 U/L vs 178.2 ± 15.9 U/L, 179.7 ± 32.8 mg/L vs 433.3 ± 86.1 mg/L, 135.6 ± 21.1 mg/L vs 224.7 ± 29.2 mg/L, $P < 0.01$). Expression levels of TGF- β 1 and TIMP-2 in the SA-B-treated group were significantly lower than those in the liver fibrosis group (18.53 ± 2.54 vs 12.78 ± 2.65 , 21.88 ± 3.83 vs 14.69 ± 4.51 , $P < 0.01$), and there was no difference in the expression of MMP-2 between the treated group and the hepatic fibrosis group.

CONCLUSION: SA-B is efficient for the treatment of hepatic fibrosis; the mechanisms possibly involve the inhibition of TGF- β 1 and TIMP-2.

Key Words: Salvianolic acid B; Liver fibrosis; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitors of metalloproteinase; Transforming growth factor-beta 1; Radioimmunoassay

Lu MQ, Pan CW, Li J, Chen YP. Effect of salvianolic acid B on levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3847-3851

摘要

目的: 观察丹酚酸B盐(salvianolic acid B, SA-B)对肝纤维化大鼠肝组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)表达的影响, 并探讨SA-B抗肝纤维化的可能机制。

方法: δ SD大鼠30只随机分为正常对照组、模型组和丹酚酸B治疗组, 以5 mL/L的二甲基亚硝胺(DMN)建立肝纤维化模型, 治疗组在造模4 wk后给予SA-B治疗4 wk。应用HE、Masson染色观察肝组织病理纤维化分级, 全自动生化分析仪检测ALT、AST和Alb, 放免法检测HA和LN, S-P免疫组织化学方法检测TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2蛋白质的表达。

结果: 与模型组相比, SA-B能改善肝纤维化大

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变, 其本质为ECM在肝内的过度沉积。我国为乙型病毒性肝炎高发区, 肝炎肝硬化发生率高。因此, 对肝纤维化防治的研究受到越来越多的关注, 探讨肝纤维化的发病机制, 寻求肝纤维化的防治方法已成为肝纤维化研究的热点。

■研发前沿
转化生长因子β1是肝纤维化的启动、进展乃至肝硬化形成中发挥核心作用的细胞因子,肝纤维化的过程与基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达密切相关,在肝纤维化治疗的实验中,有很多针对TGF-β1、MMPs、TIMPs的研究。

鼠肝脏病理组织学结构,治疗组血清ALT、AST、HA和LN水平明显减低(87.0 ± 28.7 U/L vs 190.4 ± 27.4 U/L, 85.6 ± 25.3 U/L vs 178.2 ± 15.9 U/L, 179.7 ± 32.8 mg/L vs 433.3 ± 86.1 mg/L, 135.6 ± 21.1 mg/L vs 224.7 ± 29.2 mg/L, 均 $P < 0.01$),经SA-B干预后TGF-β1和TIMP-2表达明显下降,与模型组相比有显著性差异(18.53 ± 2.54 vs 12.78 ± 2.65 , 21.88 ± 3.83 vs 14.69 ± 4.51 , 均 $P < 0.01$),而MMP-2表达水平无明显变化。

结论: SA-B能改善肝纤维化大鼠肝脏病理组织学结构,可能通过抑制TGF-β1和TIMP-2表达而促进肝纤维化的逆转。

关键词: 丹酚酸B盐; 肝纤维化; 转化生长因子β1; 基质金属蛋白酶-2; 金属蛋白酶组织抑制因子-2; 放射免疫法

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平. 丹酚酸B对肝纤维化大鼠TGF-β1、MMP-2和TIMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3847-3851
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3847.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,其发生和发展与细胞外基质(ECM)在肝内过度沉积有关^[1].这种过度沉积不仅由ECM合成增多引起,更大程度是降解减少的原因.转化生长因子β1(TGF-β1)是肝纤维化发生、进展乃至肝硬化形成中发挥核心作用的细胞因子,是激活肝星状细胞(HSC)并促进其表达ECM的关键因素^[2].丹酚酸B盐(salvianolic acid B, SA-B)是自唇形科植物丹参的干燥根和根茎中提取的有效成分.国内外的研究发现,SA-B有显著的抗大鼠肝纤维化作用,本研究旨在探讨观察SA-B对实验性肝纤维化大鼠肝组织TGF-β1、MMP-2和TIMP-2表达的影响,以探讨其抗肝纤维化的可能机制,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠30只,体质量120-140 g,由中国科学院上海实验动物中心提供. DMN购自Sigma公司,免疫组化一抗、二抗试剂购自Santa Cruz公司,免疫组化DAB显色试剂盒购自福建迈新公司. SA-B购自中国药品生物制品检定所,应用时用蒸馏水配制成浓度为1.25 g/L的溶液。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和造模: ♂SD大鼠30只随机分

为3组: 正常对照组10只,肝纤维化模型组10只,SA-B治疗组10只. 正常对照组ip生理盐水,剂量2 mL/kg,模型组ip 5mL/L DMN建立肝纤维化模型,1次/d,每周连续3 d,共4 wk. 模型组和SA-B治疗组造模4 wk结束后分别以蒸馏水和SA-B溶液按照10 mL/kg进行ig, 1次/d,每周连续3 d,共4 wk. 第8周末处死各组大鼠。

1.2.2 免疫组织化学检查: 取出新鲜肝组织用40 g/L甲醛固定12 h,之后脱水透明石蜡包埋. 采用热修复抗原SABC染色程序,切片浸入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液,微波炉加热沸腾15 min热修复,冷却后0.01 mol/L PBS洗涤2次,滴加二抗及血清封闭液,室温20 min,滴加稀释一抗,4℃冰箱保存过夜,滴加SABC试剂, DAB显色,蒸馏水清洗,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,显微镜观察. 每次染色时用试剂公司提供的TGF-β1、MMP-2和TIMP-2阳性片作阳性对照, PBS代替第一抗体作为阴性对照. TGF-β1、MMP-2和TIMP-2免疫组化结果均使用美国IPP5.0专业图像分析软件测定平均光密度值,用背景的光密度值减去阳性部位的光密度值即为阳性部位的吸光度值。

1.2.3 肝脏组织病理检查: 以40 g/L甲醛溶液固定,常规经HE染色和Masson三色染色,普通光学显微镜下观察. 肝组织病理学检查,肝组织HE染色,按2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订《病毒性肝炎防治方案》中慢性肝炎分期标准,进行纤维化程度(S)分级,判定肝纤维化程度^[3]。

1.2.4 血清学检测 采用全自动生化分析仪检测ALT、AST和Alb水平,放射免疫测定血清HA和LN的水平。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件分析,计数资料用mean±SD表示. 多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

肝纤维化模型组大鼠毛色暗淡、精神萎靡,进食进水减少,易受惊,体质量增长缓慢. 处死后取肝组织可见模型组肝脏表面粗糙有结节,颜色灰暗,用手触摸感觉发硬,治疗组大鼠毛色较好,食欲尚可,肝组织损害较模型组轻,肝脏质地软,表面较光滑。

2.1 肝功能检测结果 与正常对照组比较,肝纤维化模型组血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸

表 1 各实验组大鼠血清学检测结果(mean $\pm$ SD, $n = 10$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	Alb(g/L)	HA(mg/L)	LN(mg/L)
对照组	31.6 $\pm$ 8.5	29.9 $\pm$ 10.7	32.9 $\pm$ 3.3	108.3 $\pm$ 22.7	82.0 $\pm$ 11.8
模型组	190.4 $\pm$ 27.4 ^b	178.2 $\pm$ 15.9 ^b	31.7 $\pm$ 2.3	433.3 $\pm$ 86.1 ^b	224.7 $\pm$ 29.2 ^b
治疗组	87.0 $\pm$ 28.7 ^{bd}	85.6 $\pm$ 25.3 ^{bd}	33.5 $\pm$ 2.9	179.7 $\pm$ 32.8 ^{bd}	135.6 $\pm$ 21.1 ^{bd}

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

表 2 各实验组大鼠肝脏病理分级 ($n = 10$)

分组	肝纤维化分级				
	0	I	II	III	IV
对照组	10	0	0	0	0
模型组	0	0	0	3	7
治疗组 ^b	0	7	2	1	0

^b $P < 0.05$ vs 模型组.

转氨酶(AST)明显升高, 与模型组比较, 经SA-B治疗后, 血清ALT和AST明显下降.

2.2 血清透明质酸(HA)和层黏蛋白(LN)的变化与正常组比较, 模型组血清HA和LN的水平明显升高($P < 0.01$), 与模型组比较, 经SA-B治疗后, 血清HA和LN水平明显下降($P < 0.01$, 表1).

2.3 肝脏组织病理学检查 显微镜下模型组可见灶性坏死, 伴炎性细胞浸润, 小叶结构紊乱, 由汇管区和中央静脉伸出粗大胶原纤维条索分割、包绕肝小叶, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞浊肿明显. 与模型组相比, 治疗组肝细胞坏死、纤维组织增生减少, 肝小叶结构破坏减轻, 纤维条索疏松变窄, 肝细胞水肿好转, 肝内炎症细胞浸润减少. 各实验组大鼠肝脏病理纤维化分级情况见表2.

2.4 肝脏组织免疫组织化学检查 与对照组比较, 模型组MMP-2、TIMP-2和TGF- β 1免疫组化表达均明显增强, 与模型组比较, 治疗组TIMP-2、TGF- β 1免疫组化表达显著减轻, 有显著性差异($P < 0.01$), 治疗前后MMP-2表达无显著变化(表3).

2.5 肝组织TGF- β 1表达与病理肝纤维化分级、MMP-2和TIMP-2表达的关系 用等级相关分析, 显示大鼠肝组织TGF- β 1平均光密度与病理分级呈正相关($r = 0.697$, $P < 0.01$), 大鼠肝组织TGF- β 1平均光密度与TIMP-2平均光密度呈正相关($r = 0.699$, $P < 0.01$), 大鼠肝组织TGF- β 1与MMP-2平均光密度呈正相关($r = 0.399$, $P < 0.05$).

3 讨论

TGF- β 1是目前研究最深入的与肝脏疾病密切相

■相关报道

目前国内外有关肝纤维化与TGF- β 1、MMPs、TIMPs表达关系的报道较多, 但肝纤维化是一个复杂的过程, 如能进行动态观察, 研究将更真实可靠.

关的细胞因子, 是调控肝纤维化发生发展的核心物质^[4]. HSC活化后产生多种细胞因子, 其中TGF- β 1是促肝纤维化主要的细胞因子之一, 该物质主要由活化的HSC分泌并激活, 而TGF- β 1又可促进、维持HSC的活化. 研究发现, 在MMPs的活化过程中, TGF- β 1发挥重要调节作用. TGF- β 1通过调节基质金属酶的产生和活性来干扰细胞外基质的代谢^[5]. TGF- β 1能在转录水平上促进 α 2巨球蛋白表达, 而金属蛋白酶与后者结合后功能即受到抑制, TGF- β 1还能增加蛋白酶抑制剂的表达, 如纤维蛋白溶解酶原抑制物-1、组织特异性金属蛋白酶抑制物等^[6], 从而拮抗细胞外基质水解酶的作用, 引起细胞外基质分解减少和沉积增加, 加速肝纤维化的发展. 本研究结果显示TGF- β 1在正常对照组表达见于汇管区、肝细胞、肝窦内皮细胞, 着色较浅, 范围窄, 而在肝纤维化模型组主要表达见于纤维间隔内、HSC细胞、肝细胞、肝窦内皮细胞, 呈棕黄色颗粒, 范围广. 本研究TGF- β 1抗原免疫组化染色半定量分析结果显示: 平均光密度值与对照组之间有显著差异($P < 0.01$), 说明TGF- β 1是促进胶原纤维合成因子之一, 是肝纤维化发生发展微观调节的重要细胞因子. 通过消除纤维化过程中病变组织产生过多的TGF- β 1来预防或阻断纤维化的发展已成为纤维化防治研究的热点^[7], 国内王海南 *et al*^[8]报道认为SA-B能明显抑制HSC的增殖, 既能减少TGF- β 1分泌的总量, 又能减少活性型TGF- β 1的含量, 并可不同程度地抑制Smad2/3蛋白的表达, 抑制Smad2蛋白在细胞内的磷酸化与核转位, 从而拮抗TGF- β 1, 我们的体内实验研究结果显示, 经SA-B治疗后, 肝组织TGF- β 1的表达有显著降低, 说明可能是其发挥抗肝纤维化作用的机制之一.

正常情况下ECM生成与降解处于动态平衡, ECM合成与降解的失衡是引起肝内ECM积聚并导致肝纤维化的重要机制. 目前认为后者是由于基质金属蛋白酶(MMPs)表达下调或由于TIMPs的表达增加, 抑制了MMPs的活性, 使

■同行评价

本文具有一定的新颖性, 结构完整, 立题思路清晰, 采用的研究方法可靠, 具有较高的理论水平.

表 3 各实验组大鼠免疫组化检测结果(光密度值, $n=10$)

分组	MMP-2	TIMP-2	TGF- β 1
对照组	8.94 $\pm$ 0.89	8.20 $\pm$ 1.14	8.62 $\pm$ 1.07
模型组	12.40 $\pm$ 1.95 ^b	21.88 $\pm$ 3.83 ^b	18.53 $\pm$ 2.54 ^b
治疗组 ^b	12.58 $\pm$ 2.97 ^b	14.69 $\pm$ 4.51 ^{bd}	12.78 $\pm$ 2.65 ^{bd}

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

胶原降解受到抑制^[9], 肝细胞与多种间质细胞均能不同程度合成MMPs与TIMPs, 并通过复杂的调节机制, 在维持正常肝脏纤维组织中ECM的合成与降解的动态平衡中起关键作用. 肝纤维化时, MMP-2为ECM降解过程中起关键作用的MMPs之一, 在大鼠肝纤维化模型中MMP-2的表达随肝纤维化发展逐渐增加, 尤其进展期增加更明显^[10], 而TIMP-2是一种21 kDa的非糖基化蛋白, 与MMP-2亲和性较强, 抑制其活性, 他还抑制其他所有激活MMPs的蛋白水解活性. TIMP-2通过对MMP-2等金属蛋白酶活性的抑制促进ECM的沉积, 因此TIMP-2的表达程度反映了对MMPs抑制的程度, 也反映了肝纤维化的严重程度^[11]. 我们的免疫组化研究表明MMP-2主要位于窦内皮细胞、血管内皮细胞及肝窦细胞, MMP-2免疫组化阳性表达肝纤维化组明显高于对照组, 说明MMP-2与肝纤维化关系密切. 本实验在蛋白质水平反映TIMP-2在肝纤维化大鼠中的表达情况, 免疫组化观察发现, 肝纤维化大鼠肝脏中肌成纤维细胞、成纤维细胞有TIMP-2蛋白的高表达, 阳性信号呈现为棕黄色颗粒状, 分布在肝细胞胞质中, 未见细胞核表达, 提示在肝纤维化中, 肌成纤维细胞和成纤维细胞是TIMP-2表达的主要细胞. 本实验结果表明, 肝纤维化时TIMP-2表达增强且与正常组比较有显著性差异, 说明TIMP-2表达增强, 抑制了胶原酶的活性, TIMP-2通过对MMP-2、MMP-9等金属蛋白酶活性的抑制促进ECM的沉积.

本实验发现经SA-B干预后, 与模型组相比, 血清学研究结果显示: 肝功能指标有明显的改善, 病理组织学改变显示肝纤维化程度明显减轻. 经SA-B治疗后, 大鼠肝组织TIMP-2的表达较肝纤维化模型组明显降低, 有显著性意义($P<0.01$), 但治疗组MMP-2表达与肝纤维化模型组比较差异无显著性意义($P>0.05$), 表明治疗实验性肝纤维化大鼠可能不是通过调节MMP-2表达来实现的, 而是下调TIMP-2的表达, 在一定程度上解除对MMPs的抑制作用, 有助于ECM

的降解. 我们通过实验证明SA-B可能通过下调TGF- β 1表达抑制胶原的合成, 同时下调TIMP-2表达而使胶原分解加强, 从而减轻肝纤维化的程度. 而TGF- β 1本身也具有调控MMPs和TIMPs的功能, 其调控的机制非常复杂, 可以通过不同的下游事件来完成对MMPs和TIMPs家族成员的基因表达调控作用, 这些下游事件主要包括Smad通路、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路以及刺激激活蛋白-1转录因子的生成等. 我们的研究显示TGF- β 1与TIMP-2存在显著正相关, MMPs/TIMPs成员受TGF- β 1调控的具体机制, 以及各条信号通路之间的调控关系, 尚有待进一步的探讨. 同时, 寻找一种调节ECM降解酶系的药物, 干预细胞外某些细胞因子的表达, 可能会在防治肝纤维化的进展中起重要作用. 本研究表明, 经丹酚酸B治疗后的肝纤维化大鼠血清中HA和LN含量明显低于模型组($P<0.01$), 同时下调纤维化大鼠TGF- β 1和TIMP-2的水平, 从而减少ECM积聚, 对肝纤维化的形成具有明显抑制作用.

4 参考文献

- Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 877-880
- Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, Seth P, Broor S. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 393-403
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1294-1300
- Sato M, Shegogue D, Gore EA, Smith EA, McDermott PJ, Trojanowska M. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 118:

- 704-711
- 6 Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF- β 1 induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999; 18: 1345-1356
- 7 陈永平, 潘陈为, 王晓东, 巩跃文, 冀宏. 转化生长因子 β 1与乙型肝炎病毒核心抗原融合基因的表达和鉴定. *中华传染病杂志* 2005; 23: 328-330
- 8 王海南, 胡义扬, 洪嘉禾, 刘平, 朱大元. 丹酚酸B盐对肝星状细胞增殖和TGF β 1信号转导的影响. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 382-384
- 9 Zhang LJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Yu JP, Wang XZ. Effect of interleukin-10 and platelet-derived growth factor on expressions of matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rat fibrotic liver and cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2574-2579
- 10 Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24: 492-501
- 11 Di Sario A, Bendia E, Macarri G, Candelaresi C, Taffetani S, Marziani M, Omenetti A, De Minicis S, Trozzi L, Benedetti A. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 744-751

编辑 李军亮 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].

哈萨克族食管癌与CYP2E1基因多态性及烟酒嗜好的关系

陈波, 马彦清, 杨磊, 李锋, 王秀梅, 廖佩花, 何玲, 秦江梅

■背景资料

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 哈萨克族是我国食管癌的高发民族。哈萨克族由于其游牧生活, 养成了许多特殊的生活习惯, 这些饮食和行为习惯使他们过多摄入一些前致癌物。环境中的前致癌物进入人体以后, 经过 I 相代谢酶的活化或转化后才具有致癌作用, CYP2E1 是重要的 I 相代谢酶, 为此本文将相关环境危险因素和其代谢相关基因结合起来进行了此研究。

陈波, 杨磊, 李锋, 王秀梅, 廖佩花, 何玲, 秦江梅, 新疆地方病与民族高发疾病省部共建重点实验室 石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
马彦清, 新疆伊犁州友谊医院胸外科 新疆伊宁市 835000
国家自然科学基金资助项目, No. 30660161
国家重点基础研究发展规划资助项目(973计划), No. 2005CCA 03700
石河子大学博士基金资助项目, No. RCZX2004-PB17
2006年教育部科学技术研究重点资助项目, No. 206167
通讯作者: 秦江梅, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院预防医学系. qinjiangmei@yahoo.com.cn
电话: 0993-2057153 传真: 0993-2057153
收稿日期: 2007-08-12 修回日期: 2007-12-17

Relationship of CYP2E1 gene polymorphism and tobacco and alcohol consumption with susceptibility to esophageal cancer in Kazakh

Bo Chen, Yan-Qing Ma, Lei Yang, Feng Li, Xiu-Mei Wang, Pei-Hua Liao, Ling He, Jiang-Mei Qin

Bo Chen, Lei Yang, Feng Li, Xiu-Mei Wang, Pei-Hua Liao, Ling He, Yan-Qing Ma, Jiang-Mei Qin, Key Laboratory of the Ministry of Education, Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi Medical University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous District, China
Yan-Qing Ma, Department of Thoracic Surgery, Friendship Hospital of Xinjiang Yili Canton, Yining 835000, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660161; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2005CCA03700; the Doctor's Fund of Shihezi University, No. RCZX2004-PB17; and the Scientific and Technology Research Key Program of Ministry in Education, No. 206167
Correspondence to: Dr. Jiang-Mei Qin, Department of Preventive Medicine, Shihezi Medical University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous District, China. qinjiangmei@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-12 Revised: 2007-12-17

Abstract

AIM: To study the interaction between polymorphism in CYP2E1 genotype and tobacco and alcohol consumption and risk of developing esophageal cancer (EC) in Kazakh.

METHODS: A 1 : 2 matched case-control study was conducted with 120 cases of EC in Kazakh and 240 population-based controls. CYP2E1 genotypes were identified by PCR amplification

followed by digestion with *Rsa* I.

RESULTS: The genotype frequencies of *Rsa* I-digested CYP2E1 in the EC group differed from those in the control group (78.3% vs 53.3%, 19.2% vs 37.5%, 2.5% vs 9.2%, $\chi^2 = 21.794$, $P < 0.05$). Individuals with the C1/C1 genotype had a 3.07-fold (95% CI: 1.87 - 5.03) increased risk of developing EC compared with those who had the C1/C2 or C2/C2 genotype. Interaction analysis showed there was an interaction between CYP4502E1 gene polymorphism and smoking and alcohol consumption, and the interaction was higher than the sum of the two factors alone.

CONCLUSION: The gene-environment interaction between the *Rsa* I-digested CYP2E1 polymorphism and smoking and alcohol consumption may increase susceptibility to EC in Kazakh.

Key Words: Cytochrome P4502E1; Gene polymorphism; Esophageal cancer; Kazakh

Chen B, Ma YQ, Yang L, Li F, Wang XM, Liao PH, He L, Qin JM. Relationship of CYP2E1 gene polymorphism and tobacco and alcohol consumption with susceptibility to esophageal cancer in Kazakh. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3852-3855

摘要

目的: 探讨细胞色素P4502E1(CYP2E1)基因多态性, 烟酒嗜好与哈萨克族食管癌易感性的关系。

方法: 采用1 : 2配比的病例对照研究方法, 调查哈萨克族食管癌患者120例和非食管癌患者240例, 采用聚合酶链-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)方法检测CYP2E1 *Rsa* I 位点的基因型。

结果: 病例组中CYP2E1 *Rsa* I 位点C1/C1、C1/C2、C2/C2基因型频率与对照组比较 (78.3% vs 53.3%, 19.2% vs 37.5%, 2.5% vs 9.2%, $\chi^2 = 21.794$, $P < 0.01$) 差异有统计学意义。

义;携带C1/C1基因型发生食管癌的危险性是携带C1/C2或C2/C2基因型的3.07倍(95% CI: 1.87-5.03);交互作用提示CYP2E1基因多态与吸烟、饮酒均存在交互作用;其危险性远高于各单独作用之和。

结论: CYP2E1 *Rsa* I 位点基因多态性与大量吸烟、饮酒之间的基因-环境交互作用可增强哈萨克族人群患食管癌的风险。

关键词: 细胞色素P4502E1; 基因多态性; 食管癌; 哈萨克族

陈波, 马彦清, 杨磊, 李锋, 王秀梅, 廖佩花, 何玲, 秦江梅. 哈萨克族食管癌与CYP2E1基因多态性及烟酒嗜好的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3852-3855
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3852.asp>

0 引言

目前研究表明,食管癌的发生、发展与环境因素密切相关,大多数环境致癌物在体内都需要代谢激活后才有致癌性^[1],烟草中的许多前致癌物同样需要经过体内 I 相和 II 相代谢酶的活化和解毒^[2]. CYP2E1 基因是重要的 I 相代谢酶之一,近年来的研究发现,位于基因5'-侧远端转录调节区域的*Rsa* I 位点的多态性与食管癌的遗传易感性有关^[3]. 流行病学研究发现,不同国家食管癌的环境危险因素有差别,西方国家主要以吸烟和饮酒为主,发展中国家食管癌高发区病因倾向于不良饮食习惯和各种营养素的缺乏^[4]. 哈萨克族是食管癌高发民族,过去的几十年新疆哈萨克族食管癌死亡率未明显下降. 说明原本存在的危险因素仍然起作用. 我们前期研究表明新疆哈萨克族食管癌高发与饮水、不良饮食、少食蔬菜水果密切相关^[5-6]. 我们的研究也发现哈萨克族居民近年来吸烟饮酒率有上升趋势,哈萨克族15岁及以上女性吸烟率高达15%. 为进一步探讨新疆哈萨克族食管癌高发原因,我们采用1:2病例对照研究,并利用分子生物学技术对CYP2E1基因进行检测,综合探讨CYP2E1基因多态、吸烟饮酒与哈萨克族食管癌的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-03/2007-05间在新疆北部哈萨克族聚集地区的六所医院共收集哈萨克族新发食管癌患者120例,年龄38.3-79.0(平均年龄59.0±10.0)岁,男81例,女39例,按1:2匹配对照,匹配条件为同

民族、同性别、年龄相差不超过5岁且居住同一地区,一个对照来源于同一所医院的非肿瘤、非消化道疾病患者,另一对照来源于同一乡镇或市区的正常人群,共计240例,年龄35.2-80.4(平均年龄58.4±10.1)岁,男162例,女78例,病例组与对照组年龄差异无统计学意义($t = 0.586$, $P = 0.558$).

1.2 方法 采用调查表调查,内容包括:一般情况、吸烟及饮酒史、饮食习惯和家族史等危险因素. 由经过专门培训的医生和本课题研究生向研究对象详细询问后填写. 最后由课题指导人员审核调查表质量. 采集研究对象外周静脉血3 mL, EDTA-K2抗凝,分装, -70℃低温保存. 用上海生物工程基因组小量抽提试剂盒 II 抽取基因组DNA,提取步骤按操作说明书进行,提取的DNA -70℃冰箱低温保存. 采用PCR-RFLP技术检测*Rsa* I 位点多态性. 引物由上海生工公司合成,所用引物为: 5'-CCAGTTCGAGTCTACATTGTCA-3'和5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'. Taq DNA合成酶购自上海宝生物公司, PCR反应总体积25 μL, 基因组DNA溶液2 μL, 含引物(20 μmol/L)各0.5 μL、2.5 mmol/L的4×dNTP 2 μL、5000 kU/L Taq酶0.2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL. PCR扩增条件为: 95℃预变性8 min, 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共35个循环,最后72℃延伸8 min. PCR产物用*Rsa* I 内切酶在37℃消化4 h,用20 g/L琼脂糖凝胶电泳、确定CYP2E1基因型. 基因型分为野生型纯合型(C1/C1)、杂合型(C1/C2)、变异纯合型(C2/C2).

统计学处理 建立数据库,采用1:2配比的病例对照研究的分析方法,计算 χ^2 , P 值, OR 值及其95%可信区间,并分组分析CYP2E1基因多态性、烟酒嗜好及其交互作用与哈萨克族食管癌易感性之间的关系。

2 结果

2.1 遗传平衡检验 为检验人群基因型频率是否达到Hardy-Weinberg遗传平衡,将CYP2E1基因型频率观察值与期望值进行比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.921$, $P > 0.05$),说明CYP2E1基因型频率均已达到遗传平衡,具有人群代表性。

2.2 CYP2E1基因多态性与哈萨克族食管癌易感性的关系 在病例组中, CYP2E1 *Rsa* I C1/C1基因型占78.3%、C1/C2基因型占19.2%、C2/C2基因型占2.5%,在对照组的分布频率分别为53.3%、

■相关报道

Tan *et al*对林县150例食管癌患者和150正常人做了病例-对照研究,结果显示: CYP2E1 C1/C1野生型等位基因频率在两组中分别为71.3%和44.0%,差异有显著性. 王伟 *et al*在南京的研究结果显示: CYP2E1 C1/C1是食管癌的危险因素,其 OR 值为1.547. 而Gao *et al*对江苏淮安140例病例和229例对照人群的研究结果表明: CYP2E1 C1/C1野生型等位基因频率在两组中分别为59.3%和61.1%,差异无显著性. 说明CYP2E1基因*Rsa* I 酶切多态性存在地域差异。

■创新盘点

本文是首次将传统的流行病学方法与现代分子生物学方法有机结合,从分子流行病学的角度出发,从基因-环境的交互作用着手系统地探讨新疆哈萨克族居民食管癌危险因素及细胞色素酶P450(CYP2E1)基因型分布与食管癌发病的关系,得出对新疆哈萨克族食管癌预防及干预策略有价值的结果和结论。

表 1 CYP2E1基因型分布与哈族食管癌关系

病例组CYP2E1 基因型	对照组CYP2E1基因型			合计
	++	+-	--	
+	25	49	20	94
-	7	15	4	26
合计	32	64	24	120

$$\chi^2 = 19.76, P < 0.05$$

37.5%、9.2%。各基因型频率分布在两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 21.794, P = 0.000$), 病例组高于对照组; 等位基因C1和C2的频率在病例组和对照组差异也有统计学意义($\chi^2 = 22.903, P = 0.000$), 等位基因C1携带者发生食管癌的危险性为C2的2.818倍(95% CI: 1.821-4.360)。

本研究将携带CYP2E1 C1/C1为+, 携带CYP2E1 C1/C2和CYP2E1 C2/C2为-, 经统计学检验, $\chi^2 = 19.78, P < 0.05$, 差异有统计学意义, CYP2E1 C1/C1基因型与哈萨克族食管癌的发生有关, 其OR值为3.07(95% CI: 1.87-5.03)(表1)。

2.3 吸烟、饮酒与CYP2E1基因多态性的交互作用 将吸烟量与CYP2E1基因多态性做交互作用分析, 与不吸烟、携带C1/C2+C2/C2基因型者相比, 不吸烟、携带C1/C1基因型者发生食管癌的危险性为2.429(95% CI: 1.181-4.993); 吸烟>20支/d、携带C1/C2+C2/C2基因型者发生食管癌的危险性为6.80(95% CI: 1.133-40.824); 吸烟>20支/d、携带C1/C1基因型者发生食管癌的危险性为15.30(95% CI: 2.978-78.619), 其危险性大于两

个因素单独暴露时的情况, 符合相加模型, 大量吸烟和基因突变存在交互作用。同样, 将饮酒量与CYP2E1基因多态性做交互作用分析, 与不饮酒、携带C1/C2+C2/C2基因型者相比, 不饮酒、携带C1/C1基因型者发生食管癌的危险性为2.671(95% CI: 1.296-5.502); 饮酒>3 kg/mo、携带C1/C2或C2/C2基因型者发生食管癌的危险性为3.646(95% CI: 1.020-13.036); 饮酒>3 kg/mo、携带C1/C1基因型者发生食管癌的危险性为12.25(95% CI: 4.641-32.334); 说明饮酒和基因突变存在交互作用(表2)。

3 讨论

细胞色素P450是一类与多种前致癌物代谢活化密切相关的I相生物代谢酶, 其编码的二甲基亚硝胺D-脱甲基酶是体内代谢激活烟草中亚硝胺、苯胺等的主要酶类, 并且受乙醇的强烈诱导^[7]。CYP2E1是代谢亚硝胺类化合物的重要代谢酶, 主要通过去烷基、去硝基等方式, 使之由前致癌物变成活化的终致癌物, 个体CYP2E1活性差异可能导致环境致癌物遗传易感性的差异^[8]。CYP2E1 *Rsa* I 位点于CYP2E1的转录调节区域, 其基因多态性会影响CYP2E1基因的表达^[9]。目前, 关于CYP2E1 *Rsa* I 位点基因多态性与食管癌易感性的关系已有一定的研究。Lucas *et al*^[10]的研究证实携带CYP2E1 *Rsa* I 突变等位基因的个体CYP2E1的基础活性较低, 同时用乙醇难以诱导出该基因型个体的CYP2E1酶活性, Lin *et al*^[11]和Tan *et al*^[12]对我国林县汉族食管癌的研究结果也提示CYP2E1变异基因型的表达

表 2 CYP2E1基因型与吸烟量、饮酒量交互作用分析

	CYP2E1	病例组	对照组	χ^2	P	OR(95% CI)
吸烟量						
不吸烟	C1/C2+C2/C2	15	51	-	-	1.0
不吸烟	C1/C1	35	49	5.966	0.015	2.429(1.181-4.993)
1-20支/d	C1/C2+C2/C2	7	59	3.491	0.062	0.403(0.153-1.067)
1-20支/d	C1/C1	50	77	5.386	0.020	2.208(1.122-4.344)
>20支/d	C1/C2+C2/C2	4	2	-	0.038	6.800(1.133-40.824)
>20支/d	C1/C1	9	2	-	0.000	15.30(2.978-78.619)
饮酒量						
不饮酒	C1/C2+C2/C2	12	70	-	-	1.0
不饮酒	C1/C1	38	83	7.405	0.007	2.671(1.296-5.502)
1-3 kg/mo	C1/C2+C2/C2	9	34	0.800	0.371	1.544(0.593-4.019)
1-3 kg/mo	C1/C1	35	35	22.112	0.000	5.833(2.698-12.612)
>3 kg/mo	C1/C2+C2/C2	5	8	4.336	0.037	3.646(1.020-13.036)
>3 kg/mo	C1/C1	21	10	30.688	0.000	12.25(4.641-32.334)

可能比野生型低, 即携带CYP2E1变异基因型的个体发生癌症的危险性相对较低。

本次研究发现: CYP2E1 *Rsa* I 位点的多态性是哈萨克族食管癌发生的危险因素, 等位基因C1携带者发生食管癌的危险性为C2的2.818倍(95% CI: 1.821-4.360); 携带C1/C1基因型发生食管癌的危险性是变异型个体的3.07倍。与上述研究结果一致。我们的研究还发现, 大量吸烟、饮酒是哈萨克族食管癌发生的危险因素, 既大量吸烟或饮酒又携带C1/C1基因型的个体发生食管癌的危险性显著增加, CYP2E1 C1/C1基因型与大量吸烟、饮酒之间存在交互作用。

随着社会的发展, 新疆哈萨克族的生活习性也发生着变化, 但仍然保留了许多民族习惯^[13], 如游牧, 喝热烫的奶茶, 以牛羊肉为主食, 少食蔬菜水果等。更值得重视的是, 在本研究中发现, 该民族正常人群的饮酒率高达36.7%, 高于2002年全国平均饮酒率的21.0%^[14]; 女性吸烟率已达到32.0%, 远远高于汉族女性的3.08%^[15]。哈萨克族特殊的生活、行为习惯与遗传易感性共同作用于该民族人群, 导致了其食管癌发病率的居高不下。因此, 提倡戒烟限酒对哈萨克族食管癌的防治具有重大意义。

4 参考文献

- 1 Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 3-28
- 2 Rannug A, Alexandrie AK, Persson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: regulation and toxicological significance. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 25-36
- 3 吴库生, 李克. 细胞色素P450 2E1基因多态性与食管癌易感性关系的Meta分析. *肿瘤基础与临床* 2006; 19: 13-16
- 4 沈月平, 项永兵, 高玉堂. 食管癌流行病学研究. *疾病控制杂志* 1998; 2: 52-55
- 5 王秀梅, 杰恩斯, 马彦清, 陈波, 郭小进, 阿力木太, 哈那提, 李锋, 杨磊, 秦江梅. 新疆哈萨克族食管癌危险因素病例对照研究. *中国公共卫生* 2007; 23: 737-738
- 6 王秀梅, 张卫群, 陈波, 何玲, 阿力木太, 哈那提, 李锋, 杨磊, 秦江梅. MTHFR基因多态性与哈萨克族食管癌易感性. *中国公共卫生* 2007; 23: 937-938
- 7 李靖涛, 朴云峰, 孟祥伟. CYP11E1基因多态性与酒精性脂肪肝. *临床肝胆病杂志* 2003; 19: 48-49
- 8 王雨, 姜义红, 孙文娟. 细胞色素P4502E1基因多态性与胃癌易感性. *中国公共卫生* 2005; 21: 664-665
- 9 王建国, 许飏. 代谢酶基因多态性与胃癌遗传易感性. *肿瘤* 2003; 23: 253-255
- 10 Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodenez P, Joannet I, Hispard E, Bardou LG, Menez JF. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 298-304
- 11 Lin DX, Tang YM, Peng Q, Lu SX, Ambrosone CB, Kadlubar FF. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 1013-1018
- 12 Tan W, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF, Lin DX. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 551-556
- 13 宋士敬, 宋君. 哈萨克族风情. *丝绸之路* 2006: 41-43
- 14 马冠生, 朱丹红, 胡小琪, 栾德春, 孔灵芝, 杨晓光. 中国居民饮酒行为现况. *营养学报* 2005; 27: 362-365
- 15 杨功焕, 马杰民, 刘娜, 周灵妮. 中国人群2002年吸烟和被动吸烟的现状调查. *中华流行病学杂志* 2005; 26: 77-83

■应用要点

当前对中晚期食管癌患者完全治愈难度大, 费用高, 挽救生命成功率比较低, 中晚期食管癌患者手术5年存活率仅10%左右。哈萨克族食管癌高危因素的寻找和遗传易感基因的确定是关键, 本研究采用严谨、科学的方法找出哈族居民食管癌高危因素的相关行为危险因素和遗传易感基因, 使得哈族食管癌预防和干预有的放矢。为今后采取相关的实验室检测手段发现高危个体, 采取健康教育措施来减少哈族人群的食管癌发病风险, 降低哈族人群食管癌的发生率和死亡率提出可靠的依据。

■同行评价

本文方法可靠, 数据可信, 针对性强, 具有较强的临床参考价值。

编辑 李军亮 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 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议 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。(总编辑: 马连生 2007-12-29)

中晚期胃癌术后序贯放化疗36例

袁响林, 付强, 胡国清, 陈元, 张莉红, 胡广原, 于世英

■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在全国大多数城市排在前列, 多数患者确诊时已属进展期(肿瘤侵犯超过黏膜下层), 单纯手术治疗效果差, 目前术后辅助放疗存在一定争议。术后放化疗联合应用是否优于术后单纯化疗尚无定论。

袁响林, 付强, 胡国清, 陈元, 张莉红, 胡广原, 于世英, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 于世英, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心. syu@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83662683 传真: 027-83662834

收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2007-11-30

Postoperative sequence chemoradiotherapy for advanced gastric cancer: an analysis of 36 cases

Xiang-Lin Yuan, Qiang Fu, Guo-Qing Hu, Yuan Chen, Li-Hong Zhang, Guang-Yuan Hu, Shi-Ying Yu

Xiang-Lin Yuan, Qiang Fu, Guo-Qing Hu, Yuan Chen, Li-Hong Zhang, Guang-Yuan Hu, Shi-Ying Yu, Oncology Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Shi-Ying Yu, Oncology Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. syu@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-08-23 Revised: 2007-11-30

Abstract

AIM: To investigate the effect of postoperative sequence chemoradiotherapy compared with postoperative chemotherapy alone on survival of patients with advanced gastric cancer, and to evaluate the toxic effect.

METHODS: A total of 68 patients were collected from our hospital from January 2003 to December 2005. Thirty-six patients received sequence chemoradiotherapy following radical resection, and 32 patients received chemotherapy alone following radical resection. The 1- and 3-yr survival rate were evaluated, as well as the hematologic and gastrointestinal toxic effects, and liver and kidney function.

RESULTS: The 1- and 3-yr survival rate of the sequence chemoradiotherapy group was 77% and 47%, respectively, as compared with 61% and 25% in the chemotherapy only group ($P = 0.041$). The median survival time was 40 mo compared with 24.5 mo in the control group

($P = 0.038$). Grade III-IV leukopenia occurred in 11.1% of the sequence chemoradiotherapy group compared with 6.3% in the control group. Grade III-IV nausea and vomiting occurred in 8.3% compared with 3.1% in the control group. No statistic significant correlation was found in toxic effect.

CONCLUSION: Postoperative sequence chemoradiotherapy of gastric cancer improves the 1- and 3-yr survival rate significantly, and prolongs the median survival time compared with postoperative chemotherapy alone. The toxic effects are tolerable.

Key Words: Gastric cancer; Sequence chemoradiotherapy; OLF regimen; Survival rate

Yuan XL, Fu Q, Hu GQ, Chen Y, Zhang LH, Hu GY, Yu SY. Postoperative sequence chemoradiotherapy for advanced gastric cancer: an analysis of 36 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3856-3859

摘要

目的: 评价术后序贯放化疗对中晚期胃癌的生存影响和不良反应。

方法: 收集我院2003-01/2005-12胃癌根治术后行序贯放化疗患者36例及对照单纯化疗患者32例, 分析两组的1年和3年生存率, 同时评价放化疗期间出现的血液学、肝肾功能及胃肠道等不良反应。

结果: 术后序贯放化疗组和单纯化疗组1年生存率分别为77%和61%, 3年生存率分别为47%和25% ($P = 0.041$), 中位生存时间分别为40.0 mo和24.5 mo ($P = 0.038$), 治疗期间两组出现III-IV级白细胞减少分别为11.1%和6.3%, III-IV级恶心呕吐分别为8.3%和3.1%, 但差异无统计学意义。

结论: 胃癌患者术后序贯放化疗较单纯化疗可提高1年和3年生存率, 延长中位生存时间, 不良反应可耐受。

关键词: 中晚期胃癌; 序贯放化疗; OLF方案; 生存率

袁响林, 付强, 胡国清, 陈元, 张莉红, 胡广原, 于世英. 中晚期胃癌术后序贯放化疗36例. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3856-3859
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3856.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 手术完全切除病灶是唯一可能根治肿瘤的方法, 然而, 仍有许多在行根治性手术且切缘阴性的胃癌患者还是出现肿瘤复发, 只能进行姑息性治疗, 这反映出大多数患者确诊时已属中晚期(III-IV期), 单纯手术治疗效果差^[1]. 同时研究表明中晚期胃癌术后复发率高, 局部复发率60%-70%, 5年生存率仅10%-20%^[2]. 因此中晚期胃癌术后治疗方式的选择会对患者生存产生直接影响. 本文通过收集同济医院2003-01/2005-12根治术后胃癌患者68例, 采用前瞻性非随机对照方法, 分为术后序贯放化疗和单纯化疗两组, 来探讨术后序贯放化疗的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 入组条件(1)经手术后病理确诊的中晚期胃腺癌患者, (2)年龄18-75岁, 体能状况KPS大于70分, 本研究中术后序贯放化疗组年龄为36-75岁, 术后单纯化疗组年龄为29-74岁, (3)术后病理证实胃周淋巴结转移和/或肿瘤浸润至胃壁深肌层, 伴或不伴手术切缘阳性, (4)无重要器官功能严重损害, 血常规, 肝肾功能正常, (5)临床检查无远处转移病灶, (6)预期生存时间大于6 mo. 术后序贯放化疗组36例, 术后单纯化疗组(对照组)32例, 两组患者临床资料差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

1.2 方法 序贯放化疗组治疗方案, 放疗安排在化疗2-3周期后进行. 术后化疗方案: OLF方案: 草酸铂130 mg/m², iv drip 2 h d1; CF 200 mg iv drip d1-5; 5-FU 425 mg/m² iv drip d1-5, 每3周重复, 共6个周期. 术后放疗方案: CT模拟定位下制定放疗计划, 15MV能X线, 常规外照射总量: 45 Gy/25次, 分次量1.8 Gy, 5 wk完成, 先行前后野照射剂量至DT 36 Gy/20次后避开脊髓, 行左右侧野照射至总量. 若有残端阳性患者, 局部小野追加至50.4 Gy/28次. 放疗照射范围包括瘤床, 手术残端或吻合口, 区域淋巴结(包括胃周、腹腔、主动脉旁、脾、肝十二指肠、肝门和胰十二指肠淋巴结. 胃食管结合部癌还需包括贲门和食管周围淋巴结, 但不包括胰十二指肠淋巴结). 放疗期间注意脊髓、心脏、肝脏、肾脏

等器官保护. 按WHO标准进行毒性评定.

统计学处理 应用SPSS12.0进行统计分析, 百分比统计不良反应. 生存期为患者开始治疗至死亡或最后失访的时间. 总体生存比较用kaplan-Meier法分析并绘制生存曲线. 中位生存期中位数计算.

2 结果

2.1 随访和生存分析 所有患者随访至2006-12, 随访时间14-48 mo, 中位随访时间27 mo, 其中失访4例, 随访率95.5%. 术后序贯放化疗组和单纯化疗组1年、3年生存率和中位生存时间均有显著性差异(77% vs 47%; 61% vs 25%, $P=0.041$; 40.0 mo vs 24.5 mo, $P=0.038$; 表2, 图1).

2.2 不良反应 参照WHO不良反应的分级标准, 序贯放化疗组III-IV级白细胞下降率和胃肠道反应发生率均高于单纯化疗组, 但差异无统计学意义(11.1% vs 6.3%, 13.9% vs 6.2%, $P>0.05$)(表3). 其中放化疗组中有2例因不能耐受胃肠道反应, 未能完成规定放疗.

2.3 死亡原因 放化疗组死亡12例, 其中局部区域复发3例, 远处转移8例, 其他疾病1例. 单纯化疗组死亡19例, 其中局部区域复发11例, 远处转移8例.

3 讨论

分析我国近20年胃癌死亡情况, 90年代男性增长11.0%, 女性增长6.3%, 胃癌死亡占恶性肿瘤死亡的23.2%, 仍排列在第一位^[3]. 胃癌根治术后失败的原因主要为局部复发和远处转移. 尤其当肿瘤穿透胃浆膜层和淋巴结转移将影响治疗效果^[4]. 胃本身是放疗敏感器官, 但由于周围肝脏、肾脏、胰腺和肠道等放疗危及器官的存在, 限制了胃癌术后放疗的发展. 近年来随着CT模拟定位及数字重建技术在临床上的应用, 放射物理学及放射生物学的不断发展与成熟, 尤其是近几年来三维适形和调强放射治疗技术的广泛应用, 放射治疗对胃癌的价值有了新的评价. 为提高中晚期胃癌术后放射治疗的疗效, 许多学者在放射治疗的同时联合化疗, 取得了较好的疗效, 提高了治疗后的生存率. 本研究中放化疗组1年生存率和3年生存率均明显优于单纯化疗组, 且中位生存时间也明显提高(40.0 mo vs 24.5 mo), 差异具有统计学意义($P<0.05$). SWOG9008 /INT0116试验针对胃癌术后的同步放化疗, 在降低局部复发和区域转移的基础上,

■创新盘点

本文将术后辅助治疗由同步放化疗调整为序贯放化疗, 以达到减少放化疗急性毒性反应的目的; 同时化疗方案选用草酸铂联合氟尿嘧啶来提高传统化疗方案氟尿嘧啶的治疗效果, 从而探讨胃癌术后辅助放疗的价值, 以及放化疗联合应用的意义, 为进展期胃癌术后规范治疗提供参考.

■应用要点

本研究显示中晚期胃癌术后序贯放化疗的1年、3年生存率优于术后单纯化疗, 在具备相应放疗条件的单位可进一步开展.

■名词解释

1 调强放射治疗: 调强放射治疗与以往放射治疗技术不同, 他通过调节各个方向照射野的野内射线的强度产生非均匀照射野, 达到肿瘤的高剂量三维适形分布和危及器官的低剂量分布, 从而提高肿瘤的照射剂量, 尽可能地减少危及器官和正常组织的受量, 最终提高肿瘤局部的控制率, 改善肿瘤患者的生存质量。

2 危及器官: 是指放疗计划设计时受累及的对放射线特别敏感的重要器官和组织。在确定放疗计划区时要考虑这些器官可能受到的损伤。例如本文中胃癌放疗的危及器官包括肝脏、肾脏、脊髓等。

表 1 两组一般资料比较(n)

	n	男/女	平均年龄(岁)	病变部位		术后分期			
				近	远	Ⅱ期	Ⅲ期	Ⅳ期	残留
序贯放化疗	36	29/7	54.3(36-75)	8	28	11	18	7	4
单纯化疗	32	26/6	53.6(29-74)	4	28	7	19	6	2

表 2 放化疗组和单纯化疗组的生存率比较

	n	生存率(%)		中位生存时间(mo)
		1年	3年	
序贯放化疗	36	77	61	40.0
单纯化疗	32	47	25	24.5

表 3 两组不良反应比较 n(%)

不良反应	放化疗组		单纯化疗组	
	Ⅲ	Ⅳ	Ⅲ	Ⅳ
白细胞减少	4(11.1)	0(0)	2(6.3)	0(0)
粒细胞减少	5(13.9)	0(0)	1(3.1)	1(3.1)
贫血	1(2.7)	0(0)	1(3.1)	0(0)
血小板减少	1(2.7)	0(0)	0(0)	0(0)
恶心呕吐	3(8.3)	0(0)	1(3.1)	0(0)
肝功能	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
肾功能	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

明显延长了总生存时间, 为胃癌的术后放化疗提供了理论基础. Klassen *et al*^[5]报道, 对于手术未能切除或切除后有残留病灶的胃癌患者, 采用放化疗的中位生存期明显好于单纯5-FU化疗组, 达8.5 mo, 5年生存率亦高于单纯化疗组. INT0116组间研究结果也支持术后联合放化疗. 在该项研究中, 603例胃癌或胃食管腺癌的患者根治性手术后被随机分为放化疗组和观察组, 和观察组相比, 放化疗组无复发生存率提高了44%, 并且总生存率提高28%^[6]. Kim *et al*^[7]报道了韩国544例胃癌D2术后辅助放化疗患者, 对比单纯手术446例患者, 5年生存率及无复发生存时间均明显延长. 因此本组结果与上述研究结果一致. 同时, 东方和西方的研究者在近来的研究中均证实术后同步放化疗在生存率上均较单纯手术有优势^[8-9]. 本研究报道1年生存率和3年生存率高于既往研究, 原因之一可能与使用新型化疗方案OLF方案有关, 胃癌的联合化疗以5-FU或顺铂(Cisplatin, DDP)作为基础已得到国际共识与公认, 第三代铂类药物草酸铂正越来越多的应用于胃癌的治疗. 草酸铂在体内与DNA结合

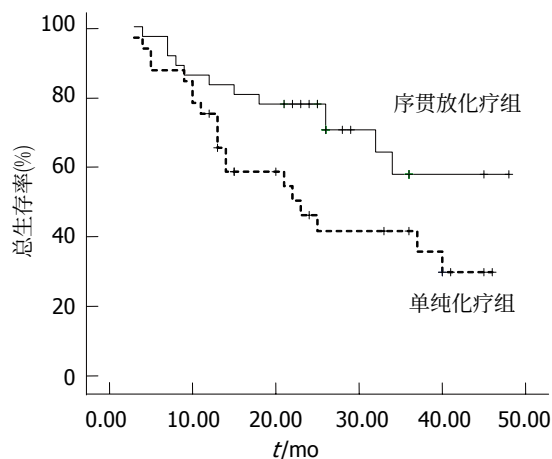


图 1 放化疗组与单纯化疗组生存率曲线比较.

的速率较顺铂快10倍以上, 结合牢固, 有更强的细胞毒作用. 同时, 毒副作用相对较轻, 胃肠道和肾脏毒性明显低于顺铂, 较易为晚期消化道肿瘤患者所接受. 大量Ⅱ期临床研究证实了新型药物如伊立替康、多西紫杉醇、卡培他滨、S1、草酸铂在中晚期胃癌中的作用^[10], 其中草酸铂的Ⅲ期临床研究正在进行中. 国内学者进行的含草酸铂化疗方案治疗晚期胃癌均显示出较好的疗效及耐受性^[11-13]. 其次, 近年来发现胃食管结合部的腺癌比例逐渐增高, 且早期易发生淋巴结转移和血道播散, 预后较差^[14], 本组研究患者肿瘤多位于胃远端(胃窦), 仅小部分位于胃食管结合部(贲门), 故预后相对较好. 另一方面, 由于同步放化疗的毒性反应较大, 因此本研究设计为序贯放化疗, 并使用肾毒性小的化疗药物方案(草酸铂和5-FU). 本组研究中密切观察了治疗期间的血象变化和胃肠道反应. 术后放化疗组的毒性除白细胞减少, 中性粒细胞减少, 胃肠道反应较高外, 与单纯化疗组相似, 患者基本能耐受治疗, 也未出现治疗相关的死亡. 尽管部分肝脏和肾脏受到照射, 肝肾功能未见异常, 随访1年以上未见胃肠道, 肝脏和肾脏的远期并发症出现. 但是应该指出的是序贯放疗应使用CT模拟定位及治疗计划系统, 通过计划系统严格限制照射区危及器官(脊髓, 肾脏, 肝脏等)的剂量, 这样才能保

证治疗的安全. Pemberton *et al*^[15]研究中也强调了治疗计划系统在胃癌放疗中的重要性. 虽然通过多野照射可降低左肾的照射剂量, 但同时增加了肝脏的照射剂量^[16], 因此, 常规两野照射仍然是主要的放疗方式.

由于本研究中观察病例数相对较少, 随访时间仍不够长, 肾脏等器官的远期毒性反应并未观察到, 最近Jansen *et al*^[17]报道, 胃癌放疗18 mo后左肾功能下降, 且与左肾受照射体积相关. 因此对研究组患者应进一步随访观察肾脏、肝脏等器官功能变化.

总之, 对于中晚期胃癌, 手术后局部区域的放疗与全身化疗做到有机的结合, 进行互补性治疗可以提高总生存率, 延长生存时间. 术后放疗和含草酸铂, 氟脲嘧啶的化疗序贯治疗耐受性尚可, 值得临床上进一步深入研究.

4 参考文献

- Meyer HJ, Jahne J, Pichlmayr R. Strategies in the surgical treatment of gastric carcinoma. *Ann Oncol* 1994; 5 Suppl 3: 33-36
- Henning GT, Schild SE, Stafford SL, Donohue JH, Burch PA, Haddock MG, Trastek VF, Gunderson LL. Results of irradiation or chemoirradiation following resection of gastric adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 589-598
- 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况及其发展趋势预测. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 4-9
- Maehara Y, Hasuda S, Koga T, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Postoperative outcome and sites of recurrence in patients following curative resection of gastric cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 353-357
- Klaassen DJ, MacIntyre JM, Catton GE, Engstrom PF, Moertel CG. Treatment of locally unresectable cancer of the stomach and pancreas: a randomized comparison of 5-fluorouracil alone with radiation plus concurrent and maintenance 5-fluorouracil--an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1985; 3: 373-378
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345: 725-730
- Kim S, Lim DH, Lee J, Kang WK, MacDonald JS, Park CH, Park SH, Lee SH, Kim K, Park JO, Kim WS, Jung CW, Park YS, Im YH, Sohn TS, Noh JH, Heo JS, Kim YI, Park CK, Park K. An observational study suggesting clinical benefit for adjuvant postoperative chemoradiation in a population of over 500 cases after gastric resection with D2 nodal dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 1279-1285
- Park SH, Kim DY, Heo JS, Lim DH, Park CK, Lee KW, Choi SH, Sohn TS, Kim S, Noh JH, Kim YI, Park JO, Kim K, Kim WS, Jung CW, Im YH, Lee MH, Park K, Park CH, Kang WK. Postoperative chemoradiotherapy for gastric cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 1373-1377
- Sakamoto J, Morita S, Kodera Y, Rahman M, Nakao A. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer in Japan: global and Japanese perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54 Suppl 1: S25-S31
- Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3: 49-58
- 孙清, 毛永杰, 赵伟, 巢琳, 杭晓声, 常树建, 王琦. 卡培他滨联合奥沙利铂治疗晚期胃癌的随机对照临床研究. *肿瘤防治研究* 2005; 32: 729-730
- 王友良, 周民, 陈涛, 钱科卿. 草酸铂、羟基喜树碱为主方案治疗晚期胃癌. *中国癌症杂志* 2004; 14: 590-591
- 沈琳, 金懋林, 张晓东, 李洁, 刘庆森, 胡国清, 吴晴, 付强, 陆震宇, 李杰. 奥沙利铂联合表阿霉素5-FU/CF治疗晚期胃癌的临床探讨. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 472-475
- Lagarde SM, ten Kate FJ, Reitsma JB, Busch OR, van Lanschot JJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4347-4355
- Pemberton L, Coote J, Perry L, Khoo VS, Saunders MP. Adjuvant chemoradiotherapy for gastric carcinoma: dosimetric implications of conventional gastric bed irradiation and toxicity. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006; 18: 663-668
- Marcenaro M, Foppiano F, Durzu S, Barra S, Corvò R. Kidney-sparing radiotherapy by multiple-field three-dimensional technique in the postoperative management of patients with gastric cancer: comparison with standard two-field conformal technique. *Tumori* 2006; 92: 34-40
- Jansen EP, Saunders MP, Boot H, Oppedijk V, Dubbelman R, Porritt B, Cats A, Stroom J, Valdés Olmos R, Bartelink H, Verheij M. Prospective study on late renal toxicity following postoperative chemoradiotherapy in gastric cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 781-785

■同行评价
本文选题尚可, 数据客观, 研究结论有一定的临床指导意义.

编辑 程剑侠 电编 李军亮

胃癌侵犯胃裸区与CD34、VEGF、VEGF-C表达的关系及临床意义

程鑫, 韩明, 张仕状, 董鹏, 曲林涛

■背景资料

肿瘤的血管和淋巴管生成与肿瘤的发生发展、侵袭转移及预后有密切关系。胃裸区受累是近侧胃癌侵犯腹膜后间隙的一个重要特征,也是肿瘤淋巴结转移的重要途径。胃裸区作为一个客观解剖实体的存在以及其特殊的临床意义,逐渐引起人们的注意。

程鑫, 张仕状, 董鹏, 曲林涛, 潍坊医学院医学影像学系 山东省潍坊市 261042

韩明, 潍坊医学院基础医学教学部 山东省潍坊市 261042

国家自然科学基金资助项目, No. 30772716

通讯作者: 程鑫, 261042, 山东省潍坊市, 潍坊医学院医学影像学系. chengxin131008@yahoo.com.cn

电话: 0536-2602681

收稿日期: 2007-09-03 修回日期: 2007-11-28

Clinical significance and relationship between gastric bare area involved in gastric carcinoma and expression of CD34, VEGF and VEGF-C

Xin Cheng, Ming Han, Shi-Zhuang Zhang, Peng Dong, Lin-Tao Qu

Xin Cheng, Shi-Zhuang Zhang, Peng Dong, Lin-Tao Qu, Department of Medical Imaging, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Ming Han, Department of Basic Medicine, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772716

Correspondence to: Xin Cheng, Department of Medical Imaging, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. chengxin131008@yahoo.com.cn
Received: 2007-09-13 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To detect the expression of CD34, vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in gastric carcinoma, and to investigate the clinical significance and relationship between the gastric bare area (GBA) involved in gastric carcinoma and expression of CD34, VEGF and VEGF-C.

METHODS: Seventy-two cases of gastric carcinoma were divided into GBA involved and non-involved groups. Expression of CD34, VEGF and VEGF-C was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: In gastric carcinoma, there was no significant difference in the expression of VEGF (27/32 vs 28/40), CD34 (61.67 ± 21.33 vs 60.79 ± 22.04) or VEGF-C (23/32 vs 26/40) in GBA

involved and non-involved groups. In proximal gastric carcinoma, there was no significant difference in the expression of VEGF (23/30 vs 6/9), CD34 (62.48 ± 20.12 vs 61.79 ± 23.68) and VEGF-C (20/30 vs 6/9) in GBA involved and non-involved groups.

CONCLUSION: There was no relationship between the GBA involved in gastric carcinoma and expression of CD34, VEGF and VEGF-C. The anatomical structure of the GBA may result in poor prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Gastric bare area; CD34; Vascular endothelial growth factor; Vascular endothelial growth factor C

Cheng X, Han M, Zhang SZ, Dong P, Qu LT. Clinical significance and relationship between gastric bare area involved in gastric carcinoma and expression of CD34, VEGF and VEGF-C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3860-3863

摘要

目的: 检测胃癌组织中CD34、VEGF、VEGF-C表达情况, 探讨CD34、VEGF、VEGF-C表达与胃癌是否侵犯胃裸区的关系及临床意义。

方法: 将72例胃癌组织分成胃裸区受侵组与未受侵组, 采用免疫组化方法测定其CD34、VEGF、VEGF-C表达情况。

结果: 胃裸区受侵组与未受侵组胃癌组织的CD34(61.67 ± 21.33 vs 60.79 ± 22.04)、VEGF(27/32 vs 28/40)、VEGF-C(23/32 vs 26/40)的表达无明显差异, 近侧胃癌中, 胃裸区受侵组与未受侵组胃癌组织的CD34(62.48 ± 20.12 vs 61.79 ± 23.68)、VEGF(23/30 vs 6/9)、VEGF-C(20/30 vs 6/9)的表达无明显差异。

结论: 胃裸区是否受侵与胃癌组织的CD34、VEGF、VEGF-C的表达无关, 胃裸区这一解剖结构可能是胃癌预后较差的原因。

关键词: 胃癌; 胃裸区; CD34; 血管内皮生长因子; 淋巴管内皮生长因子

程鑫, 韩明, 张仕状, 董鹏, 曲林涛. 胃癌侵犯胃裸区与CD34、VEGF、VEGF-C表达的关系及临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3860-3863

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3860.asp>

0 引言

近年来研究发现, 肿瘤的血管和淋巴管生成与肿瘤的发生发展、侵袭转移及预后有密切关系, 目前, 对肿瘤血管和淋巴管生成的研究集中在血管内皮生长因子家族上. 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是刺激血管内皮细胞增殖最重要的因子之一, MVD(microvessel density, MVD)可以作为测量胃癌新生血管生成的指标, CD34最常用来标记肿瘤内皮细胞并且在微血管中表达最强. 淋巴管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是近期发现的血管内皮生长因子家族的新成员, 可以特异性的与淋巴管内皮细胞上的VEGFR-3结合促进肿瘤淋巴管的增生及肿瘤的淋巴道转移, 是目前所知最重要的具有淋巴管生成作用的因子. 胃裸区(gastric bare area, GBA)是指胃贲门部及胃小弯近侧部分胃后壁后方胃膈韧带两层腹膜之间无腹膜覆盖的区域, 是近侧胃的一个特殊结构, 其解剖实质应归属为腹膜后结构(图1). 本研究通过观察胃癌组织中CD34、VEGF、VEGF-C表达情况, 旨在探讨其与胃裸区是否受侵的关系, 为胃裸区这一解剖结构的存在导致胃癌预后较差提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析2002-02/2005-09潍坊医学院附属医院和潍坊市人民医院, 手术切除并经病理证实的胃癌患者72例, 男54例, 女18例, 年龄38-77(平均年龄60.5)岁. 其中近侧胃癌39例, 远侧胃癌33例, 72例中, 32例经手术和病理证实, 肿瘤明显超出胃壁肌层, 侵入到胃裸区范围内或者在胃裸区内形成肿瘤淋巴结转移, 而胃裸区未受累者40例.

1.2 方法 标本经甲醛固定、石蜡包埋、4 μ m连续切片. 采用免疫组化PV-9000法, VEGF mAb(鼠抗人)、CD34 mAb(鼠抗人)、VEGF-C mAb(兔抗人)、PV-9000免疫组化检测试剂盒和DAB试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限

公司. 用已知阳性切片同时在同一条件下染色作为阳性对照, 用PBS(pH = 7.4)代替一抗作为阴性对照, 染色步骤严格按照试剂说明书进行.

1.2.1 CD34免疫组化结果的判定: 阳性标准为内皮细胞形成的条状及隙状等孤立或簇状结构呈棕黄染色及有管腔者, 管腔小于8个红细胞大小的均计为1条血管, 相互分离的内皮细胞按1条血管计数, 血管腔大于8个红细胞或关闭可见平滑肌者不计入内. MVD计数参照Weidner *et al* [1]的方法, 先在低倍镜($\times 100$)下确定三个血管着色最密集区域即“热点”, 然后在高倍镜($\times 200$)下计数微血管. 取3个高倍镜视野均值作为MVD.

1.2.2 VEGF、VEGF-C免疫组化结果的判定: 产物为棕黄色颗粒, 位于肿瘤细胞胞质或(和)细胞膜内. 表达强度根据阳性物质着色深浅及面积判定结果. 评分标准按Shimizu方法[2]对每张切片阳性细胞的阳性强度DAB显色, 按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0、1、2、3分, 着色阳性面积按无着色、着色面积<25%、26%-50%、>50%分别计0、1、2、3分, 然后根据两项记分之和判断其结果: <3分为阴性, ≥ 3 分为阳性.

统计学处理 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 显著标准有显著性差异为0.05(双侧).

2 结果

2.1 微血管在肿瘤细胞中的分布特征 免疫组化染色后胃癌组织中所有毛细血管、小动静脉内皮细胞均染色阳性, 切片背景清晰(图2A). 72例胃癌组织的MVD平均值为(60.73 $\pm$ 23.22)个/视野, 范围为4.67-112个/视野.

2.2 VEGF、VEGF-C的表达 VEGF、VEGF-C阳性呈棕黄色颗粒状或团状, 位于胞质内(图2B-C). 72例胃癌组织中, VEGF、VEGF-C表达阳性率分别为76.4%(55/72)、68.1%(49/72).

2.3 胃癌是否侵犯胃裸区与MVD值、VEGF、VEGF-C的表达的关系 按肿瘤是否侵犯裸区, 分为胃裸区受侵组(32/72, 44.4%)与胃裸区未受侵组(40/72, 55.6%). MVD值及VEGF、VEGF-C的表达在两组间无显著性差异($P > 0.05$)(表1).

2.4 近侧胃癌组中胃裸区受侵与MVD值、VEGF、VEGF-C的表达间的关系 39例近侧胃癌中, 胃裸区受侵者30例(76.9%), 未受侵者9例(23.1%). 两组间MVD及VEGF、VEGF-C的表达

■创新盘点

迄今为止对胃裸区这一解剖实体, 目前仅局限于从解剖学方面进行一些研究, 关于胃癌是否侵犯胃裸区与分子生物学的关系, 国内外文献未见报道.

■应用要点

胃裸区是否受侵与肿瘤分子生物学特性无关, 在近侧胃癌及胃癌侵犯胃裸区患者预后不良的主要因素中, 胃裸区这一解剖空间的存在可能占有重要地位. 随着样本量的扩大和对随访资料进行生存率分析, 可进一步确定胃癌侵犯胃裸区是否为影响患者生存时间的独立因素.

■名词解释

胃裸区(gastric bare area, GBA):指胃贲门部及胃小弯近侧部分胃后壁后方胃膈韧带两层腹膜之间无腹膜覆盖的区域,是近侧胃的一个特殊结构,其解剖实质应归属为腹膜后结构。



图1 胃裸区图. 经贲门断层解剖标本, 胃膈韧带左层(左白箭)和右层(右白箭)分别为胃裸区的左右界限, 该界限内胃壁与膈肌之间的部分即为胃裸区。

表1 胃癌是否侵犯胃裸区与MVD值、VEGF、VEGF-C的表达间的关系

胃裸区	n	VEGF		MVD	VEGF-C	
		+	-	mean ± SD(个/视野)	+	-
胃癌组						
受侵	32	27	5	61.67±21.33	23	9
未受侵	40	28	12	60.79±22.04	26	14
近侧胃癌组						
受侵	30	23	7	62.48±20.12	20	10
未受侵	9	6	3	61.79±23.68	6	3

无明显差异($P>0.05$)(表1)。

3 讨论

近年来近侧胃癌(proximal gastric carcinoma, PGC)发病率呈上升趋势, 近侧胃癌较远侧胃癌(distal gastric carcinoma, DGC)预后差^[3], 肿瘤的侵犯和淋巴结转移在决定PGC预后的主要因素中占有重要地位^[4-5]。已有研究^[6]表明, 胃裸区受累是PGC侵犯腹膜后间隙的一个重要特征, 出现胃裸区受累的病例, 其5年生存率下降, 仅为10.5%左右。

国内外文献未见关于胃癌是否侵犯胃裸区的分子生物学的报道。本研究发现, 72例胃癌组织的MVD及VEGF、VEGF-C的表达在胃裸区受侵组与胃裸区未受侵组间无显著性差异; 本研究还发现39例近侧胃癌中, 胃裸区受侵组与未受侵组MVD、VEGF、VEGF-C的表达无明显差异, 说明胃裸区是否受侵与肿瘤分子生物学特性无关。我们推测近侧胃癌及胃癌侵犯胃裸区患者预后不良的主要因素中, 胃裸区这一解剖空间的存在可能占有重要地位, 这是本研究得到的前期结论。随着样本量的扩大和对随访资料(3-5年)进行生存率分析, 可进一步确

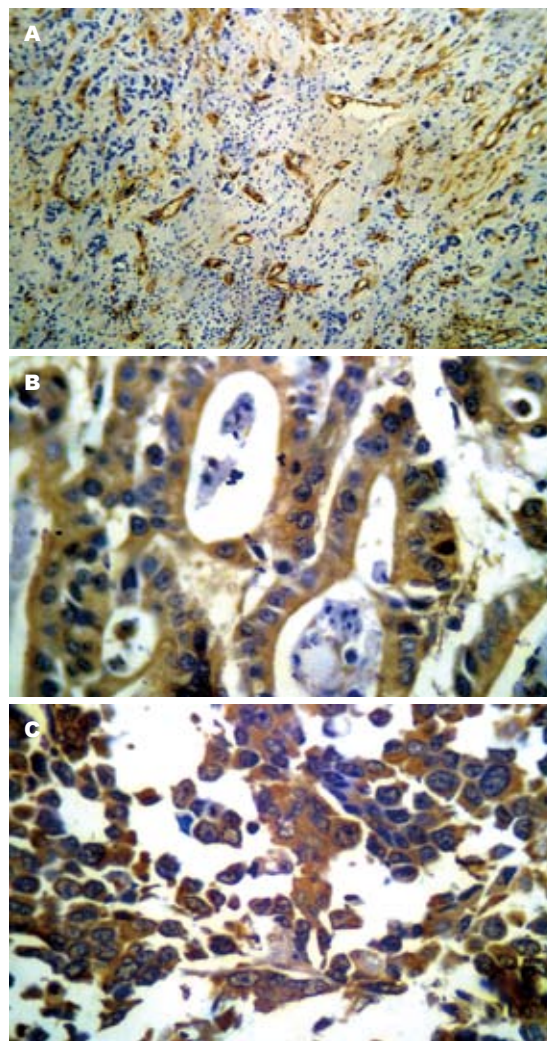


图2 CD34、VEGF和VEGF-C免疫组织化学染色(A × 100, B-C × 400)。A: CD34: 肿瘤组织间质丰富的微血管染色, 呈棕黄色裂隙状分布; B: VEGF: 线管状排列的瘤细胞胞质、胞膜被染成棕黄色; C: VEGF-C: 肿瘤细胞胞质、薄膜被染成棕黄色。

定胃癌侵犯胃裸区是否为影响患者生存时间的独立因素。

近侧胃癌中, 胃裸区是否受侵与肿瘤组织的MVD、VEGF、VEGF-C的表达无关, 而肿瘤组织MVD、VEGF、VEGF-C的表达与肿瘤的生长、浸润、转移密切相关, 我们可以推测胃裸区这一解剖实体的存在使得发生在胃裸区毗邻胃壁的肿瘤具有更大的侵袭性。由于胃裸区为胃贲门部及胃小弯近侧部分胃后壁后方胃膈韧带两层腹膜之间无腹膜覆盖的区域, 胃裸区内的胃壁缺乏脏层腹膜覆盖, 相对薄弱, 肿瘤更容易突破。因此生长在这些部位的肿瘤只要突破胃裸区毗邻的胃壁肌层或突破胃膈韧带就很容易侵犯胃裸区。裸区内有血管、神经和淋巴结分布, 当肿瘤侵犯胃裸区时, 肿瘤不仅可以直接

侵及胃裸区这一解剖空间, 而且可以通过胃裸区内的血管和淋巴引流形成转移^[7].

4 参考文献

- 1 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887
- 2 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 3 Sauvanet A, Mariette C, Thomas P, Lozac'h P, Segol P, Tiret E, Delpero JR, Collet D, Leborgne J, Pradere B, Bourgeon A, Triboulet JP. Mortality and morbidity after resection for adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: predictive factors. *J Am Coll Surg* 2005; 201: 253-262
- 4 Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Park YK, Kim YJ, Kim SK. Clinicopathological characteristics of patients with proximal third gastric carcinoma. *Acta Chir Belg* 2004; 104: 677-682
- 5 Xiong HC, Zhang LJ, Yang Y, Liang Z, Wu N, Chen JF. Clinical analysis of 123 gastric cardia carcinoma patients treated with surgical operation. *Ai Zheng* 2006; 25: 100-104
- 6 Tonelli P. Gastric carcinomas of the "bare area". Their anatomo-surgical definition and proposal of an en bloc total gastrectomy. *Ann Ital Chir* 1999; 70: 405-419; discussion 419-420
- 7 Wu B, Min PQ, Yang K. Utility of multidetector CT in the diagnosis of gastric bare area invasion by proximal gastric carcinoma. *Abdom Imaging* 2007; 32: 284-289

■同行评价
本文研究方法和
技术有一定创新
性, 设计合理可
靠, 统计学处理方
法使用恰当, 科学
结论较明确, 有较
好的参考价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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)

前列地尔注射液联合血浆置换治疗重型肝炎33例

陈礼宏, 李德辉, 杨春芳

■背景资料
重型肝炎死亡率
高, 治疗效果差,
需要临床医生探
讨一些有效的治
疗方法。

陈礼宏, 李德辉, 杨春芳, 常德市第一人民医院传染科 湖南
省常德市 415003
通讯作者: 陈礼宏, 415003, 湖南省常德市第一人民医院传染科。
clh1997119@sina.com
收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-11-30

Prostaglandin E1 combined with plasma exchange for treatment of patients with severe hepatitis: an analysis of 33 cases

Li-Hong Chen, De-Hui Li, Chun-Fang Yang

Li-Hong Chen, De-Hui Li, Chun-Fang Yang, Department of Infectious Diseases, the First People's Hospital of Changde City, Changde 415003, Hu'nan Province, China
Correspondence to: Li-Hong Chen, Department of Infectious Diseases, the First People's Hospital of Changde City, Changde 415003, Hu'nan Province, China. clh1997119@sina.com
Received: 2007-05-31 Revised: 2007-11-30

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effects of prostaglandin E1 (PGE1) combined with plasma exchange in patients with severe hepatitis.

METHODS: Sixty-two patients with severe hepatitis were randomly divided into treatment ($n = 33$) and control ($n = 29$) groups. In the treatment group, 33 patients with severe hepatitis (two with subacute severe hepatitis, and 31 with chronic severe hepatitis) received combined therapy with comprehensive internal medicine treatment which was the artificial liver support system and PGE1. In the control group, 29 patients (one with subacute severe hepatitis, and 28 with chronic severe hepatitis) were treated with comprehensive internal medicine and the artificial liver support system.

RESULTS: After treatment, serum total bilirubin, alanine aminotransferase, and PTA were significantly improved in the two groups. There were significant differences between the treatment and control group in concentration of TBIL and PTA ($155.8 \pm 138.2 \mu\text{mol/L}$ vs $296.4 \pm 100.5 \mu\text{mol/L}$; 62.6%

$\pm 10.4\%$ vs $42.9\% \pm 11.4\%$; $P < 0.01$). The survival rate in the treatment group was higher than that in the control group (72.8% vs 48.3% , $P < 0.01$).

CONCLUSION: PGE1 combined with plasma exchange is an effective method for treating severe hepatitis.

Key Words: Prostaglandin E1; Severe hepatitis; Plasma exchange

Chen LH, Li DH, Yang CF. Prostaglandin E1 combined with plasma exchange for treatment of patients with severe hepatitis: an analysis of 33 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3864-3867

摘要

目的: 评价前列地尔注射液联合血浆置换治疗重型肝炎的疗效。

方法: 将62例重型肝炎患者随机分为试验组和对照组。试验组33例(亚急性重型肝炎2例, 慢性重型肝炎31例)在内科综合治疗基础上加用血浆置换及前列地尔注射液; 对照组29例(亚急性重型肝炎1例, 慢性重型肝炎28例)仅用内科综合治疗加用血浆置换。

结果: 试验组和对照组治疗后, 各指标均有明显改善, 与本组治疗前比较, 差异均有显著性 ($P < 0.01$); 试验组治疗后TBIL和PTA改善更为明显, 与对照组比较差异均有显著性 ($155.8 \pm 138.2 \mu\text{mol/L}$ vs $296.4 \pm 100.5 \mu\text{mol/L}$, $62.6\% \pm 10.4\%$ vs $42.9\% \pm 11.4\%$; $P < 0.01$); 试验组存活率(治愈及好转)显著优于对照组 (72.8% vs 48.3% , $P < 0.01$)。

结论: 前列地尔注射液联合血浆置换是治疗重型肝炎的有效方法。

关键词: 前列地尔; 重型肝炎; 血浆置换

陈礼宏, 李德辉, 杨春芳. 前列地尔注射液联合血浆置换治疗重型肝炎33例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3864-3867
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3864.asp>

0 引言

重型肝炎是以肝细胞坏死、肝功能衰竭为特征的危重疾病, 由于肝脏严重损害, 导致机体代谢紊乱和大量毒素堆积, 反过来又加重肝细胞坏死和肝功能损害, 形成恶性循环。尽管内科采取积极的综合治疗, 但病死率仍高达70%以上。本文采用前列地尔注射液(前列腺素E1, PGE1)联合血浆置换治疗重型肝炎33例, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-12/2006-12亚急性和慢性乙型病毒性重型肝炎住院患者62例, 男51例, 女11例; 年龄19-72(平均 39.4 ± 8.6)岁。随机分为试验组(33例)和对照组(29例)。试验组: 按病程分亚急性重型肝炎3例, 慢性重型肝炎30例; 按重型肝炎分期, 早期8例, 中期21例, 晚期4例; 按合并症分4例伴Ⅱ度肝性脑病, 25例有腹水, 11例合并自发性腹膜炎; 对照组: 按病程分亚急性重型肝炎2例, 慢性重型肝炎27例; 按重型肝炎分期, 早期4例, 中期20例, 晚期5例; 按合并症分3例伴Ⅱ度肝性脑病, 20例有腹水, 6例合并自发性腹膜炎。所有病例诊断按2000年西安第十次全国病毒性肝炎学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中重型肝炎诊断标准^[1]。两组患者乏力、消化道症状以及血生化指标等经统计学处理差异均无显著性(均 $P > 0.05$), 具有可比性。PGE1注射液(批号: 20060312, 80 μg/支), 吉林玉皇药业有限公司生产。P-IQ型血液净化人工肝装置,

1.2 方法 试验组: (1)内科综合治疗: 卧床休息, 补充足够能量, 维持水、电解质及酸碱平衡, 给予血浆制品、促肝细胞生长素、利尿剂、还原型谷胱甘肽、支链氨基酸、抗生素等。(2)血浆置换: 应用P-IQ型血液净化人工肝装置进行血浆置换治疗。每次血浆置换量2500-3000 mL, 血液流出速度为100-125 mL/min, 血浆分离速度与置换液补充速度均为25-35 mL/min。每例患者根据病情治疗1-3次, 每次操作3.5-4.2 h。术前常规给予肝素抗凝, 补钙2 g, 小剂量地塞米松或非那根预防过敏, 置换结束后按每例患者肝素用量的1/3-1/2量用鱼精蛋白中和体内过量的肝素。(3)加PGE1注射液160 μg加葡萄糖250 mL静脉滴注, 每天4次, 疗程4 wk。对照组: 内科综合治疗加血浆置换, 每例患者根据病情治疗1-3次, 每次操作3.5-4.2 h。设计统一的临床观察表, 观察并记录患者每次治疗前后的症状、体征、凝血酶原

表 1 两组患者疗效比较 $n(\%)$

分组	存活 ^b		无效		合计
	显效	有效	死亡	自动出院	
试验	19(57.6)	5(15.2)	5(15.2)	4(12.0)	33(100.00)
对照	8(27.6)	6(20.7)	9(31.0)	6(20.7)	29(100.00)

^b $P < 0.01$ 。

活动度(PTA)、电解质及肝、肾功能来判断临床疗效及观察不良反应。疗效判断标准为: (1)显效: 临床症状消失, 并发症治愈, 总胆红素(TBIL)和丙氨酸转氨酶(ALT)较治疗前下降三分之二以上。(2)有效: 临床症状明显改善, 并发症治愈, TBIL和ALT下降50%以上。(3)无效: 未达到有效标准甚至病情加重, 死亡, 放弃治疗, 自动出院。

统计学处理 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 疗效评价 试验组33例存活24例, 存活率为72.8%, 对照组29例存活14例(48.3%), 两组存活率比较($P \leq 0.01$), 存在显著差异(表1)。

2.2 两组血生化指标的变化 治疗前试验组与对照组比较, 各指标变化差异均无显著性(均 $P > 0.05$); 治疗后两组间除ALB外各指标均有明显改善($P < 0.01$), TBIL和PTA改善尤为明显。试验组治疗后与治疗前比较, 差异均有显著性($P < 0.01$)(表2)。

2.3 不良反应 试验组和对照组共62例共行血浆置换89次, 其中试验组11例出现皮肤瘙痒及荨麻疹, 1例有低血糖反应, 对照组10例出现皮肤瘙痒及荨麻疹。均经对症处理后得到纠正, 并完成血浆置换治疗。试验组中33例静脉注射前列地尔, 其中2例出现注射部位血管痛, 减慢静滴速度后消失; 1例出现静脉炎, 予热敷后好转, 均未终止治疗。

3 讨论

重型肝炎预后差, 病死率高达70%, 发病机制非常复杂, 迄今尚未完全阐明, 细胞因子可能在其中起重要作用。细胞因子与重型肝炎的关系主要体现在两个方面, 一是细胞因子是参与重型肝炎肝坏死发病过程的主要分子, 二是其与处于不良环境中的肝细胞再生抑制有关。重型肝炎肝脏Kupffer细胞功能严重受损, 对内毒素的

■相关报道

血浆置换治疗能及时清除患者体内的部分毒性物质, 使损伤的肝细胞有利于再生及功能恢复, 是目前国内治疗重型肝炎的主要手段之一。前列腺素E1能促进肝细胞在损伤过程中的修复和再生的作用, 目前国内外许多学者用前列腺素E1治疗爆发性肝炎等疾病。

■应用要点

血浆置换加PGE1注射液试验组治疗后血清总胆红素、PTA水平较单用血浆置换组下降更加明显,提高患者存活率。PGE1配合血浆置换是治疗重型肝炎的有效方法之一。

表 2 两组治疗前后血生化指标变化(mean ± SD)

分组		TBIL(μmol/L)	ALT(U/L)	ALB(g/L)	PTA (%)
试验 (n = 33)	治疗前	480.2 ± 138.0	436.5 ± 162.3	38.4 ± 9.8	38.2 ± 4.6
	治疗后	155.8 ± 138.2 ^{bd}	112.3 ± 140.5 ^{bd}	40.5 ± 8.4 ^d	62.6 ± 10.4 ^{bd}
对照 (n = 29)	治疗前	452.6 ± 112.6	414.8 ± 120.4	36.6 ± 4.8	38.4 ± 2.8
	治疗后	296.4 ± 100.5 ^d	124.7 ± 102.5 ^d	38.9 ± 8.4 ^d	42.9 ± 11.4 ^d

^bP<0.01 vs 组间; ^dP<0.01 vs 组内。

清除与解毒能力减弱,肝内淤积的胆汁酸和胆红素抑制Kupffer细胞的吞噬功能,来自门静脉的大量内毒素未经解毒而入体循环,形成内毒素血症,激活肝细胞合成和分泌脂多糖结合蛋白(LBP),将内毒素转运至Kupffer细胞膜上与相应受体CD14结合,激活细胞内信号转导系统,释放大量的炎性介质,如细胞因子TNF-α、IL-6等和氧自由基,从而激活内毒素诱导的以TNF为核心的炎症反应^[2]。

血浆置换治疗能及时清除患者体内的部分毒性物质^[3],如内毒素、胆红素、胆酸、肿瘤坏死因子等,减轻肝脏炎症,同时,置换新鲜同型血浆补充了血浆蛋白、凝血因子、调理素等生物活性物质,改善了凝血机制,减轻了组织水肿,纠正酸碱平衡及电解质紊乱,稳定内环境,为肝细胞再生及肝功能恢复赢得时间,使损伤的肝细胞有利于再生及功能恢复,最终获得生存^[4-5]。血浆置换是目前国内治疗重型肝炎的主要手段之一^[6-8]。

前列腺素E1具有以下作用: (1)可以促进胰高血糖素的释放,使胆汁分泌增加,加速肝内毒性物质的排泄,保护肝脏。(2)舒张血管、抗凝血,具有改善肝微循环的作用。(3)除具有免疫调节的作用之外,更重要的是前列地尔能与肝细胞膜上特异受体结合,激活腺苷酸环化酶,导致肝细胞内cAMP含量增多,可抑制磷酸酶活性,从而保护肝细胞膜及溶酶体膜,防止肝细胞坏死,并能抑制TNF的释放而保护肝细胞^[9-10]。此外还具有疏通淤胆,促进胆汁排泄,促进肝细胞在损伤过程中的修复和再生的作用,因此肝炎时补充前列地尔对恢复肝功能是有益的^[11-13]。目前国内许多学者用前列腺素E1治疗包括爆发性肝炎在内的多种疾病^[14-16]。

本文观察到用血浆置换以及血浆置换加上PGE1注射液治疗慢性重型肝炎,治疗后两组患者血清总胆红素、谷丙转氨酶等水平较治疗前显著下降;血浆置换加上PGE1注射液试验组治

疗后血清总胆红素、PTA水平较单用血浆置换组下降更加明显,两组相比差异有显著性意义。且试验组存活率显著优于对照组。说明PGE1可能通过抑制TNF-α释放,降低血清TNF-α的水平,从而降低IL-6等炎性介质的水平,提高患者存活率。PGE1配合血浆置换是治疗重型肝炎的有效方法之一。

4 参考文献

- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000; 8: 324-329
- Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 16-23
- Santoro A, Mancini E, Ferramosca E, Faenza S. Liver support systems. *Contrib Nephrol* 2007; 156: 396-404
- Li LJ, Zhang YM, Liu XL, Du WB, Huang JR, Yang Q, Xu XW, Chen YM. Artificial liver support system in China: a review over the last 30 years. *Ther Apher Dial* 2006; 10: 160-167
- Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 31: 148-151
- 赵有蓉, 郭树华, 曾维群, 张大志, 秦波, 王志毅, 袁春兰, 吕和健, 任红. 人工肝支持系统血浆置换治疗重型肝炎的临床研究. 重庆医科大学学报 2004; 29: 672-674
- Li LJ, Yang Q, Huang JR, Xu XW, Chen YM, Fu SZ. Effect of artificial liver support system on patients with severe viral hepatitis: a study of four hundred cases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2984-2988
- Naruse K, Tang W, Makuuchi M. Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1516-1521
- Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Adhesion molecules and CXC chemokines in endotoxin-induced liver injury. *Fukushima J Med Sci* 2003; 49: 1-13
- 蒋永芳, 许允, 张永红, 龚国忠. 前列地尔对慢性乙型重型肝炎患者血清肿瘤坏死因子-α的影响. 中国新药

- 杂志 2005; 14: 1057-1058
- 11 Kubo S, Tanaka H, Shuto T, Takemura S, Uenishi T, Tanaka S, Hirohashi K. Hepatic failure after liver resection in patients with cirrhosis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105: 669-673
- 12 Umeshita K, Monden M. Liver transplantation--present and future. *Nippon Rinsho* 2005; 63: 1956-1961
- 13 Quintero A, Pedraza CA, Siendones E, Kamal ElSaid AM, Colell A, Garcia-Ruiz C, Montero JL, De la Mata M, Fernandez-Checa JC, Mino G, Muntane J. PGE1 protection against apoptosis induced by D-galactosamine is not related to the modulation of intracellular free radical production in primary culture of rat hepatocytes. *Free Radic Res* 2002; 36: 345-355
- 14 Sato T, Yasui O, Kurokawa T, Asanuma Y, Koyama K. Appraisal of intra-arterial infusion of prostaglandin E1 in patients undergoing major hepatic resection report of four cases. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 125-133
- 15 Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Synthesis and pharmacological activity of a novel water-soluble hepatocyte-specific polymeric prodrug of prostaglandin E(1) using lactosylated poly(L-glutamic hydrazide) as a carrier. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1531-1536
- 16 Kawakami S, Munakata C, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. Targeted delivery of prostaglandin E1 to hepatocytes using galactosylated liposomes. *J Drug Target* 2000; 8: 137-142

■同行评价
本文书写规范, 文笔流畅, 研究目的与意义明确, 对临床肝衰竭以及其他重型肝病治疗有一定参考价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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)

Mirizzi综合征诊治14例

郭金星, 张宗明, 朱建平, 宿砚明, 蒋 艺, 姜 楠, 张子超

■背景资料

Mirizzi综合征术前诊断较困难、术中解剖变异较多, 因此术中易发生胆管损伤。如何提高其术前诊断的准确性和选择合适的手术方法, 以减少医源性胆管损伤, 一直是胆道外科较为棘手的问题。

郭金星, 张宗明, 朱建平, 宿砚明, 蒋艺, 姜楠, 张子超, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科 北京市 100016
通讯作者: 郭金星, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科。
guojinxing@hotmail.com
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322
收稿日期: 2007-10-12 修回日期: 2007-12-14

Diagnosis and treatment of 14 patients with Mirizzi syndrome

Jin-Xing Guo, Zong-Ming Zhang, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Yi Jiang, Nan Jiang, Zi-Chao Zhang

Jin-Xing Guo, Zong-Ming Zhang, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Yi Jiang, Nan Jiang, Zi-Chao Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Correspondence to: Jin-Xing Guo, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, 6 Yijiefang, Jiuxian Bridge, Chaoyang District, Beijing 100016, China. guojinxing@hotmail.com
Received: 2007-10-12 Revised: 2007-12-14

Abstract

AIM: To explore the characteristics of the diagnosis and treatment in patients with Mirizzi syndrome, so as to improve its diagnosis and avoid the damage of the bile duct.

METHODS: A retrospective analysis was performed on the 14 patients with Mirizzi syndrome in our hospital from Nov 2004 to Aug 2007.

RESULTS: 4 cases were made the definite diagnosis before the operation, the others were diagnosed during the operation. According to the standard of Nagakawa typing, 10 cases belonged to Type I, 2 cases Type II and 2 cases Type III. All patients were discharged from our hospital without complications.

CONCLUSION: The preoperative diagnosis of Mirizzi syndrome is difficult. Intraoperative careful exploration, the necessary cholangiography and the suitable operative methods is important to avoid iatrogenic bile duct injury.

Key Words: Mirizzi syndrome; Diagnosis; Operation

Guo JX, Zhang ZM, Zhu JP, Su YM, Jiang Y, Jiang N, Zhang ZC. Diagnosis and treatment of 14 patients with Mirizzi syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(36): 3868-3870

摘要

目的: 探讨Mirizzi综合征的诊断和治疗特点, 提高其诊治水平, 避免胆道损伤。

方法: 回顾性分析我院2004-11/2007-08收治的14例Mirizzi综合征的临床资料。

结果: 术前诊断4例, 其余均为术中诊断, 根据Nagakawa分型标准, 本组病例分为I型10例, II型2例, III型2例, 全部病例治愈出院, 术后随访均未发生胆管狭窄及其他并发症。

结论: Mirizzi综合征术前诊断困难, 术中需仔细探查, 必要时行术中胆道造影以明确诊断, 并根据不同类型选择适当的手术方式, 以避免医源性胆管损伤。

关键词: Mirizzi综合征; 诊断; 手术

郭金星, 张宗明, 朱建平, 宿砚明, 蒋艺, 姜楠, 张子超. Mirizzi综合征诊治14例. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3868-3870
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3868.asp>

0 引言

胆囊结石持续嵌顿和压迫胆囊壶腹部和颈部, 引起肝总管狭窄或胆囊胆管瘘, 表现为反复发作的胆囊炎、胆管炎和梗阻性黄疸称为Mirizzi综合征。由于其术前诊断较困难、术中解剖变异较多, 因此, 术中易发生胆管损伤。如何提高其术前诊断的准确性和选择合适的手术方法, 以减少医源性胆管损伤, 一直是胆道外科较为棘手的问题。我院2004-11/2007-08收治Mirizzi综合征患者14例, 现分析报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者14例, 其中男5例, 女9例, 年龄44-74(平均60±10)岁, 有右上腹痛者11例, 同时

■研发前沿

对于Mirizzi综合征, 无创检查以CT(三维胆道成像)、MRCP, 结合血生化检查有助于术前诊断, 必要时可行ERCP检查进一步明确诊断, 有学者提出ERCP可作为Mirizzi综合征术前诊断的金标准。

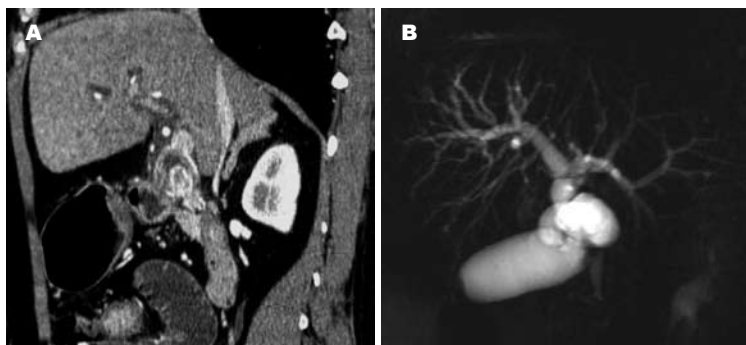


图1 影像学检查. A: CT胆道三维成像示胆囊管与肝总管关系紊乱, 并可见结石嵌顿于胆囊管和肝总管汇合处; B: 核磁共振胰胆管成像(MRCP)示胆囊管与肝总管关系紊乱, 肝内胆管扩张.

■相关报道
迄今, 国内外尚无统一的Mirizzi综合征分型标准. 目前应用较多的是1989年Csendes提出的分型. 1997年Nagakawa根据其诊断与治疗特点提出新的分型标准.

伴有黄疸史3例, 寒战、发热3例. 病程0.5-90(平均18.65) d, 择期手术10例, 急诊手术4例.

1.2 方法 血生化检查采用罗氏公司Modulay生化分析仪, 血总胆红素采用重氮盐化学比色, 谷丙转氨酶、碱性磷酸酶和谷氨酰转肽酶采用IFCC酶学比色. CT检查采用GE公司16排螺旋CT. 核磁共振胰胆管成像采用西门子1.5T超导型磁共振成像系统. 全组病例均接受手术治疗并确诊, 其中术前诊断4例, 其余均为术中诊断. 根据Nagakawa分型标准, 本组病例分为I型10例, 均行单纯胆囊切除, 其中经腹腔镜4例、开腹5例、腹腔镜中转开腹1例. II型2例, 行开腹胆囊切除, 瘘口直接缝合修补, 胆总管置T管常规引流. III型2例, 行开腹胆囊大部切除, 残余胆囊壁组织修补瘘口, 胆总管置T管支撑引流, 术后3 mo拔出T管.

2 结果

2.1 血生化检查结果 血总胆红素(TB)7.8-294.4 $\mu\text{mol/L}$, 平均78.5 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素(DB) 2.3-218.1 $\mu\text{mol/L}$, 平均54.7 $\mu\text{mol/L}$, 谷丙转氨酶(ALT)11.2-522.9 nkat/L, 平均155.5 nkat/L, 碱性磷酸酶(ALP)13.5-2323.8 nkat/L, 平均920.8 nkat/L, 谷氨酰转肽酶(GT)11.7-979.8 nkat/L, 平均319.3 nkat/L.

2.2 影像学检查结果 全组病例均行B型超声检查, 提示胆囊颈部结石2例, 胆囊萎缩1例, 肝外胆管结石2例, 肝总管扩张2例. CT检查(胆道三维成像)9例, 发现胆囊管与肝总管关系紊乱4例, 有时可见结石嵌顿于胆囊管和肝总管汇合处(图1A). 核磁共振胰胆管成像(MRCP)检查2例, 显示胆囊管与肝总管关系紊乱, 肝内胆管扩张(图1B). 术中胆道造影10例, 显示肝总管受压, 肝内胆管扩张.

2.3 预后 全组病例均治愈出院, 术后随访3-28 mo, 均未发生胆管狭窄及其他并发症.

3 讨论

Mirizzi综合征发生的解剖基础是胆囊管过长且与肝总管并行, 病理基础是胆囊管或胆囊颈部结石嵌顿. 迄今, 国内外尚无统一的Mirizzi综合征分型标准. 比较认可的是1989年Csendes提出的分型^[1-3], I型: 胆囊颈或胆囊管结石嵌顿压迫胆总管; II型: 胆囊胆管瘘形成, 瘘口小于胆总管周径的1/3; III型: 瘘管口径超过胆总管周径的2/3; IV型: 胆囊胆管瘘完全破坏了胆总管壁. 在1997年, Nagakawa *et al*^[4]根据其诊断与治疗特点提出新的分型标准, I型: 胆囊管或胆囊颈部结石压迫, 引起肝总管狭窄; II型: 胆囊管或胆囊颈部结石嵌顿, 引起肝总管瘘; III型: 胆囊管或胆囊颈部结石融合, 引起肝总管狭窄; IV型: 胆囊管或胆囊颈部无结石, 由于胆囊三角炎性纤维化, 引起肝总管狭窄. 结合本组病例的诊治体会, 我们认为Nagakawa分型因兼顾病情进展及病变严重程度, 因而更具有临床实际意义, 近来受到重视^[5].

由于Mirizzi综合征缺乏特异性症状, 给术前诊断带来很大困难, 常在术前被误诊为胆囊炎、胆管结石和胆管炎. 术前是否能明确诊断对避免手术中损伤胆管及正确处理有重要意义. 本组14例患者中, 仅有4例术前考虑为Mirizzi综合征, 并在术中证实, 其余均为术中发现并得以诊断为Mirizzi综合征. 为进一步提高其术前诊断率, 应加强对该病的认识和警惕. 通常认为, Mirizzi综合征多见于中老年人, 多有较长的胆结石病史, 临床表现主要是胆绞痛、梗阻性黄疸及反复发作的胆管炎, 实验室检查可见TB、ALT和AKP升高. 影像学检查对该病的诊断具有重要意义, 临床首选B超检查, 较为特征性的B超检查所见是: 胆囊结石嵌顿于胆囊颈部或胆囊管, 慢性萎缩性胆囊炎, 肝总管扩张, 胆总管远端无扩张, 有时可发现肝总管节段性狭窄. CT检查结合胆道三维成像对Mirizzi综合征的诊断

■应用要点
Mirizzi综合征术前诊断困难, 术中需仔细探查, 必要时行术中胆道造影以明确诊断, 并根据不同类型选择适当的手术方式, 以避免医源性胆管损伤.

■同行评价
本文叙述详实,层次分明,有一定的学术价值.

意义较大,可发现胆囊颈部或胆囊管结石嵌顿,肝总管狭窄,胆囊管水平以上胆管扩张,胆囊管水平以下胆管正常,本组4例术前诊断病例均由此检查提示疑似诊断,并在术中证实. MRCP可发现肝外胆管狭窄合并胆囊结石,或显示肝总管胆囊侧偏心性狭窄及肝总管和肝内胆管扩张,对诊断帮助较大.

对于怀疑为Mirizzi综合征,经上述检查仍缺乏足够证据者,可行ERCP检查,典型的图像可显示为:胆总管在胆囊水平有一弧形光滑的侧方充盈缺损,其近侧的肝总管及肝内胆管扩张,其远侧的胆总管内径正常,并可显示内含结石的胆囊或胆囊管阴影,胆管和胆囊之间出现交通阴影时表示有内漏存在. 最近有人提出^[6], ERCP可作为Mirizzi综合征术前诊断的金标准.

对于术前未能明确诊断,术中发现胆囊颈部或胆囊管结石嵌顿,胆囊Calot三角粘连致密和组织增厚,不能辨别胆囊管与肝总管结构关系者,可行术中胆道造影,其典型表现是:肝总管狭窄及其侧方的胆囊管充盈缺损,其上方肝总管明显扩张,并可发现胆囊管与肝总管之间存在瘘道,同时可以发现是否有小结石掉入胆总管,从而避免胆管损伤及术后胆总管结石残留. 因此,术中胆道造影被认为是确诊Mirizzi综合征及确定其分型的重要方法. 本组9例患者通过术中胆道造影确诊.

Mirizzi综合征的治疗以外科手术为主,原则为去除病灶,解除梗阻,修复瘘道,胆道引流. 手术方法包括胆囊切除术和相应胆道病变的处理,而关键问题在于避免发生胆管损伤,矫正已形成的胆管狭窄. 胆囊管或颈部结石嵌顿,反复发作性炎症加上解剖变异,Calot三角粘连明显,解剖分离困难易损伤肝外胆道. 故应根据术中直视或术中胆管造影所见,依据不同的病理类型,采取不同的手术方法. 通常认为,对Csendes分型I型患者可行胆囊切除或部分胆囊切除术;对II型瘘口较小且胆总管直径大于1.5 cm者可行瘘口直接缝合加T管支撑引流术;对瘘口大,直

接修补后将造成胆管狭窄者,可行带血管胆囊瓣修补术;对III和IV型者因瘘口超过胆总管周径的2/3或呈环状缺损而难以修补者,可选择肝总管空肠Roux-en-Y吻合术. 近年来,随着内镜技术及微创外科的开展, Mirizzi综合征的治疗观念也发生了很大的变化. 尽管Mirizzi综合征通常被视为腹腔镜手术的禁忌症^[6-8],但新近有关腹腔镜手术治疗Mirizzi综合征的报道越来越多^[5,9-11],我们的体会是腹腔镜手术主要适用于I型Mirizzi综合征,本组4例I型患者成功通过腹腔镜手术完成,但对于II-IV型患者,由于胆囊三角的解剖变异和严重纤维粘连,应以开腹手术为宜.

4 参考文献

- 1 Csendes A, Díaz JC, Burdiles P, Maluenda F, Nava O. Mirizzi syndrome and cholecystobiliary fistula: a unifying classification. *Br J Surg* 1989; 76: 1139-1143
- 2 姜瑛, 姜洪伟, 黄国民, 王心民. Mirizzi综合征的诊断及外科治疗. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 344-346
- 3 蒋晓忠, 李富贵, 严律南. Mirizzi综合征的诊断与治疗(附46例临床分析). *华西医学* 2006; 21: 481
- 4 Nagakawa T, Ohta T, Kayahara M, Ueno K, Konishi I, Sanada H, Miyazaki I. A new classification of Mirizzi syndrome from diagnostic and therapeutic viewpoints. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 63-67
- 5 徐涛, 李宁. Mirizzi综合征的腹腔镜诊治. *浙江实用医学* 2006; 11: 95-96
- 6 Ahlawat SK, Singhanian R, Al-Kawas FH. Mirizzi syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 102-110
- 7 李为民, 萧荫祺, 刘浩润, 郑方, 黄辉. Mirizzi综合征与腹腔镜胆囊切除术中的胆管损伤. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 140-141
- 8 Lai EC, Lau WY. Mirizzi syndrome: history, present and future development. *ANZ J Surg* 2006; 76: 251-257
- 9 Kwon AH, Inui H. Preoperative diagnosis and efficacy of laparoscopic procedures in the treatment of Mirizzi syndrome. *J Am Coll Surg* 2007; 204: 409-415
- 10 Chowbey PK, Bandyopadhyay SK, Sharma A, Khullar R, Soni V, Baijal M. Laparoscopic management of cholecystoenteric fistulas. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2006; 16: 467-472
- 11 Rohatgi A, Singh KK. Mirizzi syndrome: laparoscopic management by subtotal cholecystectomy. *Surg Endosc* 2006; 20: 1477-1481

编辑 李军亮 电编 何基才

胶囊内镜检查不明原因消化道出血临床转归115例

顾静莉, 戈之铮, 高云杰, 陈海英, 胡运彪, 萧树东

顾静莉, 戈之铮, 高云杰, 陈海英, 胡运彪, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
上海市重点学科建设资助项目, No. Y0205
通讯作者: 戈之铮, 200001, 上海市东方路1630号, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内镜中心, 上海市消化疾病研究所. zhizhengge@yahoo.com.cn
电话: 021-58752345
收稿日期: 2007-05-10 修回日期: 2007-11-23

Influence of capsule endoscopy on the clinical outcomes of patients with obscure gastrointestinal bleeding: an analysis of 115 cases

Jing-Li Gu, Zhi-Zheng Ge, Yun-Jie Gao, Hai-Ying Chen, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao

Jing-Li Gu, Zhi-Zheng Ge, Yun-Jie Gao, Hai-Ying Chen, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China

Supported by: the Key Scientific Research Projects of Shanghai City, No. Y0205

Correspondence to: Zhi-Zheng Ge, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, 1630 Dongfang Road, Shanghai 200001, China. zhizhengge@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-10 Revised: 2007-11-23

Abstract

AIM: To evaluate the accuracy of the diagnosis of OGIB by capsule endoscopy and the effectiveness of this technique in obtaining a suitable clinical outcome.

METHODS: From May 2002 to June 2005, 99 patients were enrolled in our study of capsule endoscopy for OGIB. We analyzed the degree of consistency between findings by capsule endoscopy and the clinical results, the outcome of treatments based on its diagnosis, the occurrence of re-bleeds and the re-examinations of the patients through records of consultations, emergencies or hospitalizations and telephone follow-up.

RESULTS: Capsule endoscopy successfully

detected 89.9% of cases of OGIB. At a mean follow-up of 18.4 (6-41) months, lesions detected by capsule endoscopy in 63 (63.6%) patients were verified. Among these patients, capsule endoscopy accurately diagnosed 90.5% (57/63) of OGIB cases, and this was not significantly different from the accuracy of diagnosis before validation ($P = 0.36$). Specific interventions were undertaken in 50.5% (50/99) of cases based on the findings of capsule endoscopy. The success rate of these specific strategies was 82% (41/50). Interventions based on positive findings in the small bowel are clearly more effective than those based on probable-positive findings ($P = 0.01$).

CONCLUSION: Capsule endoscopy has a high accuracy for the diagnosis of OGIB; this technique can efficiently guide further strategies and, in a relatively major proportion of cases, affect the clinical outcomes of these patients, especially bleeding caused by tumors, ulcers and angiodysplasia.

Key Words: Capsule endoscopy; Obscure gastrointestinal bleeding; Diagnosis; Clinical outcome

Gu JL, Ge ZZ, Gao YJ, Chen HY, Hu YB, Xiao SD. Influence of capsule endoscopy on the clinical outcomes of patients with obscure gastrointestinal bleeding: an analysis of 115 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3871-3876

摘要

目的: 探讨胶囊内镜诊断不明原因消化道出血(OGIB)的可靠性及根据其诊断结果指导疾病临床转归的有效性。

方法: 收集2002-05/2005-06间因不明原因消化道出血连续至本院行胶囊内镜检查的患者99例, 通过就诊记录、电话追踪和门诊随访等分析胶囊内镜诊断结果的临床符合情况、根据该诊断指导干预措施的结果、患者再出血及再检查等情况。

结果: 胶囊内镜对OGIB的病变检出率为89.9%, 平均随访时间为18.4(6-41) mo, 63例(63.6%)胶囊内镜检查结果得以验证, 病变检

■背景资料

传统小肠检查方法对不明原因消化道出血的诊断率较低, 难以有效指导疾病的诊治。而胶囊内镜能够完成对整个小肠的观察, 在此方面的诊断凸现出明显优势, 但能揭示此项新技术在诊断方面的可靠性及其指导疾病临床转归意义的相关研究较少。

■研发前沿

自胶囊内镜应用以来,以往过多的研究关注于胶囊内镜对疾病的诊断率,并与小肠钡灌、推进式小肠镜等进行比较显示出他的诊断优势,但这些资料很少涉及对患者的纵向随访。本文就从此方面出发,就胶囊内镜检查对OGIB患者临床转归的影响作一研究。

出率在验证前后无显著差异($P = 0.36$),最终确诊率达90.5%(57/63)。根据胶囊内镜诊断结果指导的特异性治疗率为50.5%(50/99),总成功率为82%(41/50),且经胶囊内镜诊断结果指导的对小肠阳性病变的有效干预率显著高于可疑阳性病变($P = 0.01$)。

结论: 胶囊内镜诊断不明原因消化道出血的准确性高,能有效指导对疾病的进一步治疗,并能较大幅度地影响这些疾病,特别是溃疡、肿瘤及血管发育不良所致的不明原因消化道出血的临床转归。

关键词: 胶囊内镜; 不明原因消化道出血; 诊断; 临床转归

顾静莉, 戈之铮, 高云杰, 陈海英, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜检查不明原因消化道出血临床转归115例. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3871-3876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3871.asp>

0 引言

不明原因消化道出血(obscure gastrointestinal bleeding, OGIB)是经胃镜、大肠镜检查未发现异常的慢性间歇性消化道出血,其病变主要位于小肠,发病率约占整个消化道出血的5%^[1]。由于传统小肠检查方法对其诊断率较低,难以有效指导疾病的诊治,因此作用有限^[2-5]。而胶囊内镜(capsule endoscopy, CE)检查技术的出现与兴起,首次能够完成对整个小肠的观察,是小肠检查技术的一次革命性飞跃,经过数年的临床实践,其应用已趋成熟,特别是对诊断OGIB具有明显优势,有望发展成为诊断小肠出血疾病的一线检查方法^[6-12]。然而能够揭示其诊断可靠性及指导疾病临床转归意义的相关研究不多或样本量少,前些阶段的许多研究过多的关注于胶囊内镜对疾病的诊断率,并与小肠钡灌、推进式小肠镜等进行比较显示出他的诊断优势,但这些资料很少涉及对患者的纵向随访。因而对此项新技术的价值评估尚待进一步完善,本文就胶囊内镜检查对OGIB患者临床转归的影响作一研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-05/2005-06对不明原因消化道出血的患者115例进行了胶囊内镜检查,他们均经胃镜和大肠镜检查结果阴性而怀疑出血部位位于小肠。随访期间失访16例,随访完成率为86.2%,最终收入99例。男47例,女52例,平

均年龄52(3-84)岁。CE检查之前平均病程为37.7(0.13-324) mo,进行胃镜、大肠镜、消化道钡餐、小肠钡灌、血管造影、小肠镜等相关检查平均为7.5次,平均最低血红蛋白浓度为67 g/L,需输血者56例(56.6%)。排除标准为:在CE检查之前未进行胃镜或大肠镜检查者;病变已明确行复查者;CE检查之前的相关检查或临床症状怀疑有肠腔狭窄者。采用Given Imaging Ltd, Yoqneam, Israel胶囊内镜设备,他由11 mm×26 mm大小的M2A胶囊内镜、数据记录仪和RAPID工作站3部分组成。

1.2 方法 检查前要求患者至少禁食8 h,必要时给予促胃肠动力药、祛泡剂或泻药辅助,检查期间允许患者自由走动,检查时间为6-8 h,检查后所得图像数据通过软件下载至RAPID工作站分析处理,并由两名经验丰富的内镜医师进行读片诊断。将胶囊内镜诊断结果分为阳性、可疑阳性和阴性,其中阳性率与可疑阳性率之和为胶囊内镜对OGIB的检出率。根据其检出结果予以患者相关干预:(1)特异性治疗包括手术治疗、内镜下治疗、特异性药物治疗如5-氨基水杨酸类/激素、反应停等;(2)非特异性治疗包括补充铁剂、输血、止血药、中药等;(3)单纯观察未予治疗。通过病史查阅、就诊记录及电话追踪等方法对这些患者随访至少6 mo。随访内容包括相关临床和实验室指标。临床指标即再检查、治疗、再出血及输血等情况;实验室指标即大便隐血及血红蛋白情况。胶囊内镜检查结果的验证标准:(1)检出的阳性或可疑阳性病变为其他检查证实或经特异性治疗有效者;(2)阴性结果经其他检查亦未发现病变或未再出血者。胶囊内镜指导的有效干预的成功标准:剔除假阳性外,对胶囊内镜检出的阳性或可疑阳性病变进行特异性治疗后未再出血、血红蛋白浓度保持稳定上升(治愈)或虽有再出血但出血频率及出血量明显低于治疗前、血红蛋白浓度则高于治疗前(好转)。

统计学处理 采用SAS 6.12统计软件,运用卡方检验分析数据, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胶囊运行及滞留情况 99例CE检查情况如下:CE平均总检查时间为469(335-551) min;平均胃排空时间为50.7(1-447) min,其中1例胶囊滞留食管447 min,11例胃排空时间大于120 min;在

表 1 CE对不同类型小肠病变和小肠外胃肠道检出病变及治疗情况

病变类型	<i>n</i>	特异性治疗 <i>n</i> (%)	有效干预 <i>n</i> (%)	非特异性治疗或未治疗 <i>n</i>
小肠病变				
疑似血管发育不良	29	13(44.8)	9(31.0)	16
溃疡(其中疑似Crohn病17例)	22	17(77.3)	15(68.2)	5
肿瘤	10	9(90.0)	9(90.0)	1
血管瘤	8	2(25.0)	2(25.0)	6
黏膜下肿瘤	6	2(33.3)	1(16.7)	4
其他(活动性出血、糜烂、憩室、息肉等)	10	4(40.0)	3(30.0)	6
小肠外胃肠道检出病变				
出血性/糜烂性胃炎	2	2(100)	1(50)	0
结肠血管发育不良	2	1(50)	1(50)	1

■创新盘点

本研究注重于在胶囊内镜诊断不明原因消化道出血的结果之后的随访验证情况及其根据其诊断结果所采取的干预措施情况来全面评估胶囊内镜在此方面的应用价值,更侧重于纵向的随访比较及验证其诊断结果的准确性。

有效检查时间内, 56例(56/99, 56.7%)CE检查过回盲瓣, 平均通过时间为335(154-524) min, 小肠转运时间为289.5(133.5-499) min. 仅1例(1%)CE滞留小肠而经手术取出, 该例CE检查结果及手术均证实为克罗恩病. 3例胶囊发生局部暂时滞留及13例排出时间超过72 h, 但最终均能自行排出体外.

2.2 随访前CE对99例OGIB患者的检查 小肠阳性66例、小肠可疑阳性19例、小肠外胃肠道病变4例、阴性10例. 85例小肠病变患者中发现疑似血管发育不良29例、疑似Crohn病或肿瘤的溃疡病变22例、肿瘤10例、血管瘤8例、黏膜下肿瘤6例、其他(如活动性出血、糜烂、憩室、息肉等)10例. 4例小肠外胃肠病变包括出血性胃炎1例、结肠血管扩张2例、糜烂性胃炎1例.

2.3 随访后结果 平均随访时间为18.4(6-41) mo, 出血未见好转28例, 需再输血4例(4%). 85例小肠病变中, 根据胶囊内镜检查结果指导手术者26例, 术中发现CE假阳性2例, 术后再出血2例. 特异性药物治疗21例(5-ASA类/激素治疗12例、反应停治疗9例), 出血未见好转4例. 而13例非特异性治疗及25例未治疗患者中再出血20例, 8例再出血时复行检查(包括胃镜、大肠镜、小肠镜、血管造影), 2例再检查发现病变并进行特异性治疗. 其中1例再出血复查小肠镜提示病变为末端回肠血管发育不良, 与胶囊内镜检查结果息肉出血不符, 予以反应停治疗但仍有再出血. 另1例再出血行血管造影检查提示为Meckel憩室, 与胶囊内镜检查结果血管瘤及黏膜下肿瘤不符, 并予以腹腔镜手术治疗后治愈. 其余6例再检查均未发现明显出血病灶.

4例小肠外胃肠病变中, 胶囊内镜指导治疗3例, 其中1例出血性胃炎予以胃镜下钛夹治疗, 1例结肠血管发育不良予以大肠镜下硬化剂治疗均治愈, 另1例糜烂性胃炎予以护胃药物治疗仍有再出血. 此外, 有1例CE提示结肠血管畸形未予特殊干预, 再出血复查大肠镜结果为痔疮出血并手术后治愈.

10例CE阴性患者中, 再出血2例, 其中1例再出血时行CE复查提示血管扩张并行手术得以证实, 另1例反复再出血行剖腹探查但未见异常. 1例CE检查后2 mo因发热使用抗生素无效, 加用激素后致肠穿孔而手术发现为空肠T细胞恶性淋巴瘤. 2例再检查(1例小肠镜、1例大肠镜)均未见异常, 5例未再出血及干预.

2.4 CE对OGIB的临床转归意义的评估 CE对OGIB病变的总检出率为89.9%(89/99), 其中小肠病变检出率为85.9%(85/99). 63例(63.6%)CE结果在随访期间得以验证, 结果显示CE对OGIB的最终确诊率为90.5%(57/63). 并发现CE对该63例OGIB患者的病变检出率在验证前后无显著差异[84.1%(53/63) vs 77.8%(49/63), $P=0.36$].

胶囊内镜对85例不同类型小肠病变的指导作用: 对血管发育不良所致的OGIB的特异性治疗率为44.8%, 对溃疡病变为77.3%, 对肿瘤为90%, 对血管瘤为25%, 对黏膜下肿瘤为33.3%及对其他病变如憩室、息肉、糜烂等为40%. 而对他们的有效干预率依次分别为31.0%, 68.2%, 90.0%, 25.0%, 16.7%及30.0%(表1).

根据CE诊断结果对患者进行特异性干预共50例(50.5%), 特异性干预成功率为82%(41/50). CE对检出病变的有效干预率为46.1%(41/89), 总

■应用要点

本文通过随访验证胶囊内镜对不明原因消化道出血诊断结果的准确性,来评估胶囊内镜对其诊断的可靠性,以确认胶囊内镜在此方面的使用价值。

表 2 根据胶囊内镜检出病变指导的特异性干预情况 n/n

	手术/ 有效	内镜/ 有效	特异性药 物/有效	小计/ 有效
阳性	24/20	0/0	16/15	40/35
可疑阳性	2/2	0/0	5/2	7/4
小肠外胃 肠病变	0/0	2/2	1/0	3/2
小计	26/22 ¹	2/2	22/17	50/41
成功率	84.6%	100%	77.3%	82%

¹剔除术中发现CE假阳性2例(1例CE疑似Crohn病的患者手术证实为回肠憩室;另1例CE结果为黏膜下肿瘤者术中未见明显肿块)。

体有效干预率为41.4%(41/99):其中对小肠阳性病变的有效干预率为53.0%(35/66),对小肠可疑阳性病变的有效干预率为21.1%(4/19),两者间有显著差异($P<0.05$)。对小肠外胃肠阳性病变的有效干预率为50%(2/4)(表2)。

3 讨论

不明原因消化道出血(OGIB)的主要病变部位在小肠,而传统小肠检查方法如小肠钡餐、小肠钡灌、血管造影、推进式小肠镜等对该疾病的诊断存在明显的局限性,病因诊断率较低,总体约在5%-40%之间^[2-5,13-14],许多患者因诊断不能明确而无法采取有效的干预措施,如耽误肿瘤治疗的最佳时机或对多发性血管病变盲目手术而常导致出血复发,给患者带来很大痛苦。

胶囊内镜(CE)的问世突破了传统小肠检查方法的局限性,实现了全小肠的检查,研究显示他对诊断小肠疾病,特别是不明原因消化道出血,具有诊断率高、检查图像清晰、患者依从性好及安全等优点^[11]。但经临床实践发现目前胶囊内镜检查尚存在一些不足,如不可操控性,图像显示为随机和一过性,无法活检进行病理诊断,检查完成情况及质量与胃肠蠕动、胃肠道通畅程度有关等,使我们必须进一步关注胶囊内镜对OGIB诊断结果的可靠性及其指导疾病临床转归的意义等问题。

本研究中胶囊内镜对99例OGIB患者病变的总检出率高达89.9%,与Garcia-Compean *et al*报道的80%-90%的检出率相似^[15-16]。检出病变中以小肠部位病变为主,占95.5%(85/89),其中包括了溃疡、肿瘤、多发性血管发育不良及血管瘤等高度出血可能的阳性病变和糜烂、息肉、黏膜红斑、单发血管发育不良及黏膜下肿瘤等中

度出血或潜在出血可能的可疑阳性病变。

由于胶囊内镜检查本身的不足或是检查时机不正确,易造成在检查时出现对某些非特异性病变的误诊、漏诊或无法判断的现象:如小肠自身蠕动出现的黏膜隆起在某些情况下很难与黏膜下肿瘤相鉴别;仅发现黏膜红斑,只能怀疑而不能确定是血管发育不良,更不能确定为出血源;小肠毛细血管扩张所致的出血,若没有选择最佳的检查时机即正处于显性或隐性出血或出血刚结束之时进行检查,一旦等出血停止一段时期血管收缩后就很难发现病灶;而具有临床意义的溃疡与那些微小的、暂时的却无临床意义的黏膜破损较难鉴别等。这势必在一定程度上影响胶囊内镜诊断的准确性,并影响疾病的临床转归。本研究在随访期间,63例(63.6%)胶囊内镜检查结果经手术、其他检查、内镜治疗或特异性药物治疗所验证,最终发现小肠病变假阳性3例(1例CE疑似Crohn病的患者手术证实为回肠憩室;1例CE提示血管瘤、黏膜下肿瘤的患者再行血管造影检查及腹腔镜手术结果为Meckel憩室;1例CE结果为黏膜下肿瘤者术中未见明显肿块)、小肠外病变假阳性1例(CE提示结肠血管畸形,而再出血复查大肠镜结果为痔疮出血并手术后治愈)及假阴性2例(1例CE检查后2月肠穿孔手术发现为空肠T细胞恶性淋巴瘤;1例再出血时复行CE检查提示血管扩张并行手术证实),最终胶囊内镜对该63例患者的确诊率为90.5%(57/63),与Pennazio的研究显示91.1%的确诊率相似^[17]。

经胶囊内镜检出病变的患者,其出血缓解率为70.8%(63/89)。根据胶囊内镜检查结果指导的特异性干预率为50.5%,低于Delvaux研究中77.3%的特异性干预率^[18]。包括手术26例,再出血2例,再出血原因考虑多发血管病变或多发溃疡所致,且手术发现胶囊内镜检查结果假阳性2例,因此胶囊内镜指导病变手术治疗的成功率为84.6%(22/26);内镜下治疗2例均治愈,成功率为100%;特异性药物治疗22例,有效缓解17例,成功率为77.3%。因此特异性治疗总成功率为82%,总体有效干预率为41.4%(41/99),低于Moreno研究结果中胶囊内镜对其检出病变67%的有效干预率而略高于其34.6%的总体有效干预率^[19],高于之前部分研究提示的胶囊内镜对OGIB的25%-32%的有效干预^[17,20]。分析造成差异的原因可能是评判有效干预的标准不同,仅以内镜或手术治疗作为有效影响临床转归的标

准, 则有效干预率降低; 而以胶囊内镜检查后指导的所有治疗措施, 均能使出血停止或贫血纠正为标准, 则有效干预率提高。另外, 我们还发现胶囊内镜对其检出的阳性病变的有效干预率显著高于可疑阳性病变($P<0.05$), 说明胶囊内镜检查对小肠阳性病变即那些高度出血可能的病变的临床转归更有指导价值。

研究显示, OGIB的病变类型以血管发育不良和溃疡多见, 分别占36%及25%^[15]。本研究发现85例小肠病变的检出类型中亦以血管发育不良和疑似Crohn或肿瘤的溃疡病变为主, 分别占34.1%(29/85)和25.9%(22/85), 其次为肿瘤11.8%(10/85), 但针对病变胶囊内镜指导的特异性治疗却以溃疡病变和肿瘤为甚, 通常明确或怀疑肿瘤者予以直接手术治疗, 而结合临床及生化等指标明确或怀疑Crohn病者予以5-氨基水杨酸类、激素或免疫抑制剂治疗, 这两种针对性治疗方法的疗效明确, 因此胶囊内镜对这两类病变的有效干预率可分别达90%和68.2%。而发病类型最高的血管发育不良, 特异性治疗率和有效干预率却较低, 分别为44.8%和31%。主要由于: (1)确诊有一定难度; (2)针对治疗这一病变的药物反应停为老药新用, 他是一种血管生成抑制剂, 小样本研究显示其对治疗血管发育不良作致的消化道出血疗效显著^[21-22], 但此结论尚有待更多的、大规模的临床病例及实验室研究依据加以验证; (3)早期患者尚无特异性药物针对治疗; (4)若予以手术治疗, 则往往由于病变的多发性而导致手术失败, 疗效不佳。另外胶囊内镜对其检出的黏膜下肿瘤病变的指导干预作用最低, 由于此类病变与肠自身蠕动或外压形成的黏膜隆起鉴别困难, 诊断往往不能确定, 致使胶囊内镜难以有效指导进一步治疗措施。本研究8例黏膜下肿瘤者仅2例指导手术, 且其中1例为假阳性, 术中未见明显肿块, 其特异性治疗率和有效干预率仅分别为33.3%和16.7%。

本研究不足之处是研究对象多为异地患者或因联系方式错误而造成失访16例(失访率为13.8%), 随访完成率为86.2%(99/115), 高于Moreno研究的68.4%的随访完成率^[20]。而分析16例失访者的胶囊内镜检出率为87.5%(包括阳性9例、可疑阳性5例及阴性2例), 与纳入研究的99例患者的89.9%的检出率相似。此外本研究中尚有36例经胶囊内镜检出病变的患者只采取一般支持治疗或单纯观察, 未经特异性治疗或相关检查验证其检查结果, 因此有36.4%(36/99)的患者

的胶囊内镜检查结果在随访前后无法得以证实。

胶囊内镜诊断不明原因消化道出血的准确性高(90.5%), 从而能有效指导对疾病的进一步治疗, 并能较大程度地(41.4%)影响这些疾病, 特别是溃疡、肿瘤及血管发育不良所致的不明原因消化道出血的临床转归。

4 参考文献

- 1 Fireman Z, Friedman S. Diagnostic yield of capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding. *Digestion* 2004; 70: 201-206
- 2 Hartmann D, Schilling D, Bolz G, Hahne M, Jakobs R, Siegel E, Weickert U, Adamek HE, Riemann JF. Capsule endoscopy versus push enteroscopy in patients with occult gastrointestinal bleeding. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 377-382
- 3 Voderholzer WA, Ortner M, Rogalla P, Beinholzl J, Lochs H. Diagnostic yield of wireless capsule enteroscopy in comparison with computed tomography enteroclysis. *Endoscopy* 2003; 35: 1009-1014
- 4 Ghosh S, Watts D, Kinnear M. Management of gastrointestinal haemorrhage. *Postgrad Med J* 2002; 78: 4-14
- 5 Adler DG, Knipschild M, Gostout C. A prospective comparison of capsule endoscopy and push enteroscopy in patients with GI bleeding of obscure origin. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 492-498
- 6 戈之铮, 胡运彪, 高云杰, 萧树东. 胶囊内镜的临床应用. *中华消化杂志* 2003; 23: 7-10
- 7 Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Capsule endoscopy and push enteroscopy in the diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1045-1049
- 8 Kalantzis N, Papanikolaou IS, Giannakouloupoulou E, Alogari A, Kalantzis C, Papacharalampous X, Gabriel P, Alexandrakis G, Apostolopoulos P. Capsule endoscopy; the cumulative experience from its use in 193 patients with suspected small bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 414-419
- 9 Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2407-2418
- 10 Maieron A, Hubner D, Blaha B, Deutsch C, Schickmair T, Ziachehabi A, Kerstan E, Knoflach P, Schoefl R. Multicenter retrospective evaluation of capsule endoscopy in clinical routine. *Endoscopy* 2004; 36: 864-868
- 11 Ang TL, Fock KM, Ng TM, Teo EK, Tan YL. Clinical utility, safety and tolerability of capsule endoscopy in urban Southeast Asian population. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2313-2316
- 12 Racz I, Nemeth A, Toth E, Fork FT. Capsule endoscopy in small bowel diagnostics. *Orv Hetil* 2003; 144: 2159-2164
- 13 Malik A, Lukaszewski K, Caroline D, Parkman H, DeSipio J, Banson F, Bazir K, Reddy L, Srinivasan R, Fisher R, Miller L. A retrospective review of enteroclysis in patients with obscure gastrointestinal bleeding and chronic abdominal

■同行评价
本文选题密切结合临床, 分析有理, 数据可信, 有一定的可读性和临床应用价值。

- pain of undetermined etiology. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 649-655
- 14 Van Gossum A. Obscure digestive bleeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 155-174
- 15 Garcia-Compean D, Armenta JA, Gonzalez JA, Maldonado H. Diagnostic utility and clinical impact of capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70: 120-128
- 16 戈之铮, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜与推进式小肠镜诊断不明原因消化道出血的评价. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 223-226
- 17 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
- 18 Delvaux M, Fassler I, Gay G. Clinical usefulness of the endoscopic video capsule as the initial intestinal investigation in patients with obscure digestive bleeding: validation of a diagnostic strategy based on the patient outcome after 12 months. *Endoscopy* 2004; 36: 1067-1073
- 19 Moreno C, Arvanitakis M, Deviere J, Van Gossum A. Capsule endoscopy examination of patients with obscure gastrointestinal bleeding: evaluation of clinical impact. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 10-14
- 20 Rastogi A, Schoen RE, Slivka A. Diagnostic yield and clinical outcomes of capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 959-964
- 21 戈之铮, 徐春红, 刘文忠, 陈海英, 高云杰, 胡运彪, 萧树东. 反应停在治疗血管发育不良所致消化道出血中的作用 - 附7例疗效观察. *胃肠病学* 2006; 11: 8-11
- 22 Bauditz J, Schachschal G, Wedel S, Lochs H. Thalidomide for treatment of severe intestinal bleeding. *Gut* 2004; 53: 609-612

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.

食物不耐受与腹泻型肠易激综合征的关系

张旭东, 邓敏, 李梅, 王晓玲

张旭东, 邓敏, 李梅, 扬州大学临床医学院老年医学科 江苏省扬州市 225001

王晓玲, 扬州大学临床医学院临床检测中心 江苏省扬州市 225001

通讯作者: 张旭东, 225001, 江苏省扬州市南通西路98号, 扬州大学临床医学院老年医学科. zhangxd0448@163.com

电话: 0514-87937511

收稿日期: 2007-09-08 修回日期: 2007-12-20

Food intolerance and diarrhea-dominant irritable bowel syndrome

Xu-Dong Zhang, Min Deng, Mei Li, Xiao-Ling Wang

Xu-Dong Zhang, Min Deng, Mei Li, Department of Geratology, Yangzhou University College of Clinical Medicine, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Xiao-Ling Wang, Clinical Testing Center, Yangzhou University College of Clinical Medicine, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xu-Dong Zhang, Department of Geratology, Yangzhou University College of Clinical Medicine, 98 Nantong Western Road Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. zhangxd0448@163.com

Received: 2007-09-08 Revised: 2007-12-20

Abstract

AIM: To explore the relationship between food intolerance and diarrhea-dominant irritable bowel syndrome (dIBS).

METHODS: In 68 patients with Rome II dIBS, we semi-quantitatively measured specific IgG antibody to 14 food allergens in the serum, then eliminated the corresponding food. After 8 weeks, we observed changes in symptom frequency and disease severity index.

RESULTS: Compared with the normal control group, 48 patients with dIBS appeared positive to at least one food allergen, with a positive rate of 70.6%, and the difference was significant ($P < 0.05$). After 8 weeks diet therapy, clinical symptoms of dIBS were significantly relieved in 29 patients who were positive for >2 food allergens. Also, symptom frequency was significantly reduced from 3.62 ± 1.41 to 1.52 ± 0.62 , and severity index from 3.21 ± 1.50 to 1.39 ± 0.66 .

CONCLUSION: Food intolerance was involved in the pathogenesis of dIBS. According to the level IgG, eliminating the corresponding food can improve the clinical symptoms of dIBS.

Key Words: Food intolerance; Diarrhea-dominant irritable bowel syndrome; Diet therapy

Zhang XD, Deng M, Li M, Wang XL. Food intolerance and diarrhea-dominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3877-3879

摘要

目的: 探讨食物不耐受在腹泻型肠易激综合征(dIBS)发病中的作用。

方法: 对符合罗马标准II的dIBS患者68例, 半定量检测血清中14种食物过敏原特异性IgG抗体。并根据检测结果剔除相应食物治疗8 wk, 观察其症状频率和严重程度指数的变化。

结果: 48例dIBS患者至少对1种过敏原出现阳性反应, 总阳性率为70.6%, 正常对照组2例阳性反应, 阳性率为10%, 两者相比有统计学差异($P < 0.05$)。29例IgG阳性达+2以上的患者完成8 wk饮食治疗, 临床症状明显改善, 症状频率指数(3.62 ± 1.41 vs 1.52 ± 0.62)和严重程度指数(3.21 ± 1.50 vs 1.39 ± 0.66), 均有显著降低。

结论: 食物不耐受确实参与dIBS的发病, 根据食物IgG水平, 剔除相应食物能有效改善dIBS的临床症状。

关键词: 食物不耐受; 腹泻型肠易激综合征; 饮食治疗

张旭东, 邓敏, 李梅, 王晓玲. 食物不耐受与腹泻型肠易激综合征的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15(36): 3877-3879
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3877.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种累及整个消化道的动力障碍性疾病, 可引起反复的上下消化道症状, 包括不同程度的腹

■背景资料

IBS是一类十分常见的胃肠道感觉运动敏感性疾病, 其发病机制比较复杂也未完全阐明。IBS也是最早被发现的可能与食物不耐受有关的疾病, 近年来在欧洲有实验证明IBS是食用特定的食物或调料后的症状。

■研发前沿

食物不耐受是一种复杂的变态反应性疾病。免疫系统把进入人体的某种或多种食物当成有害物质, 产生食物特异性IgG抗体, 引发系统症状与疾病。食物不耐受已经成为各国的研究热点。

■相关报道

近年来国外学者如Atkinson, Whorwell *et al* 都在IBS患者中发现有食物不耐受, 并根据食物特异性IgG抗体检测结果, 制定限制食物计划, 证实其可以有效地控制IBS的症状。

痛、腹胀、便秘或腹泻等。其病因发病机制仍不甚清楚。长期以来, 许多临床医生怀疑IBS可能与饮食有某种程度上的关联。近年来, 国外的研究^[1-2]证实食物不耐受与IBS有关, 而国内的相关报道并不多见, 为了探讨两者的关系, 我们对68例dIBS患者进行了血清14种食物特异性IgG抗体检测, 并根据检测结果剔除相应食物, 观察治疗结果, 以探讨食物不耐受在dIBS发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2006/03-2007/03在本院消化内科就诊的有反复腹痛腹胀腹泻符合罗马II诊断标准的dIBS患者, 无过敏性哮喘偏头痛病史, 1 mo内无口腔溃疡皮肤湿疹, 未使用抗过敏药物和皮质类固醇激素, 结果68例dIBS患者进入研究, 男29例, 女39例, 年龄24-56(平均34.6)岁, 对照组20例, 为健康体检者, 经统计学检验, 两组性别年龄无差异。

1.2 方法

1.2.1 血清食物特异性抗体: IgG的测定: 所有受试者抽血1 mL, 采用美国Biomerica公司生产的食物过敏原检测试剂盒, 半定量检测血清中14种食物过敏原特异性IgG抗体, 按说明书操作。14项检测包括牛肉、鸡肉、鳕鱼、玉米、螃蟹、蘑菇、牛奶、鸡蛋、猪肉、大米、虾、大豆、西红柿和小麦, 针对每种食物原IgG抗体浓度的不同, 可判断为“阴性、轻度、中度、重度”, 并可对检测结果进行分级(表1)。

1.2.2 剔除不耐受食物治疗: 根据食物特异性IgG抗体检测的结果, 对抗体阳性程度中度以上即分级+2以上的dIBS患者给予剔除相应的食物治疗, 除非症状极其严重, 一般不做对症处理, 并在治疗前和治疗后第4周和第8周末对患者进行问卷调查, 评价患者的临床症状变化。

1.2.3 疗效评价: 以症状频率和严重指数作为主要终效观测指标^[3]。其中, 症状严重指数分为1级(无症状)、2级(可感觉到, 但可耐受)、3级(中度, 干扰正常的活动)、4级(影响正常工作)和5级(严重影响正常工作), 取患者全部症状之和的均值作为症状严重指数。症状频率指数分为1级(无)、2级(每周少于1次)、3级(每周少于4次)、4级(几乎每天有, 但每天发作间隔时间长)和5级(每天均有症状, 并且症状发作间隔时间短), 取患者全部症状频率积分之和的均值作为症状的频率指数。总的症状严重度 = 症状严重性指数 × 症状频

表 1 食物抗原不同浓度的IgG抗体

检测值(kU/L)	结果判定	分级
< 50	阴性	0
50 - 100	轻度	+1
100 - 200	中度	+2
> 200	重度	+3

表 2 血清食物特异性IgG的检测结果

分组	n	阳性程度				阳性数 (+2以上)	阳性率 (+2以上)
		0	+1	+2	+3		
对照	20	18	2	0	0	2(0)	10.0%(0)
dIBS	68	20	18	17	13	48(30)	70.6%(44.1%)

率指数, >9时视为严重病例。总的症状改善: 3 = 完全缓解, 偶尔发作也很轻微, 患者不再把症状作为“疾病”信号看待; 2 = 症状缓解, 但发作频率和严重程度均比治疗前降低50%以上; 1 = 症状改善, 发作频率和严重程度均比治疗前降低50%-25%; 0 = 症状无改善或加重。

统计学处理 结果表示为mean ± SD, 采用SPSS9.0统计软件包对结果进行分析, 治疗前后疗效比较用配对t检验, 率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 血清食物特异抗体IgG测定 对68例dIBS患者和20例正常对照进行14项血清食物特异性抗体IgG检测, 68例dIBS患者中, 48例至少对一种食物过敏原出现阳性反应, 总阳性率为70.6%, 正常对照组2例血清呈阳性反应, 阳性率为10%, 两组相比有统计学差异($P < 0.05$, 表2)。

在48例对IgG呈阳性反应的dIBS患者中, 1种IgG阳性8例(16.7%, 8/48), 2种IgG阳性19例(39.6%, 19/48), 多种IgG阳性21例(43.6%, 21/48), 其中1种以上IgG阳性程度, 达中度以上30例(62.5%, 30/48)。正常对照组2例IgG呈阳性反应者均为单一抗体阳性, 且IgG阳性程度均为轻度。48例IgG阳性反应患者临床症状与IgG阳性种类、阳性数及阳性程度无相关性。

2.2 剔除不耐受食物治疗 30例血清食物特异性抗体IgG阳性程度达+2以上的dIBS患者, 依据检测结果, 给予剔除相应的食物治疗。其中1例患者因症状严重服用易蒙停而排除在外。其余29例患者完成8 wk以上的治疗和随访, 最长的1例达半年。绝大部分患者的症状在第4周末即有显

■应用要点

对IBS患者进行食物特异性IgG抗体检测和临床研究, 有助于丰富对IBS发病机制的认识, 丰富经济有效的治疗手段, 有助于开展相关基础研究。

表 3 剔除治疗后dIBS症状的变化($n = 29$)

	治疗率	治疗后	
		4 wk	8 wk
症状频率	3.62 ± 1.41	1.71 ± 0.71	1.52 ± 0.62
严重指数	3.21 ± 1.50	1.55 ± 0.78	1.39 ± 0.66

著改善, 8 wk末总的症状改善情况: 完全缓解9例(31.0%), 症状缓解10例(34.5%), 症状改善6例(20.7%), 症状无改善4例(13.8%), 其中1例大豆不耐受患者在治疗4 wk后症状缓解, 第9周时食用豆类食物, 症状再发。继续治疗后, 症状再度改善。患者治疗后的症状频率和严重程度指数与基础水平相比, 持续下降($P < 0.01$, 表3)。

3 讨论

IBS的病因尚不明确, 普遍认为可能存在多种因素, 目前受到广泛重视的有精神和食物两种因素^[4]。33%-66%的IBS患者被认为有食物不耐受^[5]。随着食物不耐受成为当前各国的研究热点, 其应用正在世界范围内迅速普及。

本研究显示, 与对照组相比, dIBS患者血清食物特异性抗体IgG明显异常, 70.6%的患者至少对1种食物过敏原出现阳性反应。其IgG阳性的种类、阳性数及阳性程度与患者的临床症状未发现相关性。对29例IgG阳性程度达+2以上的患者进行剔除相应食物治疗后发现, 其症状频率和严重指数明显下降, 86.2%患者的临床症状不同程度的缓解, 且观察到1例患者在症状缓解, 复食阳性食物后, 症状再发。继续剔除治疗后, 症状再度改善。

有关食物不耐受的产生机制仍然存在分歧, 但其存在的事实及产生的后果是公认的。理论上食物进入消化道后, 被消化分解至氨基酸甘

油和单糖水平, 才能完全转化为能量供人体所需。但事实并非如此, 许多食物因缺少相应的酶无法被人体完全吸收, 而以多肽或其他分子形式进入肠道, 被机体作为外来物质识别, 产生食物特异性的IgG抗体, 导致机体对进入人体内的某种或多种食物产生过度保护性免疫反应。

临床实践也发现, 部分急性肠道感染患者在病愈后出现IBS症状, 即所谓“痕迹反应”。由于急性肠道感染破坏了肠道的正常黏膜屏障, 加速食物抗原进入机体, 从而产生食物特异抗体IgG, 并导致后续的IBS症状。食物不耐受可导致除消化以外的多系统临床症状^[5], 包括皮肤, 神经, 呼吸, 肌肉, 骨骼等。而IBS患者亦常常同时伴有多种肠外表现。

国外的研究^[6-7]证实, 根据食物IgG排除相应食物, 特别是IgG高滴度阳性的食物, 能够有效的减轻IBS症状。食物不耐受确与IBS的发病有关, 根据食物特异性IgG抗体检测结果, 制定限制食物计划, 可以有效地控制IBS的症状, 提高患者的生活质量, 值得进一步研究推广。

4 参考文献

- 1 Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M. Food allergy in irritable bowel syndrome: new facts and old fallacies. *Gut* 2004; 53: 1391-1393
- 2 Alternative approach to IBS and migraine is winning over providers. *Dis Manag Advis* 2004; 10: 6-10, 1
- 3 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征. *中国医学科学院学报* 2003; 25: 74-78
- 4 柯美云, 周吕. 胃肠动力学-基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999: 736-751
- 5 谢志贤, 刘倩. 食物不耐受与相关性疾病. *中华内科杂志* 2006; 45: 150-151
- 6 Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, Whorwell PJ. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut* 2004; 53: 1459-1464
- 7 Whorwell P, Lea R. Dietary Treatment of the Irritable Bowel Syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2004; 7: 307-316

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

■同行评价
本文立题有根据, 诊断与实验方法规范, 统计正确, 结果可靠, 讨论简洁, 条理性强, 难度一般, 有一定的可读性。

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹志成 院士

香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈红松 副研究员

北京大学人民医院、北京大学肝病研究所

陈积圣 教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈克能 主任医师

北京大学临床肿瘤学院暨北京肿瘤医院胸一科

程树群 教授

上海东方肝胆外科医院肝胆外科

邓长生 教授

武汉大学中南医院消化内科

丁惠国 教授

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

董明 教授

中国医科大学附属第一医院普通外科

杜雅菊 主任医师

哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化所

房林 副教授

上海市第十人民医院普外科

关晓辉 主任医师

吉林北华大学附属医院消化内科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

匡安仁 教授

四川大学华西医院核医学科

李靖 副教授

第三军医大学新桥医院肝胆外科

李旭 副教授

广州南方医院急诊科消化内科

李瑗 主任医师

广西肿瘤研究所肿瘤实验病理科

刘正稳 教授

西安交通大学医学院第一附属医院内科

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

秦波 教授

重庆医科大学附属第二医院感染病科

沈柏用 副教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

沈琳 主任医师

北京大学临床肿瘤医院消化内科

唐文富 主治医师

四川大学华西医院中西医结合科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

许玲 副教授

第二军医大学长征医院中医科

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

张声生 教授

北京首都医科大学附属北京中医医院消化中心

朱传武 副主任医师

苏州市第五人民医院传染科