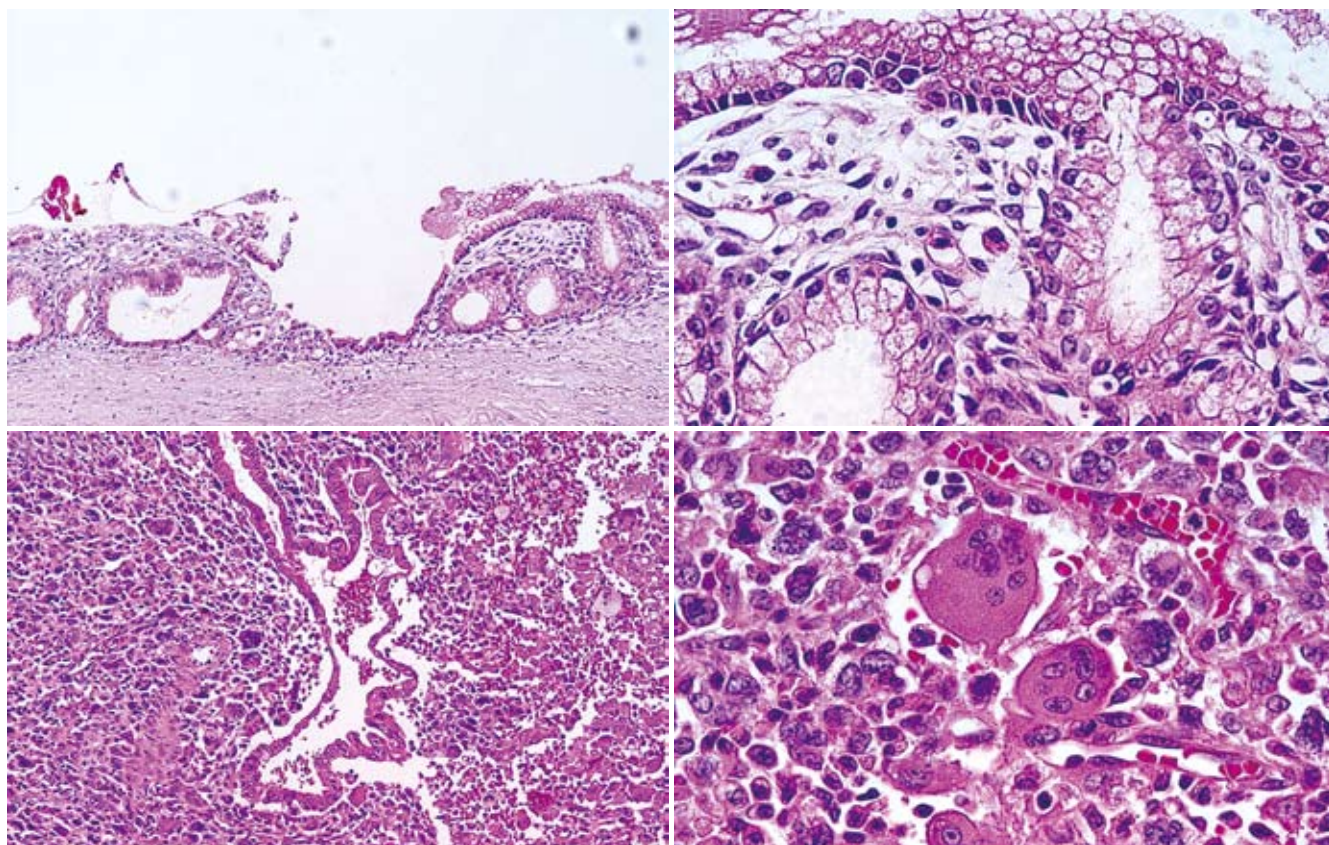


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年1月8日 第16卷 第1期 (Volume 16 Number 1)



1 / 2008

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

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
栾新明教授
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
陈凜教授
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·复合丁教授
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
阴赫宏研究员
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 ●

2008年1月8日

第16卷

第1期

(总第225期)

述 评	1	直肠癌腹会阴联合根治术后会阴切口临床处理进展 傅红, 黄恺, 史向军
	5	抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性 白茵, 赵桂珍
基础 研究	10	梗阻性黄疸对大鼠肾脏AQP-3表达的影响 张德巍, 李云飞, 王勇, 王晟, 孟相真, 刘金钢
	15	黄芪多糖对LPS损伤小肠上皮细胞的保护作用 袁媛, 孙梅
	20	Dickkopf-1克隆及其抗结肠癌作用 李甲初, 左渝平, 刘洋, 曾昭淳
	25	阿泰宁对牛结肠黏膜蛋白诱发大鼠免疫性溃疡性结肠炎的治疗作用 王文杰, 王霖, 刘洋, 彭珊瑚, 张弗盈, 李萍, 万阜昌, 崔云龙
	33	丹皮酚对人大肠癌HT-29细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制 计春燕, 谭诗云, 刘长青
	39	RNA干扰供体大鼠库普弗细胞B7分子表达对受体大鼠淋巴细胞激活的影响 李涛, 朱继业, 柳枫, 冷希圣
	45	IL-6体外对PC12细胞株DA和NE代谢抑制的机制 李荣, 王杰军, 沈毅珺, 吴欣, 王妙苗, 王喜, 何晓静
文 献 综 述	50	乙型肝炎病毒X蛋白与原发肝癌 侯全玲, 唐红, 黄飞骏
	56	胰腺癌的生物治疗研究进展 王国江, 高泽立
	62	结直肠癌血管形成、侵袭和转移的研究进展 施凉潘, 潘运龙
	68	代谢组学分析技术及其在消化道肿瘤中的应用进展 洪静, 陈金联
研 究 快 报	76	肝癌基因谱动态表达及HSPgp96异常的临床价值 吴信华, 姚登福, 苏小琴, 黄华, 邱历伟, 吴玮
	81	Bad、Bax和Bid蛋白表达在非酒精性脂肪性肝炎中的作用 南月敏, 胡云龙, 付娜, 吴文娟
临 床 经 验	86	pH值监测正常与异常的内镜阳性GERD患者的食管动力学比较 冯桂建, 赵丽莉, 刘玉兰
	90	急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血200例 李坪, 成军, 毛羽, 胡居龙, 蒋煜
	94	胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性的变化 李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉
	98	内镜下射频消融联合药物治疗幽门螺杆菌阴性的成熟型疣状胃炎56例 王志红, 石振旺, 姚莉
	101	心理干预对国内慢性乙型肝炎患者焦虑抑郁情绪影响的荟萃分析 张耀, 周吉军, 王宇明
	105	体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应

	贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉
附 录	109 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	114 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	9 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 14 世界华人消化杂志在线办公系统 19 中国学术期刊综合引证报告(2007) 24 世界华人消化杂志2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果 32 《世界华人消化杂志》简介 38 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 2008年对同行评议将开始实行公开策略 49 世界华人消化杂志的同行评价 55 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 61 世界华人消化杂志个性化服务订购活动 67 <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 75 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 80 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 85 <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 93 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版 97 <i>WJG</i> 2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果
封面故事	Kenichi Hakamada, Takuya Miura, Akitoshi Kimura, Masaki Nara, Yoshikazu Toyoki, Shunij Narumi, Mutsuo Sasak. Anaplastic carcinoma associated with a mucinous cystic neoplasm of the pancreas during pregnancy: Report of a case and a review of the literature. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(1): 132-135 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/132.asp
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 李文编辑; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志

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 2008-01-08
 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: wjcd@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: wjcd@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: wjcd@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://wjcd.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。

2008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** 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证
 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期24.00元 全年864.00元 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

January 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 1

EDITORIAL	1 State-of-the-art clinical management of perineal wounds after abdominoperineal resection for rectal cancer <i>Fu H, Huang K, Shi XJ</i> 5 Importance of antiviral therapy for chronic hepatitis B <i>Bai H, Zhao GZ</i>
BASIC RESEARCH	10 Renal aquaporin-3 expression in rats with obstructive jaundice <i>Zhang DW, Li YF, Wang Y, Wang S, Meng XZ, Liu JG</i> 15 Mechanism of impact of <i>Astragalus mongholicus</i> polysaccharides on lipopolysaccharide-induced damage in intestinal epithelial cells <i>Yuan Y, Sun M</i> 20 Anti-colon carcinoma mechanism of cloned Dickkopf-1 cDNA <i>Li JC, Zuo YP, Liu Y, Zeng ZC</i> 25 Therapeutic effects of Ataining on immune ulcerative colitis induced by calf colonic mucosal protein in rats <i>Wang WJ, Wang L, Liu Y, Peng SY, Zhang FY, Li P, Wan FC, Cui YL</i> 33 Effects of paeonol on apoptosis and proliferation of HT-29 cells and its molecular mechanism <i>Ji CY, Tan SY, Liu CQ</i> 39 Effect of RNA interference B7 expression of donor rat Kupffer cells on activation of recipient rat lymphocytes <i>Li T, Zhu JY, Liu F, Leng XS</i> 45 <i>In vitro</i> effect of interleukin-6 on the synthesis of DA and NE in PC12 cell line and the related signal transduction <i>Li R, Wang JJ, Shen YJ, Wu X, Wang MM, Wang X, He XJ</i>
REVIEW	50 Hepatitis B virus X protein and hepatocellular carcinoma <i>Hou QL, Tang H, Huang FJ</i> 56 Advances in biological therapy for pancreatic cancer <i>Wang GJ, Gao ZL</i> 62 Advanced insights into angiogenesis, invasion and metastasis in colorectal carcinoma <i>Shi LP, Pan YL</i> 68 Technology of metabonomics and their application in gastrointestinal cancer <i>Hong J, Chen JL</i>
RAPID COMMUNICATION	76 Dynamic expression of entire hepatic genomes and heat-shock protein gp96 abnormality during development of hepatocellular carcinoma <i>Wu XH, Yao DF, Su XQ, Huang H, Qiu LW, Wu W</i> 81 Novel effect of the proapoptotic proteins Bad, Bax and Bid in non-alcoholic steatohepatitis <i>Nan YM, Hu YL, Fu N, Wu WJ</i>
CLINICAL PRACTICE	86 Comparison of esophageal motility between patients with endoscope-positive gastroesophageal reflux disease with normal pH and those with abnormal pH <i>Feng GJ, Zhao LL, Liu YL</i>

	<p>90 Endoscopic therapy of 200 patients with acute gastro-esophageal variceal bleeding <i>Li P, Cheng J, Mao Y, Hu JL, Jiang Y</i></p> <p>94 Changes in microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions <i>Li YL, Zhou LP, Wang YC, Fu BY</i></p> <p>98 Radio-frequency ablation combined with drug therapy for mature verrucosa gastritis without <i>Helicobacter pylori</i> infection: an analysis of 56 cases <i>Wang ZH, Shi ZW, Yao L</i></p> <p>101 Effects of psychotherapy on depression and anxiety of patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis <i>Zhang Y, Zhou JJ, Wang YM</i></p> <p>105 Activity of dendritic cells modified by joint antigen <i>He ZB, Yang WM, Jiao BT, Song H</i></p>
APPENDIX	109 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	114 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Hakamada K, Miura T, Kimura A, Nara M, Toyoki Y, Narumi S, Sasaki M.</i> Anaplastic carcinoma associated with a mucinous cystic neoplasm of the pancreas during pregnancy: Report of a case and a review of the literature. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(1): 132-135 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/132.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</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 January 8, 2008

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@wjcdnet.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@wjcdnet.com
<http://www.wjcdnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspa-
pers 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

© 2008 Published by *WCJD*. All rights re-
served; 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, re-
cording, or otherwise without the prior per-
mission of *WCJD*. Authors are required to
grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal repre-
sent 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 © 2008 by Editorial Department
of *World Chinese Journal of Digestology*

直肠癌腹会阴联合根治术后会阴切口临床处理进展

傅红, 黄恺, 史向军

傅红, 黄恺, 史向军, 复旦大学附属肿瘤医院腹部外科 复旦大学上海医学院肿瘤学系 上海市 200032
傅红, 教授, 主要从事胃肠肿瘤, 肝胆胰肿瘤, 软组织肿瘤和恶性黑色素瘤的外科治疗, 尤其擅长复杂疑难软组织肿瘤和恶性黑色素瘤的手术及综合治疗。
通讯作者: 傅红, 200032, 上海市徐汇区东安路270号, 复旦大学附属肿瘤医院腹部外科. drfh1805@126.com
电话: 021-64175590-2605 传真: 021-64175242
收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-12-17

State-of-the-art clinical management of perineal wounds after abdominoperineal resection for rectal cancer

Hong Fu, Kai Huang, Xiang-Jun Shi

Hong Fu, Kai Huang, Xiang-Jun Shi, Department of Abdominal Surgery, Cancer Hospital of Fudan University, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China
Correspondence to: Hong Fu, Department of Abdominal Surgery, Cancer Hospital of Fudan University, 270 Dongan Road, Xuhui District, Shanghai 200032, China. drfh1805@126.com
Received: 2007-07-13 Revised: 2007-12-17

Abstract

Perineal wounds after abdominoperineal resection for rectal cancer are associated with impaired healing capacity, secondary to local defects and complications. To date, primary closure of the perineum and insertion of perineal drainage and irrigation is commonly used, but sometimes local morbidity and lack of wound healing occurs. In this situation, wide exposure is required and the duration of hospital stay is prolonged. Various pedicle musculocutaneous flaps, such as gluteal and gracilis flaps, with local tamponade of the wound defect and reconstruction, may be an efficient way to manage non-healing perineal wounds and local reconstruction. This method significantly decreases the incidence of postoperative wound complications, shortens healing time, and can be used selectively. Pedicle gracilis flaps are preferred, but require careful mobilization and perfect surgical skills.

In this report, we summarize various techniques for the management of perineal wounds and their progression, and aim to obtain a better outcome for patients who are already suffering from artificial anus and the subsequent pain of perineal wounds.

Key Words: Rectal cancer; Abdominoperineal resection; Perineal wound; Pedicle musculocutaneous flaps

Fu H, Huang K, Shi XJ. State-of-the-art clinical management of perineal wounds after abdominoperineal resection for rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 1-4

摘要

直肠癌经腹会阴联合切除术后, 会阴部往往留有较大腔隙, 骶前积液、感染和引流不畅等局部并发症发生率高, 会阴切口不易愈合, 尤其是术前接受化疗患者。目前临床上多采用一期缝合会阴切口和会阴部引流的方法, 而难愈性会阴伤口临床处理颇为棘手。移植肌皮瓣填塞技术在难愈性会阴伤口的处理与会阴部缺损重建上较有优势, 可选择性应用。一般以股薄肌(皮)瓣为首选, 但手术操作较复杂。结合作者的临床实践与国内外文献, 就会阴部伤口的处理方法的演进和效果作一综述。

关键词: 直肠癌; 腹会阴联合根治术; 难愈性会阴伤口; 移植肌皮瓣填塞

傅红, 黄恺, 史向军. 直肠癌腹会阴联合根治术后会阴切口临床处理进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 1-4
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1.asp>

0 引言

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 在西方发达国家其发病率居恶性肿瘤谱的第2位。在我国, 随着经济发展、饮食习惯的改变, 其发病率日渐增高, 已跃居3-4位。一般认为距肛7 cm以内直肠癌需行经腹会阴联合根治术(abdominal perineal resection, APR)。尽管低位吻合技术, 对限于黏膜内、分化好的病变局部切除术的运用, 使APR指

背景资料
直肠癌腹会阴联合根治术后, 会阴切口的临床处理是一个比较棘手的问题, 国内多采用一期缝合、会阴填塞的方法, 对难愈性会阴切口缺乏较好的处理方法。

相关报道

美国明尼苏达大学大肠外科 Bullard 2006年报道, 直肠癌特别是行术前新辅助化疗者, 腹会阴联合切除术后, 一期缝合会阴部伤口愈合更为困难, 建议对难愈性会阴伤口采用其他替代方法如转移肌皮瓣等。

征有所缩小^[1], 但APR仍是直肠癌最常用的术式之一。标准APR术切除范围, 包括肿瘤所在一定距离的肠段及其系膜全部淋巴结、肛提肌、坐骨直肠窝内的脂肪、肛管和肛门周围约6 cm直径的皮肤及全部肛门括约肌^[2]。骶前与会阴部留有较大腔隙, 切口不易愈合, 并产生诸多并发症如感染、积液、疼痛、发热和坐行困难等, 患者痛苦和负担较重。自Miles创立APR术式以来, 许多专家设计出各种方法以促进术后会阴切口愈合, 改善患者术后生活质量。本文简介并评述目前国内外常见的处理方法。

1 APR术后会阴切口处理的历史演进

1908年Miles创立直肠癌经APR后, 就开始有各种改善会阴切口愈合的尝试。最初12例患者, Miles采用会阴皮肤一期缝合, 并在切口前后置粗引流管, 但1例因小肠袢穿过盆底腹膜形成绞窄性内疝而死亡^[2]。1914年Miles改为会阴残隙开放填塞, 减少并发症的同时还有填塞止血的效果, 虽然减少了感染等伤口并发症, 但愈合时间延长、患者会阴部不适感严重并且敞开口同样可能发生其他并发症^[3]。1942年Cattel摒弃了会阴填塞法, 同时Crile和Robnett报道了采用会阴切口一期缝合, 潘氏管经会阴切口中央引流, 之后陆续有回顾性和前瞻性研究比较一期缝合会阴切口、部分缝合和填塞的效果^[4]。1960年Burge采用一期关闭会阴切口并从两旁皮肤闭式引流^[5]。1974年Schwab采用会阴一期缝合加双腔管灌洗获得良好效果。1984年Lieberman *et al*报道了一期缝合会阴切口同时腹腔引流管持续盆腔骶前冲洗, 会阴伤口3 wk内愈合率达85.5%^[4]。目前会阴切口的处理, 一期缝合逐渐成为主要方法, 一期愈合率在45%, 但疗效报道差异很大。骶前死腔是愈合失败的主要原因。

1970年Ruckley以带血管蒂大网膜经左结肠旁沟骶前填充死腔, 一期缝合会阴切口, 效果良好。但Marks *et al*重复后失败。Irvin认为此法并无特别优点^[6-8]。1974年Silen分析直肠切除术后盆底腹膜下降、尿生殖器官向后下移位脱垂、臀部软组织向上生长移位会在会阴愈合过程中起重要作用, 特别是前两者, 尤以盆底腹膜下降的作用最为重要。填塞法干扰盆底腹膜的下降, 不利于会阴切口愈合而一期缝合负压吸引可促进盆底腹膜下降^[9-10]。1966年Watts将难愈性会阴切口定义为术后6 mo仍未愈合切口, 发生率为7%, 常规清创、冲洗、再次缝合、切除骶尾骨不易获得

良好的效果。1975年Bartholdson用股薄肌皮瓣行会阴重建^[11-13]。1976年Shaw用下1/3臀大肌皮瓣填塞会阴^[14]。1980年Hurwitz用臀股肌皮瓣覆盖会阴缺损。1981年Mathes用腹直肌肌瓣经腹填充会阴。Tei *et al*用腹直肌肌瓣对局部复发肛管癌APR术后会阴部缺损行一期重建修复, 术后中位住院时间17 d, 会阴伤口并发症发生率很少^[15]。2004年纽约纪念肿瘤中心的一项队列研究结果表明行术前盆腔照射的直肠肛管癌患者APR术后, 腹直肌皮瓣重建修复会阴伤口与未行肌瓣修复, 伤口并发症发生率为15.7% vs 44.1% ($P = 0.03$)^[16]。难愈性会阴伤口易发生于术前行新辅助化疗者、肿瘤外侵严重或已有远处转移、术中输血者、吸烟者以及发生会阴伤口并发症者^[17-18]。难愈性会阴切口行一期填塞肌瓣可获明显疗效^[15-16, 19]。

2 常见APR术后会阴切口处理方法

2.1 一期缝合

APR术时关闭盆底腹膜, 一般主张一期缝合会阴切口^[20], 骶前引流管会阴切口两侧皮肤引出, 关闭会阴切口负压吸引5-7 d, 引流量少于20 mL时拔出。但此术式仍有一些问题需要探讨: (1)盆底腹膜关闭与否: 大多数人主张关闭盆底腹膜, 以防止小肠坠入盆底引起内疝及肠梗阻。Atemler强调盆底重建十分重要^[4]。Irvin认为盆底腹膜与骶前间隙积血(液)是愈合主要障碍, 负压吸引并无太大效果, 并设想不缝合盆底腹膜, 让小肠坠入盆底充填骶前间隙, 但此法易致骶前感染, 甚至蔓延至腹腔^[21]。(2)单纯引流与负压吸引: Miles术后骶前积液是会阴切口不愈的重要因素。引流可减少积液及脓肿的形成, 一期缝合后引流管接负压引流器。我们认为应提倡闭式负压吸引^[20-21]。负压吸引使盆腔内腹膜、会阴壁、尿生殖器官向中央靠拢, 并缩小骶前死腔体积, 且用吸力较小吸引管, 患者术后疼痛也较轻。无负压单纯吸引不能除尽积液渗液, 不利于坏死组织排出。(3)盆腔灌洗: 可用两根单管从会阴切口两旁引出或一根双套管, 生理盐水加庆大霉素循环灌洗, 清除坏死组织与积液以利愈合。Schwab应用此法会阴切口一期愈合率为100%, 国内90%, 明显优于单纯引流。Hartz比较Miles'术后会阴一期缝合负压与盐水灌洗, 术后3 mo愈合率分别为88%、87%, 差异无统计意义^[22]。

2.2 会阴填塞

完成腹和会阴部手术, 缝合盆底腹膜, 填塞骶前间隙, 不关闭或部分关闭会阴切口,

创新盘点

本文着重讨论直肠癌腹会阴联合根治术后会阴切口的临床处理, 难愈性会阴切口的移植肌皮瓣填塞法, 而此法在国内报道不多。

体外留有部分填塞物引流. 常用填塞物有多种, 如碘仿纱布条和纱布垫等, 亦可浸石蜡油或包裹一层橡胶膜, 或装入剪去指套的橡胶手套防止填塞物粘连盆底. 一般术后2-3 d拔除, 并以洗必泰和高锰酸钾液等冲洗会阴伤口. 术后8-9 d, 拔除尿管后即可坐浴, 也可采取长期更换填塞物至切口愈合的方法.

会阴填塞能支持盆底腹膜, 亦有止血、引流、促进盆壁肉芽生长的效果^[20-22]. 缺点是患者有不适感, 易引起盆腔感染, 需长期住院护理. 该法主要适用于盆腔止血不满意、术中肉眼见粪便污染、肿瘤较大外侵严重, 会阴创口较大不易缝合和切除部分阴道和尾骨尖.

一期缝合和填塞法的优劣, Delaland将行Miles'术的患者234例随机分为两组, 发现术后1 mo会阴伤口一期愈合率前组明显高于后组(30% vs 10%)($P<0.01$), 3 mo后无明显差别, 但前组会阴血肿、脓肿出现率高于后组($P<0.01$). 我们强调, 一期缝合如因局部并发症而重新敞开会阴, 愈合效果仍好于后组. 重新敞开会阴, 通常间隙已经很小, 多可在3 mo内顺利愈合^[23].

2.3 带血管蒂大网膜骶前移植 完成腹和会阴部手术后, 切断乙状结肠前游离大网膜, 断大网膜血管弓向胃的分支, 以胃网膜右血管为蒂轴, 从横结肠上剪下附着的大网膜并延长, 将已分离的大网膜穿过横结肠系膜根部, 沿后腹膜延伸游离至骶前, 将大网膜无血管区与后腹膜缝合固定.

通常认为大网膜有丰富的动静脉和淋巴管网, 有分泌和吸收功能, 移动大, 附着力强, 有良好吸收和抗感染能力. 游离大网膜填塞盆腔间隙前创口, 消灭盆腔死腔, 减少局部渗出和感染, 但实际运用此法并未见特别的优越性. Ruckly应用此法, 2 mo一期愈合率为60%, 3-5 mo为88%^[24]. 以后发现此法存在不可避免的缺点, 并不适合于所有的患者, 如大网膜解剖变异, 腹腔疾病或既往手术原因变得较短, 无法送达骶前间隙, 伴有血管疾病也不适合移植. 也有大网膜坏死的报道, 一旦发生必须再次剖腹手术. 另外, 在肿瘤已有部分侵透浆膜层时, 大网膜可能已粘染脱落的癌细胞, 可能引起骶前复发^[22].

2.4 移植肌皮瓣填塞会阴 对难愈性会阴切口, 采取转移肌(皮)瓣的方法, 明显优于常规的清创、冲洗、再次缝合、切除尾骨和远端骶骨等方法. 1999年David在接受术前、术中放疗的复发直肠癌患者中, 用转移性股薄肌肌瓣填塞骶前死腔,

与一期缝合相比, 前者再住院或再手术的几率为12%, 而后者为46%. 2004年上海复旦大学肿瘤医院在中日韩大肠癌会议上报道, 采用该改良方法转移肌薄肌肌瓣一期修复骶前会阴, 7例患者会阴伤口平均术后17 d一期愈合, 而填塞对照组平均98 d($P<0.01$). 其中1例女性患者, 合并阴道后壁切除, 采用该肌一期阴道成型, 现已术后4年, 无瘤生存. 目前认为接受术前、术中放疗, 直肠癌术后复发以及肿瘤外侵严重, 会阴切口较大时应首选该法^[20-22], 但手术操作稍复杂.

转移性肌(皮)瓣的意义在于: (1)填塞骶前间隙、缩小死腔. (2)转移的肌(皮)瓣可提供充足的血氧以提高局部的含氧量. (3)提供抗感染的白细胞^[22]. 由于直肠癌Miles'术后会阴部皮肤缺损较少出现, 带蒂肌(皮)瓣的运用相对较少. 肌(皮)瓣的选择要充分考虑以下因素: 肌(皮)瓣的可用性、骶前间隙及皮肤缺损的大小, 此外尚须考虑术中患者的体位, 如腹直肌肌瓣只适用于截石位, 臀大肌肌(皮)瓣只适用于俯卧位, 股薄肌及臀股肌皮瓣可用于任体位. 如果该肌的血供受到影响, 则不应使用, 另外术者的水平与手术入路也限制肌(皮)瓣的应用. 目前应用的主要是以下四种肌(皮)瓣: (1)股薄肌(皮)瓣应用于该手术最早、最广. 该肌的主要营养血管多起源于股深动脉, 偶起于旋股内侧动脉, 但血管行径非常恒定. 股薄肌在功能上不太重要, 切取后临床上无明显功能障碍. 供区可一期缝合. 股薄肌肌瓣血供可靠. 尽管转移性股薄肌肌(皮)瓣手术较复杂, 只要操作得当很少失败^[20]. 股薄肌表面的皮肤易撕脱且面积较小, 运用后机体进入会阴深面受限, 所以肌皮瓣运用较少; (2)臀大肌肌(皮)瓣, 臀大肌血供来自髂内动脉分支的臀上和臀下动脉. 臀下动脉供下1/3的肌肉, 其余上2/3臀大肌用于保持原有的功能, 一般用下1/3肌肉, 臀大肌功能不受影响. 如切取较大的肌皮瓣, 供区的皮肤往往不能一期缝合, 尚须以阔筋膜张肌肌皮瓣覆盖供区缺损^[25]; (3)腹直肌肌(皮)瓣, 腹直肌血供来自腹壁上、下动脉. 该肌肌(皮)瓣旋转角度大, 手术操作较易, 肌(皮)瓣的生存能力强, 但必须在腹会阴联合入路时使用. 该技术并发症较多, 1/3患者需再次手术处理并发症. 转移该肌皮瓣的另一并发症是腹外疝, 发生率2%. 预防此症关键是严格关闭腹直肌前鞘^[20-24]; (4)臀股肌皮瓣, 臀股肌皮瓣血供来自臀下动脉, 供应下部臀大肌后, 成为支配后部大腿的皮支. 该肌皮瓣较厚且皮肤宽大, 能很好填塞会阴死腔, 特

名词解释
难愈性会阴切口: 直肠癌或肛管癌经腹会阴切除术后, 会阴部伤口术后6 mo仍未愈合, 多发生于术前放疗, 肿瘤外侵严重, 术中输血以及术后会阴伤口并发症.

同行评价
本文内容详实, 论述充分, 层次清楚, 有一定的参考价值。

别适用面积较大皮肤缺损的会阴切口。其末端皮瓣可安全折叠, 采用此皮瓣进行阴道再造, 获得良好的效果。不利的是常伴有数周的坐骨区疼痛, 这可能与皮神经的切断有关^[25]。

3 结论

一期缝合会阴切口仍是直肠癌Miles'术后的主要选择, 效果肯定。填塞法是一种很安全的会阴切口方法, 但愈合时间长, 患者痛苦较大, 医疗费用高。带血管蒂大网膜移植骶前的方法并不值得推崇。移植肌皮瓣填塞会阴的方法可以选择的应用, 一般以股薄肌(皮)瓣为首选, 熟练使用后, 手术操作并不复杂, 尤其适用于肿瘤较大, 外侵严重, 术前接受过放化疗以及术时会阴缺损较大者, 对阴道后壁受侵切除者, 可同期一期阴道成型。

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第2版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 776-814
- 2 Miles WE. A method of performing abdominoperineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon (1908). *CA Cancer J Clin* 1971; 21: 361-364
- 3 Bullard KM, Trudel JL, Baxter NN, Rothenberger DA. Primary perineal wound closure after preoperative radiotherapy and abdominoperineal resection has a high incidence of wound failure. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 438-443
- 4 Lieberman RC, Feldman S. Primary closure of the perineal wound with closed continuous transabdominal pelvic irrigation after rectal excision. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 526-528
- 5 Burge H, Tompkin AM. The perineal wound after excision of the rectum. *Postgrad Med J* 1960; 36: 519
- 6 Marks CG, Leighton M, Ritchie JK, Hawley PR. Primary suture of the perineal wound following rectal resection for adenocarcinoma. *Br J Surg* 1976; 63: 322-326
- 7 Ruckley CV, Smith AN, Balfour TW. Perineal closure by omental graft. *Surg Gynecol Obstet* 1970; 131: 300-302
- 8 Irvin TT, Goligher JC. A controlled clinical trial of three different methods of perineal wound management following excision of the rectum. *Br J Surg* 1975; 62: 287-291
- 9 Silen W, Glotzer DJ. The prevention and treatment of the persistent perineal sinus. *Surgery* 1974; 75: 535-542
- 10 Watts JM, de Dombal FT, Goligher JC. Long-term complications and prognosis following major surgery for ulcerative colitis. *Br J Surg* 1966; 53: 1014-1023
- 11 Kasper R. Persistent perineal sinus. *Surg Clin North Am* 1984; 64: 761-768
- 12 Altmeier WA, Culbertson WR, Alexander JW, Tutorius D, Bossert J. Primary closure and healing of the perineal wound in abdominoperineal resection of the rectum for carcinoma. *Am J Surg* 1974; 127: 215-219
- 13 Bartholdson L, Hulten L. Repair of persistent perineal sinuses by means of a pedicle flap of musculus gracilis. Case report. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1975; 9: 74-76
- 14 Shaw A, Futrell JW. Cure of chronic perineal sinus with gluteus maximus flap. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 147: 417-420
- 15 Tei TM, Stolzenburg T, Buntzen S, Laurberg S, Kjeldsen H. Use of transpelvic rectus abdominis musculocutaneous flap for anal cancer salvage surgery. *Br J Surg* 2003; 90: 575-580
- 16 Chessin DB, Hartley J, Cohen AM, Mazumdar M, Cordeiro P, Disa J, Mehrara B, Minsky BD, Paty P, Weiser M, Wong WD, Guillem JG. Rectus flap reconstruction decreases perineal wound complications after pelvic chemoradiation and surgery: a cohort study. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 104-110
- 17 Artioukh DY, Smith RA, Gokul K. Risk factors for impaired healing of the perineal wound after abdominoperineal resection of rectum for carcinoma. *Colorectal Dis* 2007; 9: 362-367
- 18 Christian CK, Kwaan MR, Betensky RA, Breen EM, Zinner MJ, Bleday R. Risk factors for perineal wound complications following abdominoperineal resection. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 43-48
- 19 Mathes SJ. Clinical Application for Muscle and Musculocutaneous Flaps. St Louis, C.V. Mosby, 1982
- 20 Shibata D, Hyland W, Busse P, Kim HK, Sentovich SM, Steele G Jr, Bleday R. Immediate reconstruction of the perineal wound with gracilis muscle flaps following abdominoperineal resection and intraoperative radiation therapy for recurrent carcinoma of the rectum. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 33-37
- 21 Robles Campos R, Garcia Ayllon J, Parrila Paricio P, Cifuentes Tebar J, Lujan Mompean JA, Liron Ruiz R, Torralba Martinez JA, Molina Martinez J. Management of the perineal wound following abdominoperineal resection: prospective study of three methods. *Br J Surg* 1992; 79: 29-31
- 22 单吉贤, 王舒宝, 陈峻青. 直肠癌Miles术后会阴切口缝合并发症处理体会. *中国实用外科杂志* 1993; 13: 39-40
- 23 Delalande JP, Hay JM, Fingerhut A, Kohlmann G, Paquet JC. Perineal wound management after abdominoperineal rectal excision for carcinoma with unsatisfactory hemostasis or gross septic contamination: primary closure vs. packing. A multicenter, controlled trial. French Association for Surgical Research. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 890-896
- 24 Baird WL, Hester TR, Nahai F, Bostwick J 3rd. Management of perineal wounds following abdominoperineal resection with inferior gluteal flaps. *Arch Surg* 1990; 125: 1486-1489
- 25 Loessin SJ, Meland NB, Devine RM, Wolff BG, Nelson H, Zincke H. Management of sacral and perineal defects following abdominoperineal resection and radiation with transpelvic muscle flaps. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 940-945

编辑 李军亮 电编 何基才

抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性

白 菡, 赵桂珍

白菡, 赵桂珍, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

赵桂珍, 教授, 博士生导师, 主要从事病毒性肝炎防治的研究。
通讯作者: 赵桂珍, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. baihan910@163.com
电话: 024-83956961 传真: 024-83955089
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-11-28

Importance of antiviral therapy for chronic hepatitis B

Han Bai, Gui-Zhen Zhao

Han Bai, Gui-Zhen Zhao, Department of Infectious Disease, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Gui-Zhen Zhao, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. baihan910@163.com
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-11-28

Abstract

The persistent duplication of HBV is closely related to the progression of chronic hepatitis B and the occurrence of liver cirrhosis and hepatoma. HBV load is associated with a serious degree of liver disease. Therefore, inhibiting virus replication and repressing virus load are most important in blocking the progress of liver disease and increasing the quality of life of patients. Here, we summarized the consensus and progress in antiviral therapy of hepatitis B. We investigated some hot questions and analyzed problems concerning antiviral therapy in China.

Key Words: Chronic hepatitis B; Antiviral therapy; Gene therapy

Bai H, Zhao GZ. Importance of antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 5-9

摘要

慢性乙型肝炎患者肝脏炎症的持续发展, 肝硬化和肝癌的发生与乙型肝炎病毒的持续性复制密切相关. 患者体内的乙型肝炎病毒载量与肝脏疾病的严重程度成正相关. 所以在慢性乙型肝炎的治疗中, 抑制病毒复制, 降低病毒载

量, 是阻断患者病情发展, 提高患者生存质量的关键. 本文总结了近年来国内外学者在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中取得的共识和进展, 对抗病毒治疗中的几个热点问题探讨, 并分析目前在我国慢性乙型肝炎抗病毒治疗中存在的一些问题.

关键词: 慢性乙型肝炎; 抗病毒治疗; 基因治疗

白菡, 赵桂珍. 抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 5-9
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/5.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是一种世界性流行的传染病. 全世界约有20亿人感染过乙肝病毒(HBV), 其中3.5亿人成为慢性HBV携带者, 全球每年约100万人死于与HBV感染相关的肝脏疾病^[1-4]. 我国是HBV感染的高流行区, 根据2002年全国HBV感染者血清流行病学调查, HBsAg的流行率为9.09%^[5], 约有1.2亿人携带HBV. 其中慢性乙型肝炎患者3000多万. 慢性乙肝患者中, 肝硬化失代偿的年发生率约3%, 5年累计发生率约16%^[6], 其中6%-15%可发展为肝细胞癌(HCC)^[7]. 慢性乙肝、代偿期和失代偿期肝硬化的5年病死率分别为0%-2%、14%-20%和70%-86%. 我国每年有30万人以上死于乙肝相关性并发症. 此外, HBV可通过母婴传播的途径由携带HBV的母亲传播给婴儿. 婴儿时期感染HBV者, 90%以上成为慢性HBV携带者, 并且随着年龄的增长演变为慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌. HBV的持续复制是造成慢性乙肝患者肝脏炎症持续发展, 并导致肝硬化和肝癌发生的重要因素, 国内外学者研究证实, 患者体内HBV DNA的载量与肝脏病变的严重程度成正相关, 因此提出抗病毒治疗是慢性乙型肝炎患者治疗的关键, 其目的是长期抑制HBV复制, 阻断病情发展, 从而提高患者的生存质量.

1 HBV感染的自然史

决定乙肝感染自然史的因素主要是病毒和宿主

背景资料
近年来, 慢性乙型肝炎的治疗取得很大的进展, 特别是抗病毒治疗, 大大改善乙型肝炎的预后, 为人类控制与治愈乙型肝炎带来希望. 但是目前大家对抗病毒治疗的效果仍认识不一, 抗病毒治疗中还存在像病毒耐药, 治疗后复发等很多需要解决的问题. 国内外学者对乙型肝炎抗病毒治疗进行了大量的研究, 制定临床指南, 帮助临床医生进行疾病的诊治.

研发前沿
国内外学者对抗病毒治疗的认识不断深入,在抗病毒治疗中不断的总结经验,并对临床指南不断地进行修改和提出新的方案。

两方面。慢性HBV感染可以分为3个连续性阶段:即免疫耐受期,免疫清除期和非活动性携带状态及再活动期^[8]。典型的慢性乙肝患者表现为持续存在HBsAg,但病毒DNA的滴度却趋向于随着时间而逐渐下降。在持续性感染的患者中,每年都以5%-10%的比例在进行着这一过程。常常HBeAg的消失发生在丙氨酸转氨酶(ALT)水平有短暂上升之前或与之同时发生,显而易见,这说明此过程反映了免疫介导对受感染肝细胞的破坏作用。HBV持续状态(持续感染)的自然史表明,在肝脏中存在对受感染肝细胞的不间断的免疫进攻,这种进攻通常并不足以完全根除感染,但却可以减少受感染肝细胞的数量,从而减少循环病毒的载量。在慢性乙肝的自然史中,出现急性发作很常见,也预示患者进入免疫清除期,处于较活跃的免疫应答状态。HBV DNA水平在ALT升高之前往往先出现升高,随后下降。在HBeAg阳性患者中,甚至可出现HBeAg阴转与HBeAg血清转换。在慢性乙肝急性发作的患者中,肝脏活检常提示发生小叶性坏死炎症改变,在肝内成不均一分布,严重者可见桥样坏死。由于乙肝病毒的复制,机体免疫反应破坏受感染的肝细胞,引起肝细胞反复的炎症反应,最终导致肝脏疾病的进展和肝纤维化的发生。所以免疫清除期的抗病毒治疗是慢性乙型肝炎治疗的关键^[9]。

2 肝细胞炎症和肝脏病理改变与HBV DNA病毒载量的关系

慢性HBV感染者的自然病程与患者体内HBV DNA的复制水平密切相关。长期前瞻性研究表明,基线水平的HBV DNA与肝硬化的发生密切相关。与肝细胞癌的发生表现为明显的剂量-效应关系。长期持续的高病毒负荷与肝硬化、肝癌发生的危险性关系更为密切,并增加了肝硬化、肝癌患者死亡的危险性^[10]。通过对26个前瞻性研究荟萃分析显示,血清HBV DNA水平与肝组织病变严重程度及活动性呈正相关。持续高HBV载量是慢性乙肝病情进展的主要病因。经抗病毒治疗后,随着HBV DNA水平下降,肝病活动指数(HAI)也下降,因此,慢性乙型肝炎患者病毒载量可以衡量其组织病变的严重程度^[11]。台湾学者证明,持续高HBV DNA水平,发生肝硬化和肝细胞癌的患者明显增加^[12]。因此HBV DNA水平是对乙肝病毒感染患者进行评价的一项重要指标^[13-14]。对HBV DNA持续高水平的患者应抓住治疗时机,及时进行抗病毒治疗,以最大限度地持久抑制病毒或清除病毒防止肝病进展为肝硬

化和导致肝衰竭及肝细胞癌的发生。

3 慢性乙型肝炎抗病毒治疗的目标

目前的治疗药物尚不能清除肝细胞内的共价闭合环状DNA(cccDNA),因而不能彻底清除HBV,所以慢性乙型肝炎抗病毒治疗的关键是持续抑制病毒,减轻或防止肝细胞损伤和疾病进展。治疗的根本目标是清除或永久性抑制HBV,从而减低病毒的致病性和感染性,减轻或抑制肝脏的坏死性炎症。临床治疗的短期目标是保持HBV DNA持续抑制,ALT水平正常和阻断失代偿期肝硬化的发生(最初的应答),在治疗期间和治疗后减轻肝脏的坏死性炎症和纤维化。治疗的长期和最终目标是阻止肝功能失代偿,减轻或阻止进展至肝硬化或HCC,延长生存期(持续应答)。目前国内和国际的肝病专家对慢性乙型肝炎的抗病毒治疗目标已经达成共识:最大限度地长期持续抑制或清除HBV,减轻肝细胞炎症坏死及其所致的肝纤维化,延缓疾病进展,减少肝硬化、原发性肝细胞癌及其并发症的发生,从而延长存活时间及改善生活质量^[15-16]。

4 慢性乙型肝炎抗病毒治疗策略

4.1 抗HBV治疗药物 目前全世界被批准用于抗HBV治疗的药物主要有干扰素包括普通干扰素 α -2b,聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN) α -2a和核苷类药物包括拉米夫定,阿德福韦酯和恩替卡韦。

4.1.1 干扰素: 干扰素 α 抗乙型肝炎病毒疗效确切,持久应答率可达到20%-40%,且用药疗程较为固定,病毒变异率低,并有抗肝纤维化的作用,所以目前仍然是乙型肝炎抗病毒治疗的首选药物。特别是聚乙二醇化干扰素改变了普通干扰素的药代动力学,明显提高了干扰素的生物学活性^[17-18],延长了注射间隔,同时使血药浓度更加稳定,PegIFN治疗的应答率为常规干扰素治疗的2倍。但是干扰素治疗副作用较多,使干扰素治疗存在禁忌症,给药途径为注射给药,患者不宜接受,以及治疗费用昂贵等限制了干扰素的应用。

4.1.2 核苷类药物: 是直接的抗HBV药物,已经批准上市的有:拉米夫定、阿德福韦和恩替卡韦。他们共同的特点均为DNA四个碱基之一的衍生类似物,在肝细胞内转变为三磷酸化合物,抑制HBV反转录酶和聚合酶,阻止病毒DNA链的延伸,从而起到抑制病毒复制的作用。核苷类药物的优点是口服方便,抗病毒作用较强,不良反应少,安全性好,有良好的耐受性,应用过程中严

重不良事件很少, 适用范围广, 对有HBV活动性复制的慢性乙型肝炎, 失代偿肝病, 器官移植, 化疗或免疫抑制剂治疗的患者均有显著的抑制病毒复制的作用^[19]. 其缺点是e抗原血清转换率相对较低^[20], 停药后容易复发, 而且长期应用又可发生耐药, 所以在治疗过程中会面临许多难题: 如疗程难以确定, 停药难, 可能出现停药后病情复发^[21], 不停药也难, 继续治疗部分患者可出现耐药, 以及发生耐药后的下一步治疗方案的选择都是核苷类药物在慢性乙型肝炎治疗中不可回避的问题.

4.2 抗病毒治疗方案的选择^[22] 慢性乙型肝炎抗病毒治疗的关键是通过有效、长期抗HBV药物治疗抑制HBV的外源性感染和内源性复制, 持续减少和阻断HBV cccDNA库的补充, 最后达到使其耗竭的目的. 因此, 必须强调长期、有效的抗HBV治疗. 目前可供选择的抗HBV药物不断增多, 为有效治疗慢性乙型肝炎创造条件. 干扰素类药物和核苷类药物是两类抗HBV治疗的有效药物, 但是尚不能达到完全清除HBV, 达到治愈慢性乙型肝炎的目标. 为进一步提高抗病毒治疗的疗效, 近年来, 国内外学者采用以下治疗方法: (1)联合治疗: 联合抗HBV不同作用靶位和机制的药物, 可能会产生抗HBV的协同作用. 但选用何种药物联合, 如何联合, 其耐药性和不良反应以及联合治疗药费较贵, 是否符合药物经济学原则等, 尚需进一步研究^[23]. (2)序贯治疗: 是把有效的抗HBV药连续、交替和顺序使用, 可以长期、有效地抗HBV, 防止病毒耐药突变和减少药物不良反应. 尤其是新的有效抗HBV药不断研制和临床应用, 为序贯治疗创造更多可供选择的有效药物和良好的治疗条件. 符合长期有效抗HBV治疗的原则. 但应选择哪些有效的抗HBV药物, 如何进行有效的序贯治疗等, 还需进一步研究^[24-26]. (3)个体治疗: 根据病毒的特点(如HBV的基因型, 病毒变异情况等)和患者的个体因素(如年龄、肥胖和免疫状态等)对抗HBV治疗的应答及耐受性等. 个体化治疗是针对不同疾病发展情况和病毒学特征, 合理制定不同模式的治疗方案, 可提高抗HBV的持续应答率, 但需要积累更多的临床经验.

5 目前慢性乙型肝炎抗病毒治疗中存在的问题

5.1 慢性乙型肝炎抗病毒治疗的疗程和治疗终点 慢性乙型肝炎需要长期治疗, 这是因为目前的抗病毒治疗方法只是控制疾病进展, 尚不能

达到治愈标准. 但临床上抗病毒治疗终点的选择是临床工作中必须回答的问题. 对于HBeAg阳性的慢性乙型肝炎, 干扰素和核苷类药物均可用于一线抗病毒治疗, 但核苷类药物在停药后常复发, 所以疗程尚不能确定. 其治疗终点是HBeAg阴转, HBV DNA监测不到, 再巩固6-12 mo. 对于HBeAg阴性患者最大的问题是停药后的高复发率, 核苷药物治疗1年的复发率为90%, 干扰素治疗1年的复发率也高达80%, 目前尚无法确定HBeAg阴性慢性乙型肝炎的治疗时间, 采用核苷药物治疗, 疗程应在3-5年以上. 是否应将HBsAg阴转作为治疗目标需要进一步探讨.

5.2 乙型肝炎抗病毒治疗的误区 不重视抗病毒治疗, 由于许多HBV携带者可终生不发病, 这使得一些医生误认为抗病毒治疗无关紧要, 肝功能异常时服用一些降酶药物就行. 而病情严重时, 往往已经发展为重型肝炎或肝硬化晚期. 虽然有些HBV携带者可终生不发病, 但其对人体的损害常常是在体内逐步地进行, 大约70%的HBV携带者肝脏均有不同程度的炎症, 多数慢性肝炎患者在转氨酶轻度升高时并无明显症状. 因此, 我们常说HBV是体内潜伏的“不定时炸弹”, 应该随时保持警惕, 对HBV携带者若条件允许, 应进行肝活检以明确肝脏的炎症程度, 一旦符合抗病毒治疗的指征, 应尽可能进行抗病毒治疗. 尤其是40岁以上的男性携带者, 若肝活检炎症程度大于2级, 应立即进行抗病毒治疗.

不告知疗程及副作用, 有些医生在用药时不明确告知患者疗程, 导致一些患者在治疗刚刚达到初步疗效就自行停药. 这样不仅起不到对HBV的抑制作用, 还可能加速耐药的发生, 甚至使病毒的复制反弹, 导致肝病加重.

盲目使用多种抗病毒药, 有些医生为了达到清除乙肝病毒的目的, 盲目联合多种抗乙肝病毒的药物. 多数专家认为, 乙肝的抗病毒治疗药物不应盲目联合应用, 而应采用不同作用机制的联合用药或一种抗病毒药物使用一段时间后再更换另一种药物的序贯治疗方法.

5.3 乙型肝炎抗病毒治疗的新策略

5.3.1 免疫调节治疗: 治疗性乙肝疫苗(包括乙肝抗原-抗体复合物疫苗、治疗性多肽疫苗和蛋白疫苗)已经获得国家食品药品监督管理局批准进入II期临床, 目前正处于用药后的临床观察随访阶段. 临床研究报告显示, 治疗性乙肝疫苗有望打破慢性HBV感染患者最主要的免疫学反应

创新盘点
本文较全面的总结了慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的几个问题, 引用最新的国内外资料, 强调抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性.

应用要点
通过强调抗病毒
治疗在慢性乙型
肝炎治疗中的重
要性,总结慢性乙
型肝炎抗病毒治
疗中存在的问题。

紊乱,即对HBV及其抗原不产生免疫应答的免疫耐受状态,开辟乙肝特异性免疫治疗新途径^[27]。

5.3.2 基因治疗:慢性乙型肝炎的基因治疗通过将外源基因导入细胞内而发挥抗病毒作用,是极具潜力的抗HBV治疗方法。包括RNA干扰技术^[28-29],反义寡脱氧核苷酸技术^[30-31],核酶技术^[32]和DNA疫苗技术^[33-35]。基因治疗是一种前景十分看好的针对慢性HBV感染的治疗方式。实际应用于临床还需要进一步提高治疗效果,寻找到有效的特异性基因进入被病毒感染肝细胞的方法和降低潜在的毒副作用等。

我国慢性乙型肝炎的治疗极不规范。本来感染性疾病的根本治疗是清除病原体,即抗病原特异性治疗,但在慢性乙型肝炎患者的治疗中却往往被忽视,我国仅有18%左右的慢性乙型肝炎患者接受正规的抗病毒治疗。由此可见,我国慢性乙型肝炎的治疗任重而道远,正确认识慢性乙型肝炎抗病毒治疗的重要性十分必要。

6 参考文献

- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
- Van Damme P, Van Herck K. A review of the efficacy, immunogenicity and tolerability of a combined hepatitis A and B vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2004; 3: 249-267
- Kew MC. Geographical determinants of hepatitis disease burden. 11th International Symposium on Viral Hepatitis & Liver Disease Proceedings Book, 2004: 216-221
- Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 2000; 61: 362-366
- 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. *中华流行病学杂志* 2005; 26: 655-658
- de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodés J, Rosenberg W, Valla D; EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S3-S25
- Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174
- Tran TT, Martin P. Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 255-266
- 翁心华. 乙型肝炎的自然史: 对抗病毒治疗的启示. *中华传染病杂志* 2005; 23: 16-18
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73
- Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum MR, Rousseau F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology* 2003; 37: 1309-1319
- Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, Chen DS. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis* 2006; 193: 1258-1265
- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686
- Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 936-962
- Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Gane E, Kao JH, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-489
- 中华医学会肝病学会, 感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 881-891
- Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129
- Chan HL, Hui AY, Wong VW, Chim AM, Wong ML, Sung JJ. Long-term follow-up of peginterferon and lamivudine combination treatment in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2005; 41: 1357-1364
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2673-2681
- Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfssohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808-816
- Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006; 43: S173-S181
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
- Perrillo RP. Current treatment of chronic hepatitis B: benefits and limitations. *Semin Liver Dis* 2005; 25 Suppl 1: 20-28
- Chun S, Zucker SD. Combination therapy for chronic hepatitis B: a one-two knockout punch, or a swing and a miss? *Gastroenterology* 2006; 130: 613-614; discussion 514-515
- Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P, Pluck N. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-2695
- Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P,

- Pluck N. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351: 1206-1217
- 27 Hui CK, Lau GK. Advances in immunomodulating therapy of HBV infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 24-29
- 28 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
- 29 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
- 30 Korba BE, Gerin JL. Antisense oligonucleotides are effective inhibitors of hepatitis B virus replication in vitro. *Antiviral Res* 1995; 28: 225-242
- 31 Bartholomew RM, Carmichael EP, Findeis MA, Wu CH, Wu GY. Targeted delivery of antisense DNA in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *J Viral Hepat* 1995; 2: 273-278
- 32 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbutnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000; 33: 142-151
- 33 Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1847-1851
- 34 Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 1999; 17: 2826-2829
- 35 Yang SH, Lee CG, Park SH, Im SJ, Kim YM, Son JM, Wang JS, Yoon SK, Song MK, Ambrozaitis A, Kharchenko N, Yun YD, Kim CM, Kim CY, Lee SH, Kim BM, Kim WB, Sung YC. Correlation of antiviral T-cell responses with suppression of viral rebound in chronic hepatitis B carriers: a proof-of-concept study. *Gene Ther* 2006; 13: 1110-1117

同行评价
本文内容充实, 文笔流畅, 实用性
强, 有一定的参考
意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.

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

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元.欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅.联系地址: 100023,北京市2345信箱.联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com.

梗阻性黄疸对大鼠肾脏AQP-3表达的影响

张德巍, 李云飞, 王勇, 王晟, 孟相真, 刘金钢

背景资料
梗阻性黄疸导致肾脏损害的确切机制尚不完全清楚, 其发生可能与内毒素血症、胆红素和胆酸毒性、肿瘤坏死因子、血管活性物质、血容量减少、水盐代谢紊乱等多方面因素有关。随着对水通道蛋白的发现及其研究的不断深入, 人们渴望在分子水平上对梗阻性黄疸时发生急性肾功能衰竭的机制加以诠释。

张德巍, 中国医科大学附属第四医院普通外科 辽宁省沈阳市 110032
李云飞, 王勇, 王晟, 孟相真, 刘金钢, 中国医科大学附属盛京医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110005
张德巍, 2006年中国医科大学硕士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事消化肿瘤的基础与临床研究。
通讯作者: 张德巍, 110005, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院普通外科. syzhangdewei@sohu.com
电话: 024-62037377
收稿日期: 2007-07-15 修回日期: 2007-12-21

Renal aquaporin-3 expression in rats with obstructive jaundice

De-Wei Zhang, Yue-Fei Li, Yong Wang, Sheng Wang, Xiang-zhen Meng, Jin-Gang Liu

De-Wei Zhang, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Yun-Fei Li, Yong Wang, Sheng Wang, Xiang-Zhen Meng, Jin-Gang Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China
Correspondence to: De-Wei Zhang, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. syzhangdewei@sohu.com
Received: 2007-07-15 Revised: 2007-12-21

Abstract

AIM: To detect and analyze expression of aquaporin-3 (AQP-3) in a model of rats with obstructive jaundice at different time periods.

METHODS: Forty adult male Wistar rats were selected for the experiment. All the rats were randomly divided into four groups of 10 rats each (groups A, B, C and D). Group A consisted of rats that had obstructive jaundice for 7 d. Group B was the control group for group A. Group C consisted of rats that had obstructive jaundice for 14 d. Group D was the control group for group C. All the experimental rats were killed respectively on day 7 or 14 after the experimental animal model of obstructive jaundice was established. Western blotting was used to detect the amount of AQP-3 in the kidneys.

RESULTS: There was no difference in CREA

between each experimental group. The level of UREA differed between group C and D (9.23 ± 0.70 vs. 8.22 ± 0.43 , $P < 0.05$), whereas it did not differ between the other groups. The differences in AQP-3 between group A and C ($t = 7.629$, $P = 0.000$) and between group C and D ($t = -13.159$, $P = 0.000$) were significant ($P < 0.01$). The difference between group A and B was also significant ($t = -2.310$, $P = 0.033$).

CONCLUSION: There was no obvious change in CREA 14 d after obstructive jaundice was established. UREA increased slightly 14 d after obstructive jaundice was established. Expression of AQP-3 decreased in the early stage of obstructive jaundice, and it decreased slowly with the duration of obstructive jaundice.

Key Words: Obstructive jaundice; Acute renal failure; Aquaporin-3

Zhang DW, Li YF, Wang Y, Wang S, Meng XZ, Liu JG. Renal aquaporin-3 expression in obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 10-14

摘要

目的: 本实验通过建立梗阻性黄疸大鼠实验模型, 检测不同时间段梗阻性黄疸大鼠及对照组大鼠肾脏中AQP-3的表达。

方法: 成年♂Wistar大鼠40只, 随机分为A、B、C、D四组($n = 10$), A组为梗阻性黄疸7 d实验组、B组为A组对照组、C组为梗阻性黄疸14 d组、D组为C组对照组。黄疸建立后7 d及14 d分别剖杀A、B、C和D组实验动物, Western blotting检测各组大鼠肾脏AQP-3的表达。

结果: 各组大鼠血清肌酐检测结果无差异; C、D组间血尿素氮检测有显著性差异(9.23 ± 0.70 vs 8.22 ± 0.43 , $P < 0.05$), 而其余各组间无差异; AQP-3表达在A与C组($t = 7.629$, $P = 0.000$), C与D组($t = -13.159$, $P = 0.000$), A与B组间($t = -2.310$, $P = 0.033$)有显著性差异。

结论: 梗阻性黄疸14 d内血清肌酐可无明显变化; 梗阻性黄疸14 d时可出现尿素氮的轻度增

高; 梗阻性黄疸时AQP-3表达减少, 并随着梗阻时间的延长, AQP-3有逐渐降低的趋势。

关键词: 梗阻性黄疸; 急性肾功能衰竭; 水通道蛋白-3

张德巍, 李云飞, 王勇, 王晟, 孟相真, 刘金钢. 梗阻性黄疸对大鼠肾脏AQP-3表达影响的实验研究. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 10-14
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/10.asp

0 引言

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)能导致急性肾功能衰竭(acute renal failure, ARF)^[1]. 文献资料表明OJ导致ARF的发生率可达6%-18%, 其死亡率高达32%-100%^[2]. OJ所导致ARF的病理特征是肾小管变性及坏死^[3], 实验表明OJ时肾小管对水和钠重吸收功能障碍多先于肾血流的减少和肾小球滤过功能障碍, 尿液浓缩功能障碍是OJ并发肾损害的早期表现^[4]. 1991年Agre *et al*^[5]发现水通道蛋白(aquaporins, AQP), 现已明确AQP是肾脏重吸收水、浓缩尿液, 维持机体水平衡的主要分子基础. AQP-3不仅对水具有高度的通透性, 同时可调节尿素和甘油等小分子的代谢^[6], 而尿素在尿液浓缩机制中起重要的作用. 通过对尿液中水通道蛋白的检测, 作到对肾功能改变的早期评定指标^[7], 克服了目前作为肾功能检查的主要指标肌酐和尿素氮不能反映早期肾脏功能损伤的缺点.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂ Wistar大鼠40只, 体质量250-300 g, 中国医科大学实验动物中心提供, 经检疫合格, 实验前饲养7 d无疾病者入选. 鼠手术操作台, 灭菌手术器械, HITACHI冰箱, HITACHI7600全自动生化分析仪, 德国Heraus-Biofuge-PrimoR超速低温离心机, 日本岛津UV-260紫外分光光度计, 德国UP200H组织超声匀浆器, 美国BIO-RAD-PAC300型垂直电泳仪, 美国BIO-RAD MiniPROTEAN II cell型垂直电泳槽, 上海天能公司Tanon小型转印电泳槽, 上海天能公司GIS-2020型凝胶扫描成像系统, AQP-3一抗, 二抗购自Santa Cruz公司.

1.2 方法

1.2.1 分组: 采用摸球法将40只大鼠随机分成四组, 每组10只, A组为梗阻性黄疸7 d实验组、B组为假手术7 d对照组、C组为梗阻性黄疸14 d

实验组、D组为假手术14 d对照组.

1.2.2 梗阻性黄疸大鼠模型的建立: 术前禁食12 h, 4 h禁水, 称量大鼠体质量, 30 mL/g ip 100 mL/L的水合氯醛麻醉大鼠, 麻醉生效后将大鼠固定于手术台上, 术区备皮、碘伏消毒和铺巾, 取正中切口1.5-2 cm入腹, 入腹后将肝缘用棉签推开即可暴露胆总管, 分离胆总管, 实验组丝线于胆总管下端双重结扎, 对照组大鼠分离胆总管后不结扎, 缝合关腹. 术后4 h后自由进水, 12 h后进食, 自由活动, 大鼠分笼饲养, 每日给予青霉素2万单位/100 g肌注, 连续3 d.

1.2.3 标本采集: 术后7 d及14 d取A、B组及C、D组大鼠终止动物实验, 麻醉后取腔静脉血5-8 mL, -20℃冰箱内保存, 待测生化指标即总胆红素(T-BIL)、直接胆红素(D-BIL)、血肌酐(CREA)和尿素氮(UREA), 大鼠左侧肾脏置于-80℃冰箱内保存, 待检测AQP-3.

1.2.4 AQP-3的检测(Western blot技术): 标本加入6倍体积的细胞裂解液A匀浆, 4℃ 17500 g 离心90-120 min, 上清为胞质蛋白样品. 沉淀(膜的成份)加入1 mL细胞裂解液B在冰水中匀浆, 超声粉碎20 s, 间隔20 s, 2-3次, 静置4℃过夜后, 4℃ 17500 g离心为90 min, 取上清为胞膜蛋白样品. Lorry法蛋白定量: 各取样品50 μL蛋白定量, 以浓度最低管为基准, 调节蛋白浓度, 加5×样品缓冲液, 煮沸3-5 min, 按顺序过胶、转膜、扫描.

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件包处理. 数据采用mean±SD表示, 应用独立样本t检验, $P<0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 各组大鼠黄疸指标检测 A组与B组、C组与D组间大鼠T-BIL和D-BIL有显著性差异($P<0.01$), 假手术组间无差异, 证实梗阻性黄疸模型建立(表1).

2.2 各组大鼠肾功能检测 各组大鼠CREA检测结果无差异; 14 d实验组与对照组UREA检测有显著性差异, 而其余各组间无差异(表2).

2.3 水通道蛋白检测 Western blot法测定AQP-3蛋白表达, 表达数据采用密度值表示, 结果显示A组与B组间、C组与D组间有十分显著性差异; A组与C组间有显著性差异; B组与D组间无差异(图1, 表3).

3 讨论

OJ导致肾脏损害的确切机制尚不完全清楚, 其

研发前沿

1988年Ager *et al*发现AQP以来, 随着人们对AQP的逐渐深入, 现对尿崩症, 泌尿系梗阻、糖尿病等引起的ARF研究较为深入, 但对OJ导致的ARF的研究仍处于起步阶段. 而对AQP-3的研究却只局限于失血性休克、肾脏再灌注损伤及胆总管结扎对其在肾脏中表达的影响上.

应用要点

研究OJ时大鼠肾脏AQP-3表达的意义不仅在于揭示OJ时肾脏AQP-3的变化规律,而且可以通过研究OJ时大鼠肾脏AQP-3的变化推断人类OJ时AQP-3的变化。鉴于AQP-3按肾脏中AQP-3含量的一定比率分泌至尿液中排泄,可以通过测定尿液中AQP-3的含量,推测肾脏中AQP-3的含量,如果其可作为检测肾脏尿液浓缩功能的指标,无疑有助于提高OJ时肾功能损害的早期诊断率。早期对OJ患者施加一些治疗手段,减少或防止OJ时发生ARF。

表1 各组大鼠T-BIL、D-BIL、CREA和UREA检测结果

	A组	B组	<i>t</i>	<i>P</i>	C组	D组	<i>t</i>	<i>P</i>
T-BIL	70.93 ± 7.55	4.64 ± 1.55	27.209	0.000	96.00 ± 14.35	3.77 ± 1.01	20.268	0.000
D-BIL	53.93 ± 7.81	4.07 ± 1.43	19.847	0.000	73.82 ± 11.90	3.26 ± 1.00	18.683	0.000
CREA	27.30 ± 11.85	24.20 ± 3.49	0.793	0.438	29.20 ± 8.40	24.20 ± 4.44	1.663	0.1140
UREA	7.80 ± 0.81	8.04 ± 0.28	-0.885	0.388	9.23 ± 0.70	8.22 ± 0.43	3.870	0.0011

表2 各组大鼠肾脏AQP-3的表达

	A组	B组	C组	D组
AQP-3	67.94 ± 7.28	75.09 ± 6.55	44.99 ± 6.12	80.78 ± 6.04
<i>t</i>	-2.310	7.629	-13.159	-2.019
<i>P</i>	0.033	0.000	0.000	0.059

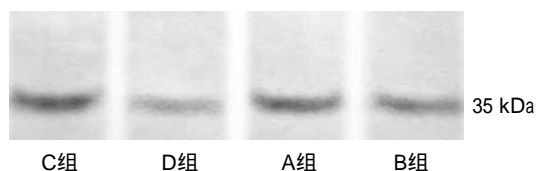


图1 各组大鼠肾脏AQP-3的表达。

发生可能与内毒素血症,胆红素和胆酸毒性,肿瘤坏死因子,血管活性物质、血容量减少、水电解质紊乱和肾脏再灌注损伤等多方面因素有关^[1,8-11]。

1991年Agre *et al*^[5]在分离非洲爪蟾卵母细胞Rh蛋白时发现一种具有将细胞外水转运到细胞内的蛋白质,将其命名为AQP-3。随后发现10余种AQP-3,其中分布于肾脏的有AQP-0、1、2、3、4、6、7、8等八种。现已明确AQP-3是肾脏重吸收水、浓缩尿液,从而维持机体水平衡的主要分子基础,在肾脏功能损伤的早期多伴随着不同程度的水通道蛋白表达的变化^[12]。AQP-3主要分布于集合管上皮主细胞基侧质膜,除对水通透性外还可转运非离子的小分子物质(如尿素和甘油等)^[13],而尿素在尿的浓缩机制中有着重要意义^[14]。尿素在AQP-3参与下逆渗透压梯度差被重吸收,小管液中尿素的量增加,是形成逆流倍增现象的基础,故AQP-3在尿的浓缩中起重要作用。敲除大鼠肾脏中的AQP-3^[15],其饮水量和尿量增加12倍以上,表现为严重的尿崩症,大鼠表现为多饮、多尿、钠排出增多、尿渗透压降低。另一方面,AQP-3可改变Na-K泵、其他AQP-3及Na-K ATP酶活性,增强对原尿中的水及离子的重吸收^[16]。AQP-3受精氨酸抗利尿激素的调节,精氨酸抗利尿激素可使AQP-3表达上调,从而促

进对水、钠的重吸收^[17]。

本实验中,梗阻性黄疸时肾脏AQP-3表达明显下调,且这种表达下调随着梗阻时间延长进行性加重。目前就梗阻性黄疸时AQP-3表达变化的研究尚未见确切报道,但药物、失血性休克等因素引起的急、慢性肾功能衰竭及肾脏缺血再灌注损伤中肾脏AQP-3表达均表现为明显下调^[18-21]。实验研究认为肿瘤坏死因子、内皮素、前列腺素、血栓素、血管紧张素、一氧化氮等细胞因子对于肾脏集合管主细胞的直接损伤可以导致AQP-3表达的下调^[22-27]。而在梗阻性黄疸时肾脏的损伤因素更加复杂。首先,OJ时肠黏膜屏障受损、细菌易位明显增加^[9]导致内毒素血症,OJ动物模型^[28]和大多数OJ患者都存在明显的内毒素血症,而肾脏又是内毒素的敏感靶器官,内毒素的肾脏损害不言而喻。其次,OJ时胆汁排出受阻,胆管内压升高,当压力超过3.43 kPa则导致胆汁逆流入血引起高胆红素血症,一方面胆红素及胆酸血症直接作用使Kupffer细胞数量减少、活性抑制,导致网状内皮系统功能低下,全身免疫系统功能抑制,增强了内毒素的作用。另一方面,胆红素可在肾小管细胞内滞留,当其浓度增高时可抑制线粒体内呼吸链的电子传递过程^[1],使氧化和磷酸化的偶联作用解除,对肾小管细胞具有毒性,并使肾小管细胞呼吸速度减慢,造成细胞缺氧,使肾脏功能和结构受损,加重肾损害。实验表明淤胆性肝硬化大鼠集合管基底侧壁AQP-3的表达较明显低于对照组^[29],说明梗阻性黄疸时肾脏AQP-3表达的变化规律。最后,OJ同时存在着肾缺血以及肾再灌注恢复的两方面因素^[10],具备了肾脏再灌

注损伤的产生的条件. 免疫电泳和免疫细胞化学显示肾脏再灌注损伤时AQP-3的表达明显下调, 而AQP-3的表达的下调是肾脏再灌注损伤时尿重吸收功能减退、钠的重吸收降低, 尿量增多、尿钠排出增加等表现的分子学基础^[20].

研究梗阻性黄疸时大鼠肾脏AQP-3及AQP-3 mRNA表达的意义不仅在于揭示梗阻性黄疸时肾脏AQP-3及AQP-3 mRNA的变化规律, 而且, 因为大鼠和人的AQP cDNA及人类AQP家族其他成员cDNA有高度同源性^[30]. 我们可以通过研究梗阻性黄疸大鼠肾脏AQP-3的变化推断人类梗阻性黄疸时水通道蛋白3的变化. 本实验显示梗阻性黄疸早期(7 d内)大鼠肌酐、尿素氮无明显变化, 而此时实验组大鼠肾脏AQP-3及AQP-3 mRNA与对照组间有十分显著性差异, 说明肾脏中AQP-3及AQP-3 mRNA的变化较传统的肌酐、尿素氮等肾功能指标出现早, 鉴于AQPs按肾脏中AQPs含量的一定比率分泌至尿液中排泄, 目前尿液中AQPs的测定已是成熟的技术. 我们可以通过测定尿液中AQPs的含量, 推测肾脏中AQPs的含量, 如果其可作为检测肾脏尿液浓缩功能的指标, 无疑有助于提高OJ时肾功能损害的早期诊断率. 早期对OJ患者施加一些治疗手段, 这可减少或防止OJ时发生ARF.

4 参考文献

- Fogarty BJ, Parks RW, Rowlands BJ, Diamond T. Renal dysfunction in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1995; 82: 877-884
- Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg* 1984; 147: 766-771
- Kaler B, Karam T, Morgan WA, Bach PH, Yousef IM, Bomzon A. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. *Ren Fail* 2004; 26: 507-516
- 张丰深, 何振平, 段恒春. 梗阻性黄疸并发肾功能损害的实验研究. *第三军医大学学报* 2002; 24: 1046-1047
- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 1993; 265: F463-F476
- Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K, Yamamoto T. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 814-819
- Rai T, Sekine K, Kanno K, Hata K, Miura M, Mizushima A, Marumo F, Sasaki S. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1357-1362
- Uslu A, Cayci M, Nart A, Karaca C, Zalluhoglu N, Gürkan A, Varilsuha C, Adagülü H. Renal failure in obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 52-54
- 刘金钢, 王勇, 宋军, 田野, 王道顺, 余云. 生长激素对实验性梗阻性黄疸大鼠内毒素血症的防治. *中华普通外科杂志* 2001; 8: 493-494
- Yüceyar S, Gümüştas K, Ertürk S, Hamzaoglu IH, Uygun N, Ayaz M, Cengiz A, Kafadar Y. The role of oxygen free radicals in acute renal failure complicating obstructive jaundice: an experimental study. *HPB Surg* 1998; 10: 387-393
- Padillo FJ, Cruz A, Briceño J, Martín-Malo A, Pera-Madrado C, Sitges-Serra A. Multivariate analysis of factors associated with renal dysfunction in patients with obstructive jaundice. *Br J Surg* 2005; 92: 1388-1392
- Jung JS, Lee RH, Koh SH, Kim YK. Changes in expression of sodium cotransporters and aquaporin-2 during ischemia-reperfusion injury in rabbit kidney. *Ren Fail* 2000; 22: 407-421
- Mobasheri A, Wray S, Marples D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol* 2005; 36: 1-14
- Ohshiro K, Yaoita E, Yoshida Y, Fujinaka H, Matsuki A, Kamiie J, Kovalenko P, Yamamoto T. Expression and immunolocalization of AQP6 in intercalated cells of the rat kidney collecting duct. *Arch Histol Cytol* 2001; 64: 329-338
- Combet S, Geffroy N, Berthouaud V, Dick B, Teillet L, Verbavatz JM, Corman B, Trinh-Trang-Tan MM. Correction of age-related polyuria by dDAVP: molecular analysis of aquaporins and urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F199-F208
- Kim SW, Gresz V, Rojek A, Wang W, Verkman AS, Frøkiaer J, Nielsen S. Decreased expression of AQP2 and AQP4 water channels and Na,K-ATPase in kidney collecting duct in AQP3 null mice. *Biol Cell* 2005; 97: 765-778
- Dibas AI, Mia AJ, Yorio T. Aquaporins (water channels): role in vasopressin-activated water transport. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 219: 183-199
- Leung JC, Chan LY, Tsang AW, Tang SC, Lai KN. Differential expression of aquaporins in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic mice. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10: 63-72
- Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Frøkiaer J, Nielsen S. Reduced renal expression of AQP2, p-AQP2 and AQP3 in haemorrhagic shock-induced acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2551-2559
- Fernandez-Llama P, Andrews P, Turner R, Saggi S, Dimari J, Kwon TH, Nielsen S, Safirstein R, Knepper MA. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1658-1668
- Spector DA, Wade JB, Dillow R, Steplock DA, Weinman EJ. Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F1034-F1042
- Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Klier M, Kralisch S, Paschke R. Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNF α , and dexamethasone. *Horm Metab Res* 2003; 35: 222-227
- Ge Y, Ahn D, Stricklett PK, Hughes AK, Yanagisawa M, Verbalis JG, Kohan DE. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 alters vasopressin regulation of urine osmolality. *Am J*

同行评价
本文立意新颖, 设计合理. 科学性较强, 具有一定的学术价值.

- Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F912-F920
- 24 Nejsum LN, Zelenina M, Aperia A, Frøkiaer J, Nielsen S. Bidirectional regulation of AQP2 trafficking and recycling: involvement of AQP2-S256 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F930-F938
- 25 Murer L, Addabbo F, Carmosino M, Procino G, Tamma G, Montini G, Rigamonti W, Zucchetta P, Della Vella M, Venturini A, Zacchello G, Svelto M, Valenti G. Selective decrease in urinary aquaporin 2 and increase in prostaglandin E2 excretion is associated with postobstructive polyuria in human congenital hydronephrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2705-2712
- 26 Devuyst O, Combet S, Cnops Y, Stoenoiu MS. Regulation of NO synthase isoforms in the peritoneum: implications for ultrafiltration failure in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 675-678
- 27 Nørregaard R, Jensen BL, Li C, Wang W, Knepper MA, Nielsen S, Frøkiaer J. COX-2 inhibition prevents downregulation of key renal water and sodium transport proteins in response to bilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F322-F333
- 28 Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopoulos C. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med* 2003; 3: 124-128
- 29 Fernandez-Llama P, Turner R, Dibona G, Knepper MA. Renal expression of aquaporins in liver cirrhosis induced by chronic common bile duct ligation in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1950-1957
- 30 Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH, van Oost BA. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264: 92-95

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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。

黄芪多糖对LPS损伤小肠上皮细胞的保护作用

袁媛, 孙梅

袁媛, 孙梅, 中国医科大学附属盛京医院儿科 辽宁省沈阳市 110004

袁媛, 中国医科大学儿科专业2005级在读博士, 主要从事胃肠功能障碍发生机制方面研究.

通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院儿科. sunm@cmu2h.com

收稿日期: 2007-08-29 修回日期: 2007-12-17

Mechanism of impact of *Astragalus mongholicus* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced damage in intestinal epithelial cells

Yuan Yuan, Mei Sun

Yuan Yuan, Mei Sun, Department of Pediatrics, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Mei Sun, Department of Pediatrics, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cmu2h.com

Received: 2007-08-29 Revised: 2007-12-17

Abstract

AIM: To explore the mechanism of the action and impact of *Astragalus mongholicus* polysaccharides (APS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory factors gene expression and nuclear factor (NF)- κ B transcriptional activity in intestinal epithelial cells (IEC-6).

METHODS: Intestinal epithelial cells (IEC-6) were divided into six groups: controls; LPS; LPS + APS 50 mg/L; LPS + APS 100 mg/L; LPS + APS 200 mg/L; LPS + APS 500 mg/L. Expression of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-8 mRNA was determined by RT-PCR. Expression of NF- κ B protein was determined by electrophoretic mobility shift assay.

RESULTS: Levels of TNF- α , IL-8 mRNA and NF- κ B protein were significantly higher in the LPS-damaged group than those in the control group ($P < 0.01$). Moreover, APS significantly inhibited LPS-induced TNF- α and IL-8 at the mRNA level and reduced the production of NF-

κ B protein in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.01$).

CONCLUSION: APS can inhibit LPS-induced production of TNF- α and IL-8 mRNA, perhaps via suppression of the NF- κ B signaling pathway. Modulation of bacterial product-mediated NF- κ B signaling by APS may represent an attractive strategy for the prevention and treatment of intestinal inflammation.

Key Words: *Astragalus mongholicus* polysaccharides; Intestinal epithelial cells; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-8; Nuclear factor kappa B

Yuan Y, Sun M. Mechanism of impact of *Astragalus mongholicus* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced damage in intestinal epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 15-19

摘要

目的: 探讨黄芪多糖(APS)在内毒素-脂多糖(LPS)损伤小肠上皮细胞(IEC-6)中的作用机制及对细胞因子和核因子- κ B(NF- κ B)表达的影响.

方法: 以小肠上皮细胞株IEC-6为研究对象, 将培养的细胞分为6组: 对照组、LPS组、LPS+APS 50 mg/L组、LPS+APS 100 mg/L组、LPS+APS 200 mg/L组和LPS+APS 500 mg/L组. 采用RT-PCR法检测细胞因子TNF- α 和IL-8 mRNA的表达, 采用凝胶电泳迁移率法分析NF- κ B蛋白活性.

结果: LPS损伤IEC-6细胞后, TNF- α , IL-8 mRNA水平和NF- κ B蛋白定量表达均升高, 均显著高于对照组($P < 0.01$). 而黄芪多糖呈浓度和时间依赖性地抑制LPS诱导IEC-6细胞分泌的TNF- α , IL-8等细胞因子的mRNA的表达水平($P < 0.01$), 并能降低NF- κ B的表达活性($P < 0.01$).

结论: APS具有抑制LPS刺激IEC-6细胞产生的TNF- α , IL-8炎性因子的作用, 并能降低NF- κ B的表达活性, 其对LPS所致的肠道损伤具有保护作用.

背景资料
肠功能障碍可引发全身炎症反应综合征(SIRS)并加速多系统器官功能衰竭(MSOF), 故在危重病中起着非常重要的作用. 如何治疗及阻止肠功能障碍的发生具有重要意义.

研发前沿
以往治疗严重感染等重症应激状态导致的肠道黏膜损伤仅依赖抗菌药物治疗,目前人们开始重视中医中药对肠道的免疫紊乱状态的调理治疗。黄芪以其“活血化瘀”“清热解毒”之功效成为目前研究较多的一种中草药。国内研究多集中在其促进胃肠黏膜细胞增殖、分化、移行作用,对心脏的免疫保护调节等,而鲜有对肠功能障碍的免疫保护作用机制研究。

关键词: 黄芪多糖; 小肠上皮细胞株; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素-8; 核因子- κ B

袁媛, 孙梅. 黄芪多糖对LPS损伤小肠上皮细胞的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 15-19
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/15.asp>

0 引言

肠上皮细胞是肠道黏膜屏障的重要组成部分,是宿主与病原微生物双向联系的第一道防御。各种病理因素(如创伤、休克和严重感染等)重症应激状态时,全身免疫功能低下,大量肠道内细菌和内毒素侵入体循环,造成细菌移位和肠源性内毒素血症,可加剧肠上皮细胞的损伤,导致一些炎症介质(如TNF- α , IL-6, IL-8和血小板激活因子等)大量的产生和释放,引起全身炎症反应综合征(SIRS),启动并加速多系统器官功能衰竭(MSOF)。这说明肠功能障碍在危重病发展过程中起着非常重要的作用。长期以来,人们仅仅依赖抗菌药物直接杀灭或抑制微生物的生长繁殖,并未对免疫紊乱状态进行调理治疗。随着人们对疾病认识的提高,目前开始重视免疫治疗方案,着重于阻断炎症瀑布反应和保护细胞介导免疫功能,其中具体治疗方法包括中医中药治疗。黄芪以其“活血化瘀”“清热解毒”之功效成为目前研究较多的一种中草药。黄芪多糖(APS)是黄芪很重要的一种单体成分。国内多项研究证实APS具有免疫调节^[1]、刺激造血功能^[2]和神经系统保护^[3]等多种功效。我们利用体外培养小肠上皮细胞系,研究APS对内毒素-脂多糖(LPS)刺激小肠上皮细胞产生细胞因子TNF- α , IL-8和NF- κ B的调节作用。探讨APS对LPS所致的肠上皮细胞损伤的免疫保护作用机制,为临床治疗及阻止SIRS和MSOF的发生提供一种手段。

1 材料和方法

1.1 材料 IEC-6细胞系由中国医学科学院肿瘤医院生物检测中心提供, TRIzol, RT-PCR试剂盒, DMEM培养基和胎牛血清购于Gibco公司, LPS购自Sigma公司, APS由美国泛美医药公司Pharmagenesis提供, TNF- α 和IL-8上下游引物由上海生物工程公司设计合成。培养液每1000 mL由900 mL DMEM, 100 mL胎牛血清, 配以0.01 g/L的胰岛素组成。APS 250 mg用DMEM稀释成50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L的溶液。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: IEC-6细胞在37°C, 50 mL/L CO₂培养箱中培养, 次日换液, 接近80%融合时, 2.5 g/L胰酶消化传代。5 d传代1次, 传代5次后的细胞用于实验。

1.2.2 细胞分组: 将培养的细胞分为6组: 1组: 对照组, 以PBS为对照; 2组: LPS组; 3组: LPS+APS 50 mg/L; 4组: LPS+APS 100 mg/L; 5组: LPS+APS 200 mg/L; 6组: LPS+APS 500 mg/L。

1.2.3 RT-PCR分析: 细胞以每孔 4×10^8 /L的密度接种于培养板内, 孵育24 h, 然后加入不同剂量APS溶液100 μ L使其终浓度分别为50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L, 再孵育1 h, 然后给予LPS继续孵育1-4 h后收集细胞检测TNF- α 和IL-8 mRNA水平。TNF- α 的扩增PCR条件: 95°C 2 min, 94°C 1 min, 58°C 45 s, 72°C 45 s, 25个循环后74°C延伸10 min。TNF- α 的引物序列: 上游引物5'-TTCGGGGTGATCGGTCCCAA-3', 下游引物5'-AGCATCTCGTGTGTTTCTGA-3'。IL-8的扩增PCR条件: 94°C 1 min, 94°C 40 s, 51°C 1 min, 72°C 1 min, 25个循环后72°C延伸5 min。IL-8的引物序列: 上游引物5'-CCTG AAGACCCTACCAAG-3', 下游引物5'-AGGC TCCATAAATGAAAGA-3'。内参GAPDH的扩增: PCR条件: 95°C 5 min, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 74°C 1 min, 25个循环后74°C延伸10 min。GAPDH的引物序列: 上游引物5'-ATCACTGC CACTCAGAAGAC-3', 下游引物5'-TGAGGGA GATGCTCAGTGTT-3'。15 g/L琼脂糖凝胶电泳: 1.5 g琼脂糖+0.5 \times TBE至终体积100 mL, 加入溴化乙锭(EB)至终浓度0.5 mg/L。(以DL2000为DNA Marker)每孔加样10 μ L, 90 V电泳50 min左右, 紫外透射灯下观察结果, 用凝胶图像扫描分析系统扫描凝胶得到内参对照GAPDH与目的基因的电泳条带光密度, 通过目的基因/GAPDH的光密度比值做相对定量分析。

1.2.4 凝胶电泳迁移率实验: 参照文献[4]方法经g-³²P-dATP标记、乙醇沉淀纯化的NF- κ B寡核苷酸探针与核蛋白作用后, 行6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后小心取出凝胶在干燥仪烘干, -70°C放射自显影24 h, 经凝胶扫描分析系统进行吸光度扫描, 计算其活性值。

统计学处理 采用SPSS软件包t检验。

2 结果

2.1 APS抑制LPS刺激细胞分泌TNF- α 和IL-8

表 1 APS对LPS刺激小肠上皮细胞分泌的TNF- α 、IL-8 mRNA的影响(mean \pm SD)

	对照组	LPS+ APS组				
		0	50	100	200	500
TNF- α	0.65 \pm 0.05	1.26 \pm 0.06 ^b	0.96 \pm 0.03 ^c	0.80 \pm 0.08 ^c	0.74 \pm 0.07 ^d	0.59 \pm 0.04 ^d
IL-8	0.57 \pm 0.06	1.19 \pm 0.05 ^b	0.88 \pm 0.06 ^c	0.74 \pm 0.06 ^c	0.62 \pm 0.08 ^d	0.52 \pm 0.05 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs LPS组.

表 2 不同时间APS对LPS刺激小肠上皮细胞分泌的TNF- α 、IL-8 mRNA的影响(mean \pm SD)

	LPS				
	-	1 h		4 h	
		-	-	APS	-
TNF- α	0.65 \pm 0.04	0.92 \pm 0.07	0.72 \pm 0.02	0.81 \pm 0.05	0.63 \pm 0.04
IL-8	0.61 \pm 0.07	1.17 \pm 0.06	0.78 \pm 0.03	0.91 \pm 0.04	0.58 \pm 0.05

mRNA LPS刺激IEC-6细胞可导致其分泌的炎症因子增多. 我们检测APS对LPS所致的IEC-6细胞分泌TNF- α 和IL-8在mRNA水平上的影响. RT-PCR分析方法检测显示, 当LPS刺激IEC-6细胞时, TNF- α 和IL-8 mRNA被诱导分泌具有显著意义的增加($P < 0.01$), APS可以抑制这种分泌的增加, 并具有剂量依赖性. APS 50 mg/L可部分抑制, 200 mg/L, 500 mg/L随着浓度的增加, 其抑制水平逐渐增加($P < 0.01$)(图1, 表1).

我们采用了将IEC-6细胞用500 mg/L APS预处理1 h, 然后用LPS(10 mg/L)刺激达4 h, 采用RT-PCR方法进行TNF- α 和IL-8 mRNA分析. 如图2所示, LPS诱导TNF- α mRNA和IL-8 mRNA表达均被ASP有效的抑制(1 h与4 h的抑制率分别为21.7%与22.2%, 33.3%与36.2%)(表2).

2.2 APS抑制LPS诱导IEC-6细胞产生NF- κ B蛋白表达 LPS刺激IEC-6细胞可使其分泌的炎症因子增多. NF- κ B是一个关键的调控炎症因子基因表达的核因子. 如图3所示, 凝胶电泳迁移率方法检测显示, 当LPS刺激IEC-6细胞时, NF- κ B蛋白表达具有显著意义的增加($P < 0.01$), APS可以显著抑制这种增加, 并且具有剂量依赖性($P < 0.01$, 表3).

3 讨论

小肠上皮细胞(IEC)在消化中起着吸收和交换营养及黏膜屏障作用, 同时在宿主黏膜表面的天然及获得性免疫系统中起调节作用, 是对抗肠道细菌、毒素的第一道防线^[5-6], 在IEC的潜在刺激因素中, 细菌和细菌产物(如LPS)都是非常重

相关报道

国内路景涛 *et al* 研究指出: 复方黄芪提取物能够抑制细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放的肿瘤坏死因子, 白细胞介素和二氧化氮的分泌. 他的研究证实黄芪可以通过抑制炎症因子的分泌从而减少组织细胞的损伤而发挥免疫保护作用.

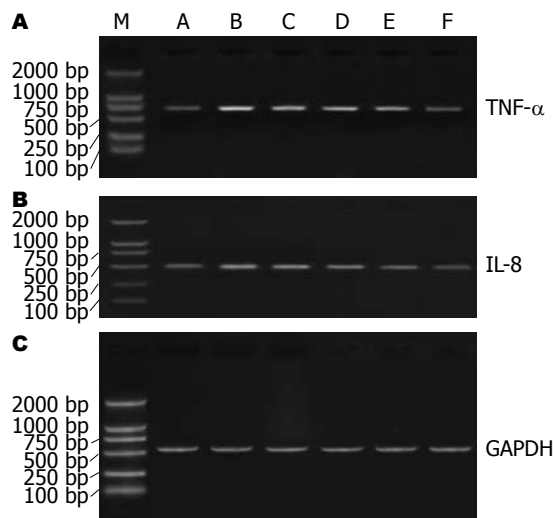


图 1 TNF- α 、IL-8基因RT-PCR电泳结果. M: Marker; A: 正常对照组; B: LPS+APS 0 mg/L组; C: LPS+APS 50 mg/L组; D: LPS+APS 100 mg/L组; E: LPS+APS 200 mg/L组; F: LPS+APS 500 mg/L组.

要的因素, 因为他们在肠道内的浓度非常高^[5,7]. 虽然IEC对LPS的反应较单核巨噬细胞弱, 但是大量实验表明内毒素可以引发IEC前炎症因子的基因转录^[8-13], 这其中也包括IEC-6^[5,14-15]. 肠腔内毒素具有引发IEC复杂的细胞因子基因转录的作用, 目前认为IEC参与了多种小肠炎症紊乱过程并具有重要意义.

黄芪是常用的益气健脾中药之一. 国内对其药理作用的研究较为深入, 涉及免疫、胃肠运动、促进胃肠黏膜细胞增殖、分化、移行等^[1,16-17]. APS是黄芪的单体成分, 其具有的免疫保护作用越来越多的得到重视. 国内路景涛

应用要点

本文以体外培养小肠上皮细胞为研究模型,从细胞水平直接研究黄芪的免疫调节作用,首次提出黄芪多糖发挥肠道免疫保护作用可能通过抑制小肠上皮细胞内核因子NF- κ B的表达从而抑制细胞因子TNF- α 和IL-8等的表达来实现的。

表 3 APS对LPS刺激小肠上皮细胞产生的NF- κ B蛋白的影响(mean \pm SD)

	APS(mg/L)					
	0	0	50	100	200	500
LPS	-	+	+	+	+	+
NF- κ B	0.07 \pm 0.03	2.76 \pm 0.07 ^b	2.11 \pm 0.05 ^c	1.71 \pm 0.06 ^c	1.19 \pm 0.07 ^d	0.59 \pm 0.06 ^d

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

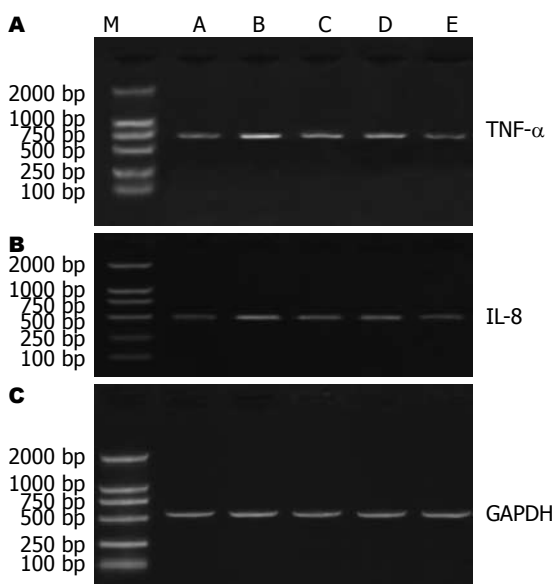


图 2 TNF- α 、IL-8基因RT-PCR电泳结果。M: Marker; A: 正常对照组; B: 1 h APS 0 mg/L组; C: 1 h APS 500 mg/L组; D: 4 h APS 0 mg/L组; E: 4 h APS 500 mg/L组。

et al^[18]研究证实了复方黄芪提取物能够抑制细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放的肿瘤坏死因子、白细胞介素和一氧化氮的分泌,说明黄芪可以通过抑制炎症因子的分泌从而减少组织细胞的损伤来发挥其对机体的免疫保护作用。

我们采用体外培养的IEC-6为模型,观察APS是否可以对LPS诱导的IEC-6释放TNF- α 、IL-8等细胞因子有所影响。结果发现APS能够抑制LPS刺激IEC-6细胞分泌产生的TNF- α mRNA及IL-8 mRNA的表达,且这种抑制作用具有对黄芪多糖的浓度依赖性。同时还发现NF- κ B作为一种调控多种炎症因子基因表达的核因子,当LPS刺激IEC-6时,NF- κ B蛋白表达增加,而APS能够有效的抑制NF- κ B蛋白表达的增长,且随着APS浓度的增加,抑制NF- κ B的作用逐渐增强。故我们认为,APS对小肠上皮细胞具有免疫保护作用,这种免疫保护作用可能是通过抑制小肠上皮细胞内核因子NF- κ B的表达从而抑制细胞因子TNF- α 、IL-8等的表达来实现的。

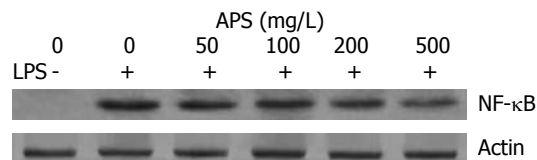


图 3 NF- κ B蛋白检测结果。

通过研究,我们首次提出APS发挥肠道免疫调节作用的可能机制,同时也为临床上使用APS治疗肠道功能障碍等疾病提供了理论依据,为临床上治疗及阻止MSOF的发生提供一种新的治疗手段。

4 参考文献

- 徐毅,王守富,张英,李秋风. 黄芪注射液对体液免疫功能的影响. 临床医学 1998; 18: 17-18
- 张仲平,洪介民. 黄芪多糖对外人骨髓造血细胞生成的影响. 中药药理与临床 2000; 16: 16-17
- 刘兵荣,肖瑾,丁新生. 黄芪多糖干预实验性脑出血后血肿周围细胞凋亡及核因子 κ B表达的变化. 中国临床康复 2006; 10: 13-15
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270: 14214-14219
- Haller D, Jobin C. Interaction between resident luminal bacteria and the host: can a healthy relationship turn sour? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 123-136
- Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000; 130: 396S-402S
- Kraehenbuhl JP, Corbett M. Immunology. Keeping the gut microflora at bay. *Science* 2004; 303: 1624-1625
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972
- Cetin S, Dunklebarger J, Li J, Boyle P, Ergun O, Qureshi F, Ford H, Upperman J, Watkins S, Hackam DJ. Endotoxin differentially modulates the basolateral and apical sodium/proton exchangers (NHE) in enterocytes. *Surgery* 2004; 136: 375-383
- Haller D, Holt L, Parlesak A, Zanga J, Bauerlein A, Sartor RB, Jobin C. Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor-kappaB activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal

epithelial cells. *Immunology* 2004; 112: 310-320

11 Kim YS, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of thalidomide on the stimulation of NF-kappaB activity and TNF-alpha production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. *Mol Cells* 2004; 17: 210-216

12 Kojima K, Musch MW, Ropeleski MJ, Boone DL, Ma A, Chang EB. Escherichia coli LPS induces heat shock protein 25 in intestinal epithelial cells through MAP kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G645-G652

13 Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 5398-5405

14 Haller D, Holt L, Kim SC, Schwabe RF, Sartor RB, Jobin C. Transforming growth factor-beta 1 inhibits non-pathogenic Gram negative bacteria-induced NF-kappa B recruitment to the interleukin-6 gene promoter in intestinal epithelial cells through modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 23851-23860

15 Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem* 2002; 277: 38168-38178

16 张子理, 陈蔚文. 黄芪注射液通过激活鸟氨酸脱羧酶促进IEC-6细胞分化的研究. *中国中西医结合杂志* 2002; 22: 439-443

17 郑天珍, 李伟, 瞿颂义, 丁永辉, 卫玉玲. 黄芪对大鼠离体胃平滑肌条运动的影响. *中药药理与临床* 1999; 15: 22-24

18 路景涛, 陈敏珠. 复方黄芪提取物对细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF- α 、NO及IL-1的影响. *安徽医药* 2006; 10: 330-331

同行评价
本文研究方法设计合理, 结果可靠, 对临床工作具有很强的指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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\临床科学\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].

Dickkopf-1克隆及其抗结肠癌作用

李甲初, 左渝平, 刘洋, 曾昭淳

背景资料
Wnt信号的转导由Wnt和Frizzled受体结合引起, 需要低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)的参与。Dickkopf1(Dkk1)通过两种途径抑制Wnt信号转导: 与LRP5/6结合, 阻断Wnt信号; 与另一类跨膜蛋白Kremen1/2结合, 刺激LRP5/6内吞, 减少细胞膜上的LRP5/6, 进一步调节Wnt信号。Dkk1蛋白通过调节Wnt和p53信号促进肿瘤细胞凋亡。

李甲初, 左渝平, 刘洋, 曾昭淳, 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室 重庆市生物化学与分子药理重点实验室 重庆市 400016

李甲初, 重庆医科大学生物化学与分子生物学硕士生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

通讯作者: 曾昭淳, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆市生物化学与分子药理重点实验室. zengzc88@yahoo.com.cn

电话: 023-68485398

收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-10-03

Anti-colon carcinoma mechanism of cloned Dickkopf-1

Jia-Chu Li, Yu-Ping Zuo, Yang Liu, Zhao-Chun Zeng

Jia-Chu Li, Yu-Ping Zuo, Yang Liu, Zhao-Chun Zeng, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing Biochemistry and Molecular Pharmacology Main Laboratory, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Dr. Zhao-Chun Zeng, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing Biochemistry and Molecular Pharmacology Main Laboratory, 1 Medical Road, Yuzhong District, Chongqing 400016, China. zengzc88@yahoo.com.cn

China. zengzc88@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-11 Revised: 2007-10-03

Abstract

AIM: To clone the cDNA of Dickkopf-1 (Dkk1) and to investigate its anti-colon carcinoma activity.

METHODS: Getting Dkk1 cDNA from Mouse Embryo 9 dpc, DH10B cDNA library, constructing eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-Dkk1. Transfected CT26 colon carcinoma cells served as the experimental group, transfection empty vector pcDNA3.1(+) cells served as the empty vector group, and non-transfected cells as the non-transfected group. Proliferation of the CT26 colon carcinoma cells was measured using the MTT assay. Expression of Dkk1, p53, Bcl-2 and Bax was detected by Western blotting.

RESULTS: Absorbance at 570 nm in the experimental group was lower than that in the empty vector and non-transfected groups (0.779 ± 0.025

vs 0.968 ± 0.016 and 0.973 ± 0.016 , $P < 0.05$). In contrast with the empty vector and non-transfected groups, the level of p53 and Bcl-2 in CT26 cells was lower, and the level of Dkk1 and Bax was higher.

CONCLUSION: Inhibition of CT26 cell proliferation by Dkk1 expression may be mediated by Dkk1 blocking mutant p53, decreasing Bcl-2 and enhancing Bax expression.

Key Words: Dickkopf-1; p53; Colorectal carcinoma; Western blotting

Li JC, Zuo YP, Liu Y, Zeng ZC. Anti-colon carcinoma mechanism of cloned Dickkopf-1 cDNA. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 20-24

摘要

目的: 探讨Dkk1 cDNA抗结肠癌的机制。

方法: 利用脂质体介导pcDNA3.1(+)-Dkk1进行瞬时转染结肠癌细胞CT26和表达Dkk1的肝癌细胞HEPA1-6, 转染后的细胞为实验组, 转染空载体pcDNA3.1(+)的细胞和未转染的细胞分别为空载体组和未转染组, 用MTT法检测CT26增殖、免疫印迹法检测细胞Dkk1, p53, Bcl-2和Bax的表达量。

结果: MTT实验显示在570 nm的吸光度均值CT26实验组明显低于其空载体组和未转染组 (0.779 ± 0.025 vs 0.968 ± 0.016 , 0.973 ± 0.016), $P < 0.05$); 与CT26空载体组和未转染组相比, 实验组p53, Bcl-2的表达量降低、而Dkk1、Bax表达增高。

结论: 外源Dkk1可反馈抑制突变型p53的生成, 下调Bcl-2, 增加Bax因子表达而抑制结肠癌的增殖。

关键词: Dickkopf-1; p53; 结肠癌; 免疫印迹法

李甲初, 左渝平, 刘洋, 曾昭淳. Dickkopf-1克隆及其抗结肠癌作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 20-24

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/20.asp>

0 引言

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制并不完全清楚. Wnt信号的异常是导致恶性肿瘤的原因之一^[1-2]. 脊椎动物的Dkk蛋白有Dkk1、Dkk2、Dkk3和Dkk4四种形式, 他们有较高同源性, 均抑制Wnt信号^[3-4], 其中Dkk1作用最强^[5], 在胚胎头颈形成起重要作用^[6]. 哺乳动物的Dkk1含266个氨基酸残基, 在不同的肿瘤表达水平不同. 在人类胃肠道肿瘤中, DKK家族基因常常被后天灭活^[7-8], Dkk1蛋白减少或缺失. Shou *et al*^[9]在人胶质母细胞瘤U87MG细胞中, 也没有检测到Dkk1的表达. 而在肝癌^[10-11]、黑色素瘤^[12]、肺癌^[13]Dkk1水平则增高. Mikheev *et al*^[14]在HeLa细胞表达的外源Dkk1显著地抑制其在软琼脂上的生长, 其生长动力学参数在统计学上与HeLa细胞有显著差异. 如果将Dkk1基因转入U87MG细胞, 表达中等水平的Dkk1蛋白, 再用神经酰胺(ceramide)处理, 细胞则出现显著凋亡^[9]. 两者均显示在Dkk1水平低下时, 表达外源性Dkk1可以抑制细胞生长, 促进细胞凋亡. 这可能是通过调节Wnt和p53信号而发挥作用的. p53能诱导Dkk1的表达^[15-16], Dkk1蛋白能抑制Wnt信号, 增强p53对肿瘤生长的抑制作用. Gonzalez-Sancho *et al*^[17]发现Dkk1启动子上有多个 β -catenin/TCF4结合位点. 激活Wnt信号途径, 活性的 β -catenin, TCF4或者LRP6突变体均可诱导人类Dkk1转录. 结肠癌细胞里缺失Dkk1或水平降低, Dkk1的表达起抑制肿瘤增殖的作用. 我们将考察Dkk1的抗结肠癌作用, 研究其可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞HEPA1-6和结肠癌细胞CT26, 由重庆医科大学病理教研室惠赠, 用含100 mL/L小牛血清RPMI 1640(Gibco)培养基, 在37°C、50 mL/L CO₂培养箱中传代培养. 利用脂质体介导pcDNA3.1(+)-Dkk1进行瞬时转染结肠癌细胞CT26, 转染后的细胞为实验组, 转染空载体pcDNA3.1(+)-Dkk1的细胞和未转染的细胞作为对照组. mouse embryo 9 dpc, DH10B cDNA文库购自德国RZPD公司, 限制性内切酶BamH I和Hind III, T4 DNA连接酶、高保真Taq DNA聚合酶(TaKaRa)、质粒提取试剂盒(上海生工)、PCR产物回收纯化试剂盒、DNA胶回收试剂盒、低分子量蛋白质标准、TMB显色液(Tiangen)、Transfection转染试剂(天为时代公司)、四甲基偶

氮唑盐(MTT、百萃生物)、PVDF膜(北京中山). 一抗: 兔抗鼠、人的Dkk1, p53, Bcl-2, Bax(IgG Santa Clauz), 兔抗二抗(中杉金桥).

1.2 方法 根据Dkk1的DNA序列, 设计PCR引物如下, 上游引物: 5'-CGCCAAGCTTTTAGTGCTCTGGCAGGTGTGGAGCCTAGAA-3', 在5'端引入HindIII酶切位点. 下游引物: 5'-ATAAGGATCCATGATGGTTGTGTGTGCAGCGGCAGCT-3', 在5'端引入了BamH I酶切位点. 菌落PCR, 用牙签在mouse embryo 9 dpc, DH10B cDNA培养面上蘸一下后丢入LA培养基5 mL中, 在37°C剧烈震荡培养12-16 h后, 培养液浑浊时, 用接种环在含Amp 100 mg/L的LB培养基上划线, 37°C倒置培养16 h以后, 在培养板上随机挑取9个克隆做PCR并设立阴性对照. PCR反应参数如下: 94°C变性1 min, 50°C复性2 min, 72°C延伸2 min, 共30个循环. PCR产物用凝胶回收试剂盒纯化、测序确认后, T-A克隆入pGM-T载体, Amp筛选, BamH I和HindIII双酶切, 琼脂糖电泳回收850 bp左右的小片段DNA, 亚克隆入BamH I和HindIII双酶切pcDNA3.1(+)-真核表达质粒, 构成pcDNA3.1 Dkk1. 琼脂糖电泳, 回收重组载体pcDNA3.1 Dkk1, 酶切和PCR鉴定.

1.2.1 MTT实验: 用pcDNA3.1-Dkk1和pcDNA3.1(+)-质粒在Lipofectamine™脂质体的介导下转染上述细胞. 以pEGFP-C1载体为报告基因监测转染结果. 取DNA 2 μ g, Transfection 5 μ L分别用无血清培养基稀释至250 μ L. 用胰酶消化细胞, 取 0.4×10^6 细胞与上述2种液体混合, 培养, G418筛选, 6 d后, 取 4×10^5 细胞加入到96孔板中, 继续培养24 h后每孔加入MTT至终浓度50 mg/L, 37°C继续培养4 h, 吸出培养液, 每孔加入DMSO g/L 150 μ L, 酶标仪上振荡10 min测定570 nm处吸光度. 细胞抑制率 = [pcDNA3.1(+)-组A₅₇₀-pcDNA3.1-Dkk1组A₅₇₀]/[pcDNA3.1(+)-组A₅₇₀] $\times 100\%$.

1.2.2 Western blot分析: 提取各组细胞总蛋白, Lowry法测定蛋白含量, 取等量蛋白进行12% SDS-PAGE, 转PVDF膜, 30 g/L BSA/TBS溶液8 mL封闭, 洗膜3次, 将一抗(兔抗鼠、人p53, Bcl-2, Bax, Dkk1)分别以1:1000适当稀释于5 g/L BSA/TBS中37°C孵育至少1 h, 弃去一抗用TBS洗2次, 每次10 min; 弃去TBS, 加入适当稀释1:500于5 g/L BSA/TBS的二抗, 37°C孵育2 h; 弃去二抗, 用TBS洗膜30 min, 共3次, 显色.

研发前沿 肿瘤的基因治疗是手术、放射、化疗之后的新疗法. Dkk1在某些肿瘤细胞的低表达, 为导入外源Dkk1治疗这些肿瘤提供了前提条件. 研究Dkk1的细胞内水平的调控, 与其他信号途径的相互作用, 对细胞增值影响的机制, 获得相关的信息是当前热点. 这为肿瘤Dkk1的基因治疗、研发与Dkk1相关的肿瘤治疗药物打下坚实的基础.

创新盘点

本文介绍了用MTT法显示外源Dkk1基因在CT26细胞的表达对细胞的增殖具有一定的抑制作用,免疫印吸方法显示了在结肠癌CT26细胞中的Dkk1、Bax表达低于、Bcl-2、p53表达高于pcDNA3.1(+)-Dkk1转染的CT26细胞。转染Dkk1后, p53水平降低。推测外源Dkk1表达可反馈抑制突变的p53生成,抑制癌细胞的增殖。最近也报道Dkk1在某些肿瘤细胞的表达是低下的,这不是突变引起的,而是表达受阻,原因在转录水平。而在翻译水平抑制尚未见报道。

表1 外源表达Dkk1对细胞增殖的影响(mean ± SD, n = 8)

	-	pcDNA3.1	pcDNA3.1Dkk1
CT26	0.973 ± 0.016	0.968 ± 0.016	0.779 ± 0.025 ^a
HEPA1-6	0.950 ± 0.029	0.943 ± 0.032	0.970 ± 0.013

^aP < 0.05 vs PCDNA3.1.

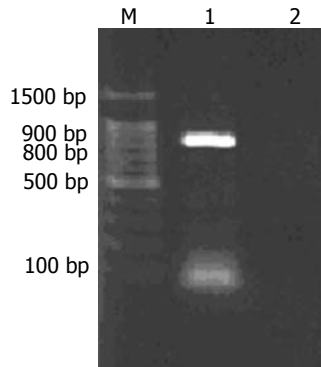


图1 PCR扩增Dkk1 cDNA。1: 菌液; 2: 阴性对照; M: 100 bp的DNA分子量标准。

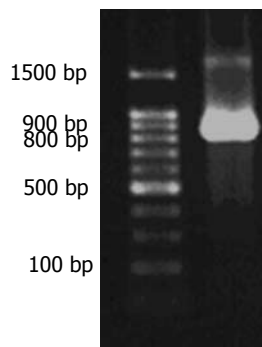


图2 克隆的Dkk1 cDNA的鉴定。右: 所提的质粒为模板, PCR所得到的目的条带(800-900 bp); 左: 100 bp DNA标准分子量。

2 结果

阴性对照管没有条带, 而1号管出现一条大小在800-900 bp间的条带, 符合Dkk1 cDNA大小, 测序后确认即为Dkk1 cDNA, 没有碱基突变(图1)。对pcDNA3.1(+)-Dkk1进行PCR, 结果条带大小在800-900 bp之间, 与Dkk1 cDNA大小相符合(图2)。HindIII和BamHI双酶切pcDNA3.1(+)-Dkk1载体, 产生两个片段。大片段在4361-6557 bp之间, 与载体pcDNA3.1大小相符; 小片段与Dkk1 cDNA大小相符(图3)。

2.1 MTT细胞增殖实验 用脂质体介导pcDNA3.1(+)-Dkk1瞬时转染结肠癌细胞CT26和表达Dkk1的肝癌细胞HEPA1-6(对照), MTT法检测细胞的增殖。CT26与对照组比较, 570 nm吸光度明显降低, 外源的Dkk1在CT26表达可以抑制其增殖, 抑制率约为20%。而HEPA1-6细胞及其相应的对照在570 nm吸光度没有明显的变化(表1)。t检验显示CT26实验组和对照组有显著性差异P < 0.05, 其余各组间无显著

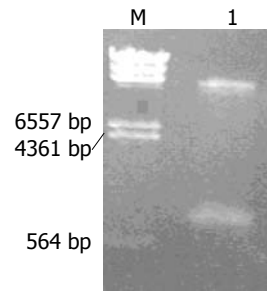


图3 pcDNA3.1(+)-Dkk1双酶切鉴定。M: λ噬菌DNA HindIII酶切的Marker; 1: HindIII和BamHI双酶切pcDNA3.1(+)-Dkk1所得: 大片段为pcDNA3.1(+), 小片段为Dkk1。

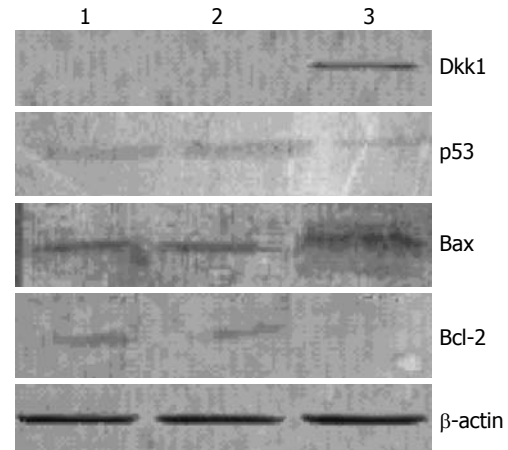


图4 Western blot分析结肠癌CT26细胞总蛋白中的p53、Bcl-2、Bax蛋白水平。1: 未转染; 2: 转染空载体; 3: 转染pcDNA3.1(+)-Dkk1。

性差异。

2.2 免疫印迹分析 实验组3相对于对照组1和2, 蛋白质p53和Bcl-2的量是少的, 而蛋白质Bax的量, 实验组相对于对照组来说是多的(图4)。

3 讨论

Dkk1在结肠癌细胞表达缺失, 是否起抑癌基因的作用尚待证实。我们从mouse embryo 9 dpc, DH10B cDNA文库筛选出Dkk1 cDNA, 经测序确认后亚克隆入pcDNA3.1(+)-构建了pcDNA3.1 Dkk1真核表达载体, 转染结肠癌细胞CT26, 用MTT法测570 nm吸光度, CT26pcDNA3.1 Dkk1组高于CT26pcDNA3.1(+)-实验低于对照组, t检验有显著性差异。表明外源的Dkk1在CT26表达可以抑制其增殖, 抑制率约为20%, 抑制率不太高, 可能与转染效率(约为28.3%)和抑制不具有放大作用有关。而在肝癌细胞HEPA1-6, 表达外源的Dkk1不抑制其增殖。免疫印迹分析细胞总蛋白中p53的含量, CT26、CT26pcDNA3.1(+)-高于CT26pcDNA3.1 Dkk1(图4)。Gonzalez-Sancho *et al*^[17]发现在Dkk1启动子-2100位有一个p53响应元件, 野生p53蛋白与之特异结合, 促进Dkk1转录。在CT26检测不到Dkk1, 可能是突变p53蛋白丧失诱导Dkk1转录的能力。外源Dkk1基因在

结肠癌细胞内的表达, 反馈抑制突变p53的表达, 致使其量减少, 肿瘤细胞的增殖受抑. 肿瘤既是细胞增殖和分化异常、也是细胞凋亡异常的疾病. Bcl-2家族基因参与细胞凋亡的调节, Bcl-2蛋白拮抗^[18]、而Bax蛋白则促进细胞凋亡^[19], 二者的作用相反. 细胞内的Bax和Bcl-2含量对比决定其生存与凋亡^[20]. 我们发现CT26中Bax蛋白的量在pcDNA3.1(+)组要低于pcDNA3.1 Dkk1组, 而Bcl-2蛋白的量则是pcDNA3.1(+)组要高于pcDNA3.1 Dkk1组(图4), 表明在Dkk1抑制肿瘤细胞增殖时, 与Bax和Bcl-2蛋白作用有关. Dkk1蛋白在许多肿瘤中都存在. Wirths *et al*^[11]指出, Dkk1在肝母细胞瘤(HBs)和Wilms瘤中表达升高, 这可能和Wnt信号失控有关, 高水平的Dkk1可作为HBs和Wilms瘤的一个标记. 在Dkk1表达降低或者缺失的肿瘤, 外源的Dkk1表达或许可以抑制肿瘤增殖. Suraweera *et al*^[21]报道没有发现人结肠癌的Dkk1突变, 但Aguilera *et al*^[7]发现Dkk1启动子的CpG岛甲基化导致转录沉默. 有趣的是Mueller *et al*^[22]发现神经胶质瘤里Dkk1没有突变, 其转录也不受p53调节, 他不是该肿瘤的主要致病因素. 是否Dkk1蛋白也具有突变型和野生型? 如果有, 是否突变的蛋白具有致癌而野生型具有抑癌作用; Dkk1抑制结肠癌的机制以及Dkk1在胞内的作用等还有待于进一步的研究.

4 参考文献

- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 497-506
- Hadjihannas MV, Bruckner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, Behrens J. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10747-10752
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 683-686
- Lee AY, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, Jablons DM. Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 1246-1250
- MacDonald BT, Adamska M, Meisler MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the double-ridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* 2004; 131: 2543-2552
- del Barco Barrantes I, Davidson G, Grone HJ, Westphal H, Niehrs C. Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction. *Genes Dev* 2003; 17: 2239-2244
- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4116-4121
- Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 2007
- Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 2002; 21: 878-889
- Patil MA, Chua MS, Pan KH, Lin R, Lih CJ, Cheung ST, Ho C, Li R, Fan ST, Cohen SN, Chen X, So S. An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 3737-3747
- Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kuhne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wntless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 2003; 83: 429-434
- Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 2006; 25: 5027-5036
- Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2007; 67: 2517-2525
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* 2004; 25: 47-59
- Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 2000; 19: 1843-1848
- Yang G, Zhang G, Pittelkow MR, Ramoni M, Tsao H. Expression profiling of UVB response in melanocytes identifies a set of p53-target genes. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2490-2506
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 2005; 24: 1098-1103
- Palozza P, Serini S, Maggiano N, Angelini M, Boninsegna A, Di Nicuolo F, Ranelletti FO, Calviello G. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis* 2002; 23: 11-18
- Mahyar-Roemer M, Kohler H, Roemer K. Role of

应用要点
Dkk1具有抑制肿瘤细胞增殖的作用, 但在某些肿瘤细胞的表达水平很低, 导入外源性Dkk1可以解决这一问题. 本课题已初步证实, Dkk1可以作为某些肿瘤基因治疗的目的基因.

同行评价
本文设计合理, 方法全面, 结果可信, 具有一定的科学性和研究价值

- Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* 2002; 2: 27
- 20 Paul-Samojedny M, Kokocinska D, Samojedny A, Mazurek U, Partyka R, Lorenz Z, Wilczok T. Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 25-29
- 21 Suraweera N, Robinson J, Volikos E, Guenther T, Talbot I, Tomlinson I, Silver A. Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int J Cancer* 2006; 119: 1837-1842
- 22 Mueller W, Lass U, Wellmann S, Kunitz F, von Deimling A. Mutation analysis of DKK1 and in vivo evidence of predominant p53-independent DKK1 function in gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109: 314-320

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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 - 12 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1-12月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-12-31, 世界华人消化杂志共收到稿件1525篇, 退稿627篇, 退稿率41.11%。发表文章773篇, 其中述评47篇(6.1%), 基础研究198篇(25.61%), 临床研究94篇(12.16%), 文献综述109篇(14.10%), 研究快报91篇(11.77%), 临床经验201篇(26.00%), 病例报告10篇(1.29%), 焦点论坛19篇(2.46%)。会议纪要4篇(0.5%), 英文摘要740篇(95.98%)。其中受国家级基金资助的177篇(22.96%), 省部级基金资助的247篇(32.04%)。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 2007-12-14)

阿泰宁对牛结肠黏膜蛋白诱发大鼠免疫性溃疡性结肠炎的治疗作用

王文杰, 王霖, 刘洋, 彭珊瑛, 张弗盈, 李萍, 万阜昌, 崔云龙

王文杰, 王霖, 刘洋, 彭珊瑛, 张弗盈, 李萍, 中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所 北京市 100050
万阜昌, 青岛市微生物生态工程技术研究中心 山东省青岛市 266400
崔云龙, 青岛东海药业有限公司 山东省青岛市 266400
王文杰, 1968年上海第二军医大学药理学系毕业, 研究员, 主要从事药理学研究工作。
系列微生物生态生物新药高技术产业化示范工程项目资助, No. 发改高技[2004]2078号
通讯作者: 崔云龙, 266400, 青岛胶南市上海中路8号, 青岛东海药业有限公司. donghaicuiyunlong@yahoo.com.cn
电话: 0532 - 87199868 传真: 0532 - 87199788
收稿日期: 2007-04-04 修回日期: 2007-11-17

Therapeutic effects of Ataining on immune ulcerative colitis induced by calf colonic mucosal protein in rats

Wen-Jie Wang, Lin Wang, Yang Liu, Shan-Ying Peng, Fu-Ying Zhang, Ping Li, Fu-Chang Wan, Yun-Long Cui

Wen-Jie Wang, Lin Wang, Yang Liu, Shan-Ying Peng, Fu-Ying Zhang, Ping Li, Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Fu-Chang Wan, Qingdao Center of Micro-ecology Engineering Technology Research, Qingdao 266400, Shandong Province, China

Yun-Long Cui, Qingdao East Sea Pharmaceutical Co. Ltd., Qingdao 266400, Shandong Province, China

Supported by: The Model Subject of High-tech Industrializing Conversion of Series Micro-ecological New Drugs [National Development and Reform Commission high-tech No. [2004]2078]

Correspondence to: Dr. Yun-Long Cui, Qingdao Eastern Sea Pharmaceutical Co. Ltd., 8 Shanghai Middle Road, Qingdao 266400, Shandong Province, China. donghaicuiyunlong@yahoo.com.cn

Received: 2007-04-04 Revised: 2007-11-17

Abstract

AIM: To study the therapeutic effects of Ataining (*Clostridium butyricum*, CGMCC 0313.1 strain) on immune ulcerative colitis (UC) induced by calf colonic mucosal protein (CCMP) in rats.

METHODS: Rats were randomly divided into: UC model + saline (group B), UC model + *C. butyricum* (10^{11} CFU/L) (group D), UC model +

C. butyricum (10^{10} CFU/L) (group E), UC model + mesalazine (5-SAS, 200 g/L) (group C), UC model + *C. butyricum* (10^{11} CFU/L) + 5-SAS (100 g/L) (group F), and non-UC model (group A). After 21 d, all animals were killed by decollation. Colon mucosal damage was observed by the naked eye. Body weight, colon wet weight, and ulcerative index were measured. Pathological changes in colon tissue were observed by microscopy. The conversion rate of T and B lymphocytes from intestinal mesentery was measured by MTT assay. Serum interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by ELISA. Serum IgG was determined by unilateral immune diffusion.

RESULTS: Rats with UC produced white mucous feces. After treatment, they all produced normal feces. Compared with group B, colon wet weight, pathological colon mucosal damage and pathological damage to the upper and middle regions of colon mucosa in groups C-F were significantly reduced. Conversion of T lymphocytes in C, D, E, F groups was significantly increased (1.53 ± 0.44 , 1.25 ± 0.49 , 1.39 ± 0.40 , 1.18 ± 0.41 vs 0.59 ± 0.20 , $P < 0.05$). The content of IL-8 in serum of groups C-F was significantly reduced (47.7 ± 16.9 ng/L, 39.7 ± 13.4 ng/L, 57.0 ± 8.6 ng/L, 31.9 ± 5.0 ng/L vs 81.0 ± 10.9 ng/L, $P < 0.01$), however, the decrease in group E was greater than that in group C. Serum TNF- α in groups D-F was significantly decreased (31.7 ± 11.2 ng/L, 47.2 ± 21.7 ng/L, 30.3 ± 17.1 ng/L vs 78.0 ± 12.3 ng/L). Serum IgG in groups D and F was reduced (9.6 ± 1.8 g/L, 7.5 ± 0.2 g/L vs 11.9 ± 0.4 g/L, $P < 0.05$).

CONCLUSION: A rat model of UC could be induced by CCMP. Pathological changes in UC appear in the colonic mucosa, level of IL-8, TNF- α and IgG were significantly increased, and conversion of T lymphocytes was significantly reduced. *C. butyricum* significantly improved these changes. *C. butyricum* and 5-SAS may have synergistic therapeutic effects.

背景资料
炎性肠病(溃疡性结肠炎和克罗恩病)在世界范围内日见增多,我国该病的发病率也有日益增加的趋势,且无有效治疗药物和措施,复发率高。所以,医药和临床研究工作正在努力寻找有效的治疗药物和措施,本文课题组也试图从酪酸梭菌生态制剂方面打开新的突破口,找到安全有效的治疗新药和措施。

研发前沿
应用生态制剂
治疗炎性肠病的
报道日见增多,特
别是酪酸梭菌微
生态制剂显示了
良好的应用前景,
但亟待了解其有
效治疗的作用机
制。目前研究的
重点是酪酸梭菌
生态制剂对UC模
型及患者免疫方
面的影响。

Key Words: Immune ulcerative colitis; Ataining; Mesalazine; *Clostridium butyricum*

Wang WJ, Wang L, Liu Y, Peng SY, Zhang FY, Li P, Wan FC, Cui YL. Therapeutic effects of Ataining on immune ulcerative colitis induced by calf colonic mucosal protein in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 25-32

摘要

目的: 观察阿泰宁对牛结肠黏膜蛋白(CCMP)诱发大鼠免疫性溃疡性结肠炎(UC)的治疗作用及机制。

方法: 将大鼠随机分为空白对照A组($n = 8$), 模型B组($n = 10$), 美沙拉秦(5-SAS)C组($n = 10$), 阿泰宁大, 小剂量D, E组(10^{11} CFU/L, 10^{10} CFU/L), 阿泰宁大剂量+美沙拉秦F组($n = 10$), 21 d后处死动物, 肉眼观察结肠病变, 分别测体质量、结肠湿质量、溃疡指数和结肠组织病理学变化, 用MTT法测定各组肠系膜T/B淋巴细胞转化率, ELISA法测定大鼠血清中IL-8和TNF- α 含量, 单向免疫扩散法测定血清样品中IgG含量。

结果: B, C, D, E组大鼠体质量均小于A组, 但没有显著性差异。B组大多数大鼠排出的便呈白色, 黏液且质软, 治疗后排便均正常, 结肠病变均减轻。C、D、E组大鼠的肠湿质量指数和溃疡指数得分以及D、E和F组的结肠中上段肠黏膜病变积分与B组均显著降低。与B组相比, C、D、E和F组的T淋巴细胞转化率显著增高(1.53 ± 0.44 , 1.25 ± 0.49 , 1.39 ± 0.40 , 1.18 ± 0.41 vs 0.59 ± 0.20 , $P < 0.05$)。而血清中IL-8含量均显著降低(47.7 ± 16.9 ng/L, 39.7 ± 13.4 ng/L, 57.0 ± 8.6 ng/L, 31.9 ± 5.0 ng/L vs 81.0 ± 10.9 ng/L, $P < 0.01$)。D、E、F组血清中TNF- α 和D、F组IgG的含量均显著降低(TNF- α : 31.7 ± 11.2 ng/L, 47.2 ± 21.7 ng/L, 30.3 ± 17.1 ng/L vs 78.0 ± 12.3 ng/L; IgG: 9.6 ± 1.8 g/L, 7.5 ± 0.2 g/L vs 11.9 ± 0.4 g/L, $P < 0.05$)。

结论: 用CCMP可使大鼠结肠黏膜出现典型UC病变, 并伴随IL-8、TNF- α 、IgG致炎因子显著升高, T淋巴细胞转化率显著减低。用阿泰宁治疗后, IL-8、TNF- α 及IgG的表达下调, T淋巴细胞转化升高, 肠黏膜溃疡被修复。阿泰宁和美沙拉秦有协同作用。

关键词: 免疫性溃疡性结肠炎; 阿泰宁; 美沙拉秦; 酪酸梭菌

王文杰, 王霖, 刘洋, 彭珊瑛, 张弗盈, 李萍, 万阜昌, 崔云龙. 阿泰宁对牛结肠黏膜蛋白诱发大鼠免疫性溃疡性结肠炎的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 25-32
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/25.asp>

0 引言

近年来, 用产丁酸的酪酸梭菌微生态制剂治疗溃疡性结肠炎(UC)的研究获得快速进展^[1-5], 并引起医学界的高度重视。我们在动物实验和临床应用中发现, 阿泰宁(酪酸梭菌CGMCC0313.1制剂)对动物及人的UC均有良好的治疗效果, 且阿泰宁与5-氨基水杨酸类药物联合使用, 或在缓解期单独使用, 均显示良好疗效、且联合应用的不良反应较少, 但其治疗机制不明。故我们采用较先进的结肠组织致敏法建立大鼠免疫性UC, 用美沙拉秦作对照, 用单个阿泰宁和阿泰宁+美沙拉秦联合进行实验性治疗, 来观察试药对损伤肠黏膜的修复情况, 并检测白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IgG的表达水平及T淋巴细胞转化率, 探讨其治疗机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 δ SD大鼠, 体质量180-220 g, 购自维通利华实验动物中心, 美沙拉秦片(市售), 阿泰宁(酪酸梭菌CGMCC0313.1制剂)和原料粉末由青岛东海药业有限公司提供, 弗氏完全佐剂、MTT、伴刀豆素球蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)和MTT为Sigma公司产品, 购自北京舒伯伟化工仪器有限责任公司, 1640培养液为Gibco公司产品, 牛结肠黏膜蛋白冻干粉自制, IL-8 ELISA试剂盒为BD公司产品, TNF- α ELISA试剂盒为Ebioscience公司产品, 大鼠IgG测定用参考血清和兔抗大鼠IgG抗血清购自北京天象仕达生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 牛结肠黏膜蛋白冻干粉的制备: 取新生小牛结肠, 刮取黏膜, 反复冻溶法获取牛结肠黏膜蛋白, 纯化浓缩, 真空冻干后于4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 大鼠免疫性UC模型的建立: 取牛结肠黏膜蛋白与完全弗氏佐剂(1:1)制成完全抗原, 选用体质量 200 ± 20 g的大鼠, 造模大鼠首次足跖内注射抗原4 mg/只, 于第10、17、24、31天分别于足跖、背部、腹股沟、腹腔内注射抗原6 mg/只, 最后1次注射不加佐剂, 至血清抗结肠抗体达到作用有效量。第35天模型组大鼠用异戊巴比妥钠ip麻醉, 并分别进行下列处理(处理前禁食24 h), 先用20 g/L的甲醛溶液1.5 mL灌肠, 留置1 h, 用生理盐水洗净后排去。再用抗原液(4 g/L, 不加佐剂)2 mL灌肠, 留置2 h, 然后洗净排去。3 d后, 随机抽取2只模型组大鼠处死, 取其结肠标本(肛门向上10 cm), 病理检查确认有充

血、水肿、炎细胞浸润和溃疡形成等一系列病理变化^[6-9]。

1.2.3 动物分组及治疗: 设空白对照组8只, 造模大鼠, 造模成功后随机分组, 模型组10只, 阳性药(美沙拉秦)对照组10只, 阿泰宁大剂量(10^{11} CFU/L)组10只, 阿泰宁小剂量(10^{10} CFU/L)组7只, 阿泰宁大剂量+美沙拉秦组10只(中途死亡4只)。各组动物按10 mL/kg. 体质量/次, ig, 1次/d(但阿泰宁大剂量+美沙拉秦组, 分隔为上午给阿泰宁, 下午给美沙拉秦各1次), 连续给药21 d. 期间每周称体质量一次, 并持续观察动物一般情况及粪便性状。

1.2.4 动物处理及相关指标测定: 各组动物给药至第21天后, 断头处死动物, 取血制备血清样品, 取结肠标本, 称量结肠湿质量, 结肠湿质量指数 = 结肠湿质量(g)/kg. 体质量. 将新鲜结肠肠管纵行切开, 清除肠内容物, 将结肠中上段和结肠下段分别编号, 固定在硬纸板上, 新鲜标本拍照后, 在100 g/L的甲醛液中固定, 按李兆申 *et al* 报道^[10]的方法, 用卡尺测量结肠黏膜上细条索状或线形出血性病变, 以全部病变总长度加以测量. 溃疡指数的计算: 病灶长度小于1 mm为1分, 1-2 mm为2分, 2-3 mm为3分, 3-4 mm为4分, 如病灶长度大于4 mm, 将其分为若干段, 每段按上法计分, 当病灶宽度大于2 mm时, 其得分加倍. 一只动物全结肠各病灶得分的总和为其溃疡指数. 然后将结肠段修成块, 用不同梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片厚度5 μ m, HE染色, 光镜检查, 显微组织彩色照相, 根据病变严重程度打分(轻度1分: 黏膜表面有少量分泌物, 黏膜下层轻微充血、水肿, 少量炎性细胞浸润; 中度2分: 黏膜表面有较多分泌物, 少量黏膜上皮脱落, 黏膜下层明显充血、水肿, 固有层大量炎性细胞浸润; 重度3分: 黏膜表面分泌物多, 黏膜上皮脱落多, 黏膜全层炎症, 杯状细胞减少, 出现溃疡病灶), 分别计算每组每只动物直肠及结肠下段和结肠中上段的病变积分, 得出平均数. 无菌环境下取大鼠肠系膜淋巴细胞, 过200目细胞筛, 无菌PBS洗涤两次, 1000 r/min, 5 min离心. 用完全1640培养液调整细胞浓度为 5×10^8 个/L, 每孔100 μ L, 接种于96孔圆底细胞板中, 同时加ConA(终浓度为3 mg/L)或LPS(终浓度为5 mg/L), 100 μ L/孔. 另设定空白对照孔(未加诱导剂), 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂孵育72 h, 培养结束前4 h, 加MTT(5 g/L)20 μ L, 培养结束后, 测定540 nm处测定其A值, 计算淋巴细胞刺激指数. 淋巴细胞刺激指数

(SI) = 刺激组A值/未刺激组A值. 断头处死大鼠, 取血, 于4 $^{\circ}$ C静置过夜, 3000 r/min, 20 min离心, 取上清, 分装, 放于-20 $^{\circ}$ C待测. 使用ELISA试剂盒, 按照说明书, 测定大鼠血清中IL-8和TNF- α 的含量. 使用单向免疫扩散法测定血清中IgG的含量, 将适当稀释(事先滴定)的诊断血清与溶化的20 g/L琼脂, 在60 $^{\circ}$ C水浴预热数分钟后等量混合制成免疫琼脂板. 在免疫琼脂板上按一定距离(1.2-1.5 cm)打孔, 在孔内加入一定比例稀释的参考血清或抗原液, 已经加样的免疫琼脂板置湿盒中37 $^{\circ}$ C温箱扩散24 h. 测定各孔形成的沉淀环直径(mm), 用参考血清各稀释度测定值绘出标准曲线, 再由标准曲线查出被检血清中IgG的含量^[8-10]。

统计学处理 各组间的数据差异的统计学显著性检验, 用*t*检验, 差异显著性界限为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 阿泰宁对免疫性UC大鼠体质量、粪便性状、结肠病变和结肠湿质量指数的影响 模型组和给药组大鼠体质量均小于正常对照组大鼠, 但没有显著性差异. 在造型期间模型组大多数大鼠排出的便呈白色, 黏液且质软, 期间有26%的大鼠因不能耐受免疫应答而死亡, 尸检见结肠肠管充气、有大量血性分泌物、肠黏膜充血水肿和溃烂等. 治疗后各给药组大鼠均排正常便, 结肠病变肉眼观察均有改善. 美沙拉秦组和阿泰宁大小剂量组大鼠的结肠湿质量指数均比模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 阿泰宁大剂量+美沙拉秦组肠湿重指数也低于模型组, 但没有显著性差异(表1)。

2.2 阿泰宁对免疫性UC大鼠结肠溃疡指数的影响 各个组溃疡指数得分均明显比模型组少($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中以阿泰宁大剂量组和阿泰宁+美沙拉秦组作用最好($P < 0.01$) (表2)。

2.3 阿泰宁对免疫性UC大鼠结肠溃疡病变的影响 空白对照组结肠上段偶见黏膜表面分泌物, 固有膜可见小灶性炎性细胞浸润(自发性炎症). 模型组大鼠全结肠均出现病变, 有1/3动物直肠和结肠上段黏膜表面可见分泌物, 黏膜上皮脱落, 固有层炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞. 1例细胞肠黏膜溃疡愈合病灶, 4例肠腺萎缩, 黏膜变薄, 2例肠腺杯状细胞减少, 结肠下段病变较重. 多数动物肠黏膜表面有分泌物, 上皮细胞脱落, 炎性细胞浸润. 4例动物肠黏膜发生溃疡愈

相关报道
关于溃疡性结肠炎的动物造型, 国内外报道较多的确是用醋酸或葡聚糖硫酸钠(DSS)给大、小鼠造成实验性溃疡模型并进行实验性治疗研究, 而用牛结肠黏膜蛋白制成抗原造成免疫性溃疡性结肠炎模型则尚属首次。

创新盘点

由于溃疡性结肠炎的发病与黏膜免疫及机体免疫功能的调控异常密切相关,所以,本研究创造性的用牛结肠黏膜蛋白作抗原,给大鼠注射造成免疫性溃疡性结肠炎模型,并进行了实验性治疗,检测到血清促炎因子(如肿瘤坏死因子等)伴随发病异常升高,经阿泰宁治疗好转后,促炎因子也趋于恢复正常,初步探明酪氨酸菌抑制剂阿泰宁有效治疗UC的作用机制是通过调控促炎因子恢复正常而起作用的,并进一步发现,阿泰宁与美沙拉秦有协同作用。

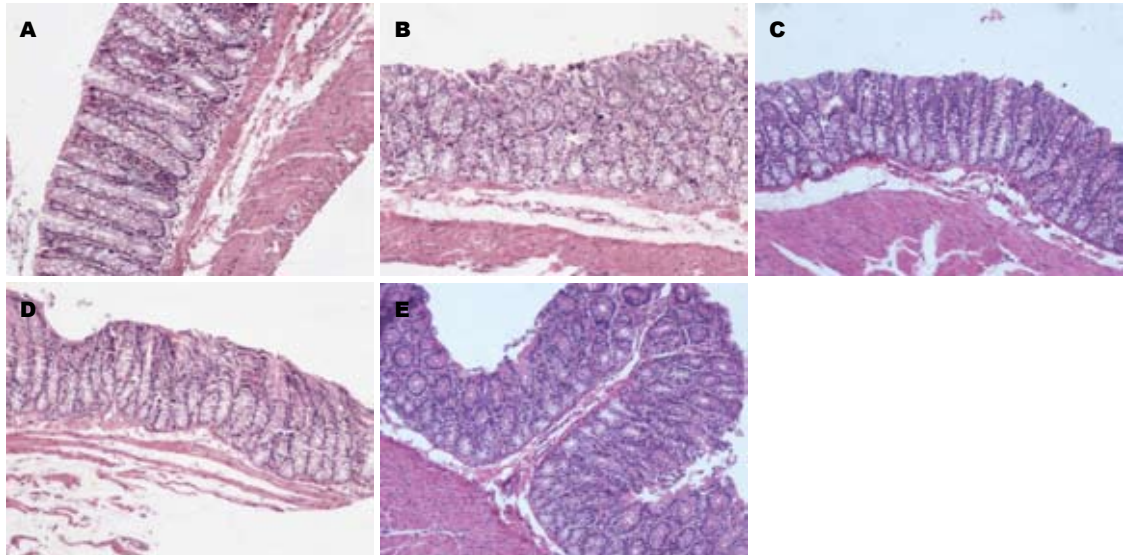


图1 大鼠结肠黏膜溃疡病变组间比较(HE × 50). A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阿泰宁组; D: 美沙拉秦组; E: 阿泰宁+美沙拉秦组。

表1 阿泰宁对免疫性UC大鼠体重、结肠湿质量指数和结肠溃疡指数的影响(mean ± SD)

分组	剂量	n	体重(g)	结肠湿质量指数(g/kg体重)	肠溃疡指数(积分)
正常对照组	-	8	513 ± 17	4.2 ± 0.4	0.0
模型组	-	10	486 ± 37	4.4 ± 0.4	28.7 ± 9.7
美沙拉秦组	200 g/L	10	483 ± 29	3.8 ± 0.3 ^b (<i>t</i> = 3.10)	15.4 ± 6.3 ^b (<i>t</i> = 3.63)
阿泰宁大剂量组	1 × 10 ¹¹ CFU/L	7	472 ± 25	3.9 ± 0.5 ^a (<i>t</i> = 2.29)	11.6 ± 8.4 ^b (<i>t</i> = 3.97)
阿泰宁小剂量组	1 × 10 ¹⁰ CFU/L	7	488 ± 43	3.9 ± 0.3 ^b (<i>t</i> = 3.97)	17.7 ± 9.3 ^a (<i>t</i> = 2.34)
阿泰宁+美沙拉秦组	1 × 10 ¹¹ CFU/L+100 g/L	6	474 ± 28	4.3 ± 0.5	12.8 ± 3.0 ^b (<i>t</i> = 3.85)

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 模型组。

合,在愈合处可见结缔组织增生,肠腺窝减少或消失.在溃疡愈合处炎性细胞浸润不明显.美沙拉秦组1例动物表明可见分泌物,3只动物肠黏膜脱落和炎性细胞浸润.3只动物肠黏膜发生溃疡愈合,1只动物肠腺萎缩,肠黏膜损伤积分与模型组的比较未见明显差异(*P* > 0.05).结肠中上段肠黏膜表面1例可见分泌物,3例肠黏膜上皮脱落,2例可见炎性细胞浸润和溃疡愈合,肠腺萎缩,肠黏膜损伤积分轻于模型组(*P* > 0.05).阿泰宁大小剂量组、阿泰宁+美沙拉秦组直肠、结肠下段肠黏膜病变较模型组和美沙拉秦组轻.肠黏膜损伤积分分别与模型组相比未见明显差异.阿泰宁大小剂量组、阿泰宁+美沙拉秦组的结肠中上段肠黏膜病变明显轻于模型组.病变积分分别与模型组比较差异显著(*P* < 0.05)和非常显著(*P* < 0.01)(表2,图1).

2.4 阿泰宁对免疫性UC大鼠肠系膜淋巴细胞转化率的影响 模型组大鼠与正常对照组比较,B淋巴细胞转化率无明显差异,各给药组的B淋巴

表2 阿泰宁对免疫性溃疡结肠炎大鼠结肠黏膜损伤积分的影响(mean ± SD)

分组	n	直肠、结肠下段	结肠中上段
空白对照组	3	0	1.0 ± 1.0
模型组	6	1.83 ± 1.17	3.2 ± 0.8
美沙拉秦组	6	2.17 ± 1.17	1.3 ± 1.3 ^a (<i>t</i> = 2.84)
阿泰宁大剂量组	6	1.17 ± 0.98	1.8 ± 0.8 ^a (<i>t</i> = 3.04)
阿泰宁小剂量组	6	1.00 ± 2.00	1.6 ± 1.1 ^a (<i>t</i> = 2.88)
阿泰宁+美沙拉秦组	6	1.00 ± 1.10	0.8 ± 0.9 ^b (<i>t</i> = 4.89)

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 模型组。

胞转化率与模型组比较,只有阿泰宁+美沙拉秦组有明显差异(*P* < 0.05),模型组的T淋巴细胞转化率比正常对照组显著低下(*P* < 0.01),而各给药组的T淋巴细胞转化率都比模型组显著地增高(*P* < 0.05或*P* < 0.01)(表3).

表 3 阿泰宁对免疫性UC大鼠肠系膜淋巴细胞转化率和血清IgG含量的影响($n = 5$, mean \pm SD)

分组	剂量	刺激指数(SI)		IgG(ng/L)	抑制率(%)
		B淋巴细胞转化率(%)	T淋巴细胞转化率(%)		
正常对照组	-	1.15 \pm 0.26	1.03 \pm 0.20	18.0 \pm 9.0	-
模型组	-	1.24 \pm 0.18	0.59 \pm 0.20 ^d ($t = 3.49$)	11.9 \pm 0.4 ^d ($t = 20.0$)	-
美沙拉秦组	200 g/L	1.05 \pm 0.22	1.53 \pm 0.44 ^b ($t = 4.37$)	12.0 \pm 1.8	-
阿泰宁大剂量组	1 \times 10 ¹¹ CFU/L	1.14 \pm 0.19	1.25 \pm 0.49 ^a ($t = 2.75$)	9.6 \pm 1.8 ^a ($t = 2.80$)	51
阿泰宁小剂量组	1 \times 10 ¹⁰ CFU/L	1.04 \pm 0.23	1.39 \pm 0.40 ^b ($t = 4.0$)	11.5 \pm 0.4	13
阿泰宁+美沙拉秦组	1 \times 10 ¹¹ CFU/L+100 g/L	0.91 \pm 0.11 ^a ($t = 3.3$)	1.18 \pm 0.41 ^a ($t = 2.95$)	7.5 \pm 0.2 ^b ($t = 22.1$)	100

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^d $P < 0.01$ vs 正常对照组.

表 4 阿泰宁对免疫性UC大鼠血清IL-8和TNF- α 含量的影响($n = 5$, mean \pm SD)

分组	剂量	IL-8 (ng/L)	抑制率(%)	TNF- α (ng/L)	抑制率(%)
正常对照组	-	37.3 \pm 14.7	-	18.0 \pm 9.0	-
模型组	-	81.0 \pm 10.9 ^d ($t = 5.36$)	-	78.0 \pm 12.3 ^d ($t = 8.84$)	-
美沙拉秦组	200 g/L	47.7 \pm 16.9 ^b ($t = 3.71$)	76	52.8 \pm 23.4	42
阿泰宁大剂量组	1 \times 10 ¹¹ CFU/L	39.7 \pm 13.4 ^c ($t = 5.37$)	95	31.7 \pm 11.2 ^b ($t = 6.25$)	77
阿泰宁小剂量组	1 \times 10 ¹⁰ CFU/L	57.0 \pm 8.6 ^b ($t = 3.88$)	55	47.2 \pm 21.7 ^a ($t = 2.77$)	51
阿泰宁+美沙拉秦组	1 \times 10 ¹¹ CFU/L +100 g/L	31.9 \pm 5.0 ^c ($t = 9.55$)	112	30.3 \pm 17.1 ^b ($t = 5.09$)	79

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.01$ vs 正常对照组.

2.5 阿泰宁对免疫性UC大鼠血清IL-8和TNF- α 含量的影响 模型组大鼠血清中IL-8含量与正常对照组的比较显著升高($P < 0.001$). 而各给药组血清中IL-8含量比模型组的均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 而阿泰宁+美沙拉秦组作用比美沙拉秦组降得更低($P < 0.001$)(表4). 模型组大鼠血清中TNF- α 含量与正常对照组的比较显著升高($P < 0.001$). 阿泰宁大小剂量组与阿泰宁+美沙拉秦组中血清TNF- α 含量比模型组的显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而美沙拉秦组的作用不明显(表4).

2.6 阿泰宁对免疫性UC大鼠血清IgG含量的影响 模型组血清IgG含量显著高于正常对照组($P < 0.001$), 除美沙拉秦组外, 各给药组的血清IgG含量均低于模型组, 其中以阿泰宁大剂量组及阿泰宁+美沙拉秦组作用显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$)(表3).

3 讨论

本研究结果表明, 用牛结肠组织作为抗原造成大鼠UC模型是很成功的, 表现为造模组大鼠肠道出现充气、充血水肿, 黏膜出血、糜烂或溃疡, 肠上皮组织脱落, 隐窝减少, 杯状细胞明显减少, 致炎性细胞因子IL-8、TNF- α 和IgG的含

量均显著上升, T细胞转化率显著下降. 用阿泰宁、或阿泰宁与美沙拉秦联合治疗后, 致炎性细胞因子IL-8、TNF- α 和IgG的表达被明显抑制, 而T细胞转化率却明显上升, 结肠的病变明显减轻或消失, 提示酪酸梭菌CGMCC0313.1能通过下调多种致炎细胞因子的表达, 消除肠道炎症, 促进肠上皮组织的再生和修复, 治疗UC.

IL-8是在UC活动期, 由肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)和Th1型细胞分泌的多种趋化细胞因子的一种, 主要作用是促进中性粒细胞进入炎症部位消除炎症因素. 当IL-8表达过量时, 过多的中性粒细胞聚集于炎症部位, 在消除炎症性刺激物时, 产生了过多的生物氧化剂(H₂O₂和OH⁻等)和蛋白降解酶, 反而损伤了组织^[11-18]. Daig *et al*^[19]研究发现, UC病变肠黏膜的IL-8水平明显高于正常组织, 且与黏膜的中性粒细胞数、病灶的大体炎症程度成正相关. 陈昱 *et al*^[20]发现UC患者血清IL-8浓度高于正常者, 并随病情缓解呈下降趋势. 上述研究表明IL-8直接参与了UC的病理过程, 与炎症程度呈正相关, 而且也可作为疗效检测的指标之一. 本实验中, UC模型组大鼠的IL-8浓度比正常组大鼠升高了2.17倍. 用酪酸梭菌CGMCC0313.1制剂阿泰宁治疗后, 用药组大鼠血清中IL-8的表达

应用要点
本文观察到酪酸梭菌活菌制剂阿泰宁能有效修复受损伤的肠黏膜, 其作用机制是通过在免疫水平上调降低血清中的促炎因子和IgA水平, 显著提升抑制因子和T淋巴细胞的水平而发挥了作用, 并与美沙拉秦有协同作用, 为临床上应用酪酸梭菌活菌制剂阿泰宁治疗UC提供了较充分的理论依据和实验资料.

名词解释

酪酸梭菌: 又名丁酸梭菌, 因在发酵过程中能产生丁酸而得名, 而丁酸是促进肠黏膜上皮细胞再生和修复的重要物质。

被显著下调, 高剂量组及联合用药组中的IL-8水平降至正常水平, 其中联合用药组作用更加显著, 起到了从源头上调控, 阻断炎症的作用。

在炎症前期, 上皮细胞分泌的多种趋化因子的作用下, 迁移到炎症部位的巨噬细胞和肥大细胞被激活并分泌大量致炎症因子TNF- α 。TNF- α 既能诱导IEC前列腺素的产生和上调内皮细胞粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达, 促进炎症, 又能促进成纤维细胞(mesenchymal fibroblasts, MSF)产生大量的胞外蛋白降解酶, 即基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), 他们共有三种, 分别是间质胶原酶(MMP-1)、明胶酶-A(MMP-2)和基质溶酶(MMP-3), 能将黏膜基质溶解, 导致上皮细胞脱落^[21]。TNF- α 还通过降低跨膜闭合蛋白的表达, 促使肠上皮的通透性增加, 这是IBS、IBD的重要前期黏膜病理变化^[22]。张文远 *et al*^[23]用葡聚糖硫酸钠(DSS)造型, 发现大鼠结肠炎结肠组织中TNF- α 、IL-26、PGE2较对照组显著增高, 用白头翁醇提取物治疗后则显著降低, 说明白头翁醇提取物对这三种炎症介质和炎症细胞因子具有抑制作用, 从而能减轻他们对结肠的损害作用。郑萍 *et al*^[24]在DSS造型UC大鼠中, 经用氧化苦参碱(OM)治疗, OM可抑制NF- κ B活化, 降低TNF- α 、IL-6和ICAM-1的生成, 从而减轻结肠炎性损伤。牛凤丽 *et al*^[25]也发现在DSS诱导的大鼠结肠炎中, DSS可能通过活化NF- κ B使TNF- α 、IL-6和ICAM-1生成增加, 导致结肠黏膜炎性损伤。万阜昌 *et al*^[26]的研究表明在DSS造型UC大鼠中, 血清中髓过氧化物酶(MPO)明显增高和肠道中双歧杆菌数显著下降, 经用凝结芽孢杆菌制剂治疗后, 则MPO明显下降, 双歧杆菌数恢复到正常水平。吴小平 *et al*^[27]也证实酪酸梭菌可减轻DSS造型UC大鼠的肠黏膜损伤及明显降低MPO的水平。Araki *et al*^[31]给DSS造型UC大鼠, 喂服20%(w/w)酪酸梭菌制剂8 d, 发现该活制剂能减轻UC大鼠的出血性腹泻和结肠黏膜损伤。吕永慧 *et al*^[27]观察到中药肠炎清可治疗DSS结肠炎, 降低肠组织TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的表达可能是其疗效机制之一。卢义涛 *et al*^[28]通过临床研究发现活动期UC患者血清TNF- α 与IL-6水平与病情呈正相关, 认为活动期UC患者存在着严重的细胞免疫功能紊乱, 而TNF- α 、IL-6, sIL-2R等在UC的发生和病情发展中起着重要作用。在本实验中, UC大鼠的TNF- α 浓度比正常大鼠异常地升高了4.3倍, 说

明TNF- α 是伴UC高度表达的致炎因子。用酪酸梭菌CGMCC0313.1制剂阿泰宁治疗后, TNF- α 的过度表达被显著下调, 而美沙拉秦不能抑制TNF- α 的过度表达。TNF- α 的过度表达一直是炎症性肠病治疗研究的热点之一^[29-30]。但已往的研究主要集中在单抗和化学化合物抑制剂的寻找方面, 酪酸梭菌CGMCC0313.1高效阻断TNF- α 过度表达的发现, 开辟了阻断TNF- α 治疗UC的新途径。

T淋巴细胞由胸腺产生, 然后转移到黏膜相关淋巴组织(MALT)等外周组织, 对侵入的抗原起防御作用。已往的研究证实, UC患者的肠黏膜T淋巴细胞反应趋于低下^[31], T淋巴细胞的异常打破了免疫平衡, 促进了炎症的发展。所以, 调控T淋巴细胞的正常转化表达, 对于恢复正常的体液和黏膜免疫功能, 消除炎症具有重要意义。本研究结果证实, UC大鼠的T淋巴细胞转化率比正常鼠显著下降, 阿泰宁大小剂量组、美沙拉秦组及二者联合用药组均能显著地升高T淋巴细胞的转化率。

IgG是由B细胞分泌的对抗入侵抗原的抗体。已往的研究证实, 在CD和UC患者肠道分泌的IgG抗体量均增加。但过量表达的IgG激活了补体反应和一系列炎症介质的级联反应, 形成抗体复合物沉积, 反而对黏膜造成损伤。本实验结果显示, UC大鼠的IgG浓度比正常大鼠升高了1.6倍, 用美沙拉秦单独治疗不能下调IgG的表达, 阿泰宁大剂量组有显著的下调表达作用, 与美沙拉秦合用, 呈现协同作用, 能极显著地将IgG的表达下调至正常水平。说明酪酸梭菌CGMCC0313.1有恢复B淋巴细胞正常表达IgG的作用, 实质上是恢复了B淋巴细胞的免疫耐受, 消除了过度表达IgG对黏膜组织的伤害。Venkatraman *et al*^[32]的研究证实, 丁酸能逆转UC肠黏膜的通透性使其恢复正常。Hata *et al*研究又证实, GBF有促进肠道细菌产生丁酸抑制NF- κ B的表达的作用^[33-34]。因此, 酪酸梭菌对UC的治疗作用有可能部分通过促进肠道丁酸水平而实现的。另外, Mikami *et al*^[35]报道UC患者NF- κ B活性升高, 同时伴有IL-1、IL-8、ICAM- γ 、TNF- α 等各种炎症因子水平的增加。Luhrs *et al*^[36]证实用丁酸盐灌肠治疗UC患者4-8 wk后, 伴随临床症状明显缓解, 肠黏膜中NF- κ B的表达也明显减少。本研究证实酪酸梭菌能抑制炎症趋化因子IL-8和细胞因子TNF- α 的过度表达, 也可能是通过酪酸梭菌产生丁酸, 抑制了NF- κ B活化的途径。

本研究结果说明, 酪酸梭菌CGMCC0313.1制剂阿泰宁不仅单独使用对UC有良好的治疗效果, 还能与5-氨基水杨酸合并使用对UC进行治疗. 开辟了治疗UC的新途径. 具体临床应用方案尚待进一步研究.

本研究结果还提示, 酪酸梭菌对UC的治疗不是单一作用的, 而是通过调控各种炎症因子的表达和恢复机体免疫功能等多个方面进行了正向的调控而发挥治疗作用的. 更全面深入的研究尚在继续之中.

致谢: 感谢中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所赵乃坤研究员和中国军事医科院五所李成文研究员对本课题提供的支持和帮助.

4 参考文献

- Masaya Sasaki, Yoshio Araki, Tomoyuki Tsujikawa, Akira Andoh and Yoshihide Fujiyama. Intestinal Cell Proliferation and Microflora. *Journal of Intestinal Microbiology* 2005; 19: 1-8
- 吴小平, 刘德良, 凌奇荷. 酪酸菌对大鼠右旋葡聚糖硫酸钠结肠炎的治疗作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 305
- Araki Y, Andoh A, Takizawa J, Takizawa W, Fujiyama Y. Clostridium butyricum, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Int J Mol Med* 2004; 13: 577-580
- Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Takizawa J, Takizawa W, Bamba T. Oral administration of a product derived from Clostridium butyricum in rats. *Int J Mol Med* 2002; 9: 53-57
- Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Takizawa J, Takizawa W, Bamba T. Short-term oral administration of a product derived from a probiotic, Clostridium butyricum induced no pathological effects in rats. *Int J Mol Med* 2002; 9: 173-177
- 姚惠芬, 陈务华, 周毅. 溃疡性结肠炎动物模型研究概况. *天津药学* 2006; 18: 72-74
- 刘万理, 沈红, 单兆伟, 朱莹莹, 施荣山. 肠安胶囊修复溃疡性结肠炎大鼠结肠损伤研究. *天津中医学院学报* 2003; 22: 7-9
- 黄永年, 张元德, 邢玉馥. 大鼠溃疡性结肠炎模型的建立与观察. *中华病理学杂志* 1995; 24: 392
- 李成文. 现代免疫化学技术. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社. 1992: 185-187
- 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护-基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 708-710
- Papadakis KA, Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 303-313
- Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 1214-1223
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95: 55-65
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705
- McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by Salmonella typhimurium. *J Immunol* 1998; 160: 455-466
- Huang GT, Eckmann L, Savidge TC, Kagnoff MF. Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1996; 98: 572-583
- Begue B, Sarnacki S, le Deist F, Buc H, Gagnon J, Meo T, Cerf-Bensussan N. HML-1, a novel integrin made of the beta 7 chain and of a distinctive alpha chain, exerts an accessory function in the activation of human IEL via the CD3-TCR pathway. *Adv Exp Med Biol* 1995; 371A: 67-75
- Wershil BK. Role of mast cells and basophils in gastrointestinal inflammation. *Chem Immunol* 1995; 62: 187-203
- Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222
- 陈垦, 梁坚, 周宇, 王婉梅, 汤斌, 陈群, 王胜春. 溃疡性结肠炎病人血清TNF- α 、IL-8和SIL-2R含量的测定. *上海免疫学杂志* 1998; 18: 112-113, 118
- Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 1998; 290 Suppl: S47-54
- Sakaguchi T, Brand S, Reinecker HC. Mucosal barrier and immune mediators. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 573-577
- 张文远, 韩兴玺, 杨红. 白头翁提取物对大鼠溃疡性结肠炎的抗炎作用机制研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 568-570
- 郑萍, 牛凤丽, 刘文忠, 施尧. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 207-210
- 牛凤丽, 郑萍, 刘文忠, 施尧. 葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎发病机制的研究. *胃肠病学* 2003; 8: 283-286
- 万阜昌, 崔云龙, 闫述翠. 凝结芽孢杆菌活菌TBC169株对右旋葡聚糖硫酸钠引发大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1850-1854
- 吕永慧, 胡品津, 陈文红, 毕向军, 庞瑞萍. 中药肠安清治疗小鼠葡聚糖硫酸钠所致结肠炎的机制. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1283-1287
- 卢艺涛, 高静, 姚桂琴. 溃疡性结肠炎患者相关细胞因子的实验性研究. *现代预防医学* 2005; 32: 735-736
- Derckx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342: 173-174
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405
- Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 144-160
- Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB, Patra S, Murthy S. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:

同行评价
本文选题新颖, 内容丰富, 方法恰当, 结果可信, 有一定的临床参考价值.

- 1053-1059
- 33 Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Toyonaga A, Bamba T. Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 1173-1179
- 34 Hata K, Andoh A, Sato H, Araki Y, Tanaka M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Sequential changes in luminal microflora and mucosal cytokine expression during developing of colitis in HLA-B27/beta2-microglobulin transgenic rats. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1185-1192
- 35 Mikami T, Yoshida T, Akino F, Motoori T, Yajima M, Okayasu I. Apoptosis regulation differs between ulcerative colitis-associated and sporadic colonic tumors. Association with survivin and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 723-730
- 36 Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号. 《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 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核心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》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文. 《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

丹皮酚对人大肠癌HT-29细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制

计春燕, 谭诗云, 刘长青

计春燕, 湖北省新华医院消化科 湖北省武汉市 430015
谭诗云, 刘长青, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
计春燕, 2005年武汉大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤防治方面的研究。
湖北省自然科学基金项目资助课题, No. 2004ABA243
通讯作者: 谭诗云, 430015, 湖北省武汉市武昌紫阳路, 武汉大学人民医院消化内科. tanshiyun@medmail.com.cn
电话: 027-88071919 传真: 027-88071919
收稿日期: 2007-01-08 修回日期: 2007-12-26

Effects of paeonol on apoptosis and proliferation of HT-29 cells and its molecular mechanism

Chun-Yan Ji, Shi-Yun Tan, Chang-Qing Liu

Chun-Yan Ji, Department of Gastroenterology, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan 430015, Hubei Province, China
Shi-Yun Tan, Chang-Qing Liu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004ABA243
Correspondence to: Shi-Yun Tan, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Ziyang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. tanshiyun@medmail.com.cn
Received: 2007-01-08 Revised: 2007-12-26

Abstract

AIM: To investigate the effects of paeonol in inhibiting proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and inducing their apoptosis, and the possible molecular mechanisms involved.

METHODS: The inhibitory effect of paeonol on HT-29 cell proliferation was detected by MTT assay. Induction of apoptosis of HT-29 cells was measured by fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, TUNEL assay and flow cytometry (FCM). Expression of apoptosis-associated genes *bcl-2*, *bax* and *P53* was observed by immunocytochemical staining.

RESULTS: Paeonol at a concentration of 7.81-

250 mg/L inhibited proliferation of HT-29 cells, with obvious concentration-and time-effect relationships. Typical apoptosis morphology of HT-29 cells was observed by fluorescence and transmission electron microscopy after treatment with paeonol. Paeonol induced apoptosis of HT-29 cells when it was applied at a concentration of 15.63, 62.5 or 250 mg/L after 48 h. TUNEL assay showed a concentration-effect relationship between paeonol and apoptosis index. By FCM, the apoptosis rate of HT-29 cells was 7.6%, 16.2% and 34.5% respectively, which showed an obvious concentration-effect relationship. Cell cycle distribution was altered simultaneously. The S phase of the cells was increased, while the G₀/G₁ and G₂/M phases were decreased after treatment with paeonol. Immunocytochemical staining showed the expression of *Bcl-2* and *p53* was decreased significantly, while expression of *Bax* protein was not significantly altered by paeonol.

CONCLUSION: Paeonol inhibits HT-29 cell proliferation and induces apoptosis. This may be mediated via changes in the cell cycle, down-regulation of the *Bcl-2*/*Bax* ratio, and expression of *p53* protein.

Key Words: Colorectal cancer; Apoptosis; *Bcl-2*; *Bax*; *P53*; Paeonol

Ji CY, Tan SY, Liu CQ. Effects of paeonol on apoptosis and proliferation of HT-29 cells and its molecular mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008;16(1): 33-38

摘要

目的: 探讨丹皮酚(paeonol, Pae)对人大肠癌HT-29细胞的增殖抑制、凋亡诱导作用及可能的作用机制。

方法: 应用MTT法、荧光显微镜及透射电镜技术、TUNEL法和流式细胞仪技术观察不同浓度的Pae对HT-29细胞增殖的抑制及凋亡的诱导作用; 应用免疫细胞化学技术检测用药

背景资料
化疗药物的耐药及其毒副作用一直是大肠癌治疗的两大难题, 在植物中寻找有效且副作用小的抗肿瘤药物已成为国内外重要的研究课题。

相关报道
研究表明,丹皮酚(Pae)具有一定的抗肿瘤活性,在体外对多种肿瘤细胞株增殖有抑制作用,但对大肠癌的增殖抑制、凋亡诱导作用及其对凋亡相关基因表达的影响在国内外还未见报道。

前后凋亡相关基因*Bcl-2*、*Bax*及*P53*表达的变化。

结果: HT-29细胞经Pae(浓度范围7.81-250 mg/L)作用后细胞生长明显受到抑制, 明显的剂量依赖效应关系和时间依赖效应关系; 荧光显微镜及透射电镜观察到Pae作用后HT-29细胞出现典型的细胞凋亡形态; Pae在15.63, 62.5, 250 mg/L 3种浓度下作用48 h均可诱导HT-29细胞凋亡, TUNEL法显示凋亡指数与Pae浓度呈正相依赖关系; 流式细胞仪技术检测其凋亡率分别为7.6%, 16.2%和34.5%, 也有明显的剂量效应关系, 同时Pae使细胞周期分布发生明显变化, 表现为S期细胞比例上升, G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降; 免疫细胞化学结果显示Pae作用后HT-29细胞*Bcl-2*及*P53*蛋白表达显著降低, *Bax*蛋白表达无显著改变。

结论: Pae能抑制HT-29细胞增殖并诱导其凋亡, 呈现明显的剂量依赖效应关系和时间依赖效应关系。其作用可能与影响癌细胞的细胞周期、下调*Bcl-2*/*Bax*的比例及*P53*蛋白的表达有关。

关键词: 大肠癌; 凋亡; *Bcl-2*; *Bax*; *P53*; 丹皮酚

计春燕, 谭诗云, 刘长青. 丹皮酚对人大肠癌HT-29细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制. 世界华人消化杂志 2007; 16(1): 33-38
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/33.asp>

0 引言

化疗药物的耐药及其毒副作用一直是大肠癌治疗的两大难题, 在植物中寻找有效且副作用小的抗肿瘤药物已成为国内外重要的研究课题。研究表明, 丹皮酚(paeonol, Pae)具有一定的抗肿瘤活性, 在体外对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用, 灌胃给药有抗小鼠肝肿瘤作用^[1]。但Pae对大肠癌的增殖抑制、凋亡诱导作用及其对凋亡相关基因表达的影响在国内外还未见报道。我们旨在通过MTT法、荧光显微镜及透射电镜技术、DNA末端原位标记染色(TUNEL)法及流式细胞仪技术研究Pae在体外对大肠癌HT-29细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用, 通过免疫细胞化学技术检测用药前后凋亡相关基因*Bcl-2*、*Bax*及*P53*表达的变化, 以探索Pae对大肠癌细胞杀伤作用的可能机制, 为Pae的临床应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌HT-29细胞株购自中南大学肿瘤研究所。Pae购自上海第一制药厂(5 g/L), 用RPMI1640培养液稀释成终浓度为3.91-250 mg/L(临用前); RPMI1640培养基(美国Gibco公司); 小牛血清(杭州四季青生物材料研究所); 四噻唑蓝(MTT)、丫啶橙(AO)、溴化乙啶(EB)(美国Sigma公司)均用pH为7.4的的PBS溶解, 过滤除菌, 置棕色小瓶中4℃冰箱保存; 二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司); TUNEL试剂盒、鼠抗*Bcl-2*、*Bax*和*P53* mAb及SP试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。CO₂培养箱(美国HARIS公司); 酶标仪(美国BIO-TEK公司); 医用超净工作台(北京半导体设备一厂); 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司); 低温高速离心机(Heraeus); 倒置显微镜及荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 方法

将HT-29细胞培养在含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液中, 加入青霉素100 U/L、链霉素100 mg/L, 置37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养, 每3-4 d用2.5 g/L胰酶消化传代一次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.1 Pae抑制细胞增殖: MTT法参照文献[2]取对数生长期的HT-29细胞以5×10⁷/L, 每孔0.2 mL, 接种于96孔培养板中, 24 h细胞贴壁生长后分为实验组和对照组, 实验组分别加入不同浓度的Pae(浓度分别为3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 mg/L), 每组设5个复孔, 对照组加入等量培养液。连续培养24, 48, 72, 96 h, 根据细胞生长情况, 每天换液1次, 分别于24, 48, 72及96 h每次实验结束前4 h每孔加入20 μL MTT液(5 g/L)显色, 继续培养4 h, 弃上清液, 然后每孔加200 μL DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪测定570 nm处各孔的吸光度值。药物对细胞增殖抑制率的计算方法为: 抑制率 = (1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%。

1.2.2 Pae诱导细胞凋亡: 倒置显微镜下观察, 取对数生长期HT-29细胞消化传代并延续培养24 h后换含不同浓度Pae的培养液培养, 倒置显微镜下连续性动态观察细胞生长情况。

HE染色: 将细胞涂片用冷丙酮4℃固定20 min, 自然凉干, 水化后用5 mg/L TritonX-100 PBS处理10 min, 水化后Gill苏木精染2 min, 10 mL/L盐酸乙醇1 s, 42℃温水蓝化10 min, 伊红染2 s, 常规脱水封片后光镜下观察形态学变化。

AO/EB双荧光染色法^[3]: 将HT-29细胞以10⁸/L,

创新盘点
丹皮酚作用于大肠癌HT-29细胞的作用机制与诱导该细胞株凋亡, 及影响其细胞周期分布有关, 同时提示Pae在应用时若能合用对S期敏感的药物可能有助于提高抗肿瘤的疗效。

表 1 丹皮酚对HT-29细胞增殖的影响

Pae(mg/L)	24 h		48 h		72 h		96 h	
	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
0	0.859 ± 0.028	-	1.073 ± 0.021	-	1.388 ± 0.024	-	1.595 ± 0.019	-
3.91	0.817 ± 0.024	4.889	1.041 ± 0.031	2.982	1.341 ± 0.033	3.386	1.457 ± 0.024 ^a	8.652
7.81	0.751 ± 0.030 ^b	12.573	0.871 ± 0.013 ^b	18.826	1.084 ± 0.025 ^b	21.902	1.026 ± 0.014 ^b	35.673
15.63	0.599 ± 0.023 ^b	30.325	0.575 ± 0.026 ^b	46.412	0.570 ± 0.017 ^b	58.934	0.497 ± 0.031 ^b	68.840
31.25	0.439 ± 0.016 ^b	48.803	0.423 ± 0.018 ^b	60.578	0.386 ± 0.030 ^b	72.190	0.323 ± 0.018 ^b	79.749
62.5	0.329 ± 0.025 ^b	61.622	0.317 ± 0.014 ^b	70.456	0.305 ± 0.023 ^b	78.025	0.278 ± 0.024 ^b	82.571
125	0.252 ± 0.014 ^b	70.676	0.227 ± 0.025 ^b	78.844	0.201 ± 0.014 ^b	85.518	0.167 ± 0.016 ^b	89.529
250	0.225 ± 0.025 ^b	73.806	0.202 ± 0.016 ^b	81.174	0.171 ± 0.019 ^b	87.680	0.130 ± 0.025 ^b	91.849

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 0 mg/L Pae.

共3 mL铺入培养瓶中, 37℃孵育, 待细胞贴壁生长. 另加各浓度Pae(15.63, 62.5, 250 mg/L)3 mL, 孵育48 h. 洗下瓶内细胞制成单细胞悬液, 加入终浓度均为100 mg/L的AO和EB, 充分混匀, 取细胞悬液4 μL滴于玻片上, 在荧光显微镜下观察、拍照.

透射电镜观察: 于实验及对照组细胞培养瓶中加入25 g/L戊二醛, 置4℃冰箱中过夜, 用细胞刮轻刮细胞, 离心, 10 g/L锇酸固定, 常规包埋, 制成超薄切片, 电镜下观察细胞超微结构的特征.

TUNEL法检测细胞凋亡: HT-29细胞按10⁸/L密度接种于预先置有消毒盖玻片的6孔培养板中, 待其贴壁后加入各浓度Pae(15.63, 62.5, 250 mg/L), 对照组加入等量培养液, 48 h后取出盖玻片, 40 g/L多聚甲醛固定, PBS洗涤, 30 mL/L过氧化氢-甲醛处理, 预冷的1 mg/L TritonX-100处理, PBS洗涤, 其余步骤严格按试剂盒说明进行. 光镜下观测、凋亡细胞计数, 并计算凋亡指数 (apoptosis index, AI). AI计算方法为: 在光镜下, 胞核染色呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞, 随机选取5个高倍镜(×200)视野, 每个视野计数200个细胞, 分别计数凋亡细胞数和总细胞数. AI = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%.

流式细胞仪检测细胞周期: 消化收集各实验组(Pae浓度分别为15.63, 62.5, 250 mg/L)及对照组培养48 h的细胞, 1000 r/min离心5 min, PBS漂洗, 200目滤网过滤, 调整单细胞悬液浓度为1 × 10⁹/L. 700 mL/L预冷乙醇固定, 加入RNase及PI染色30 min, 上机检测细胞周期.

1.2.3 凋亡相关基因*Bcl-2*, *Bax*及*P53*的检测: 细胞爬片及实验分组方法同TUNEL法, 48 h后倒去孔内培养液, PBS洗2次, 每次3 min; 体积分数为

950 mL/L乙醇固定15-30 min; PBS洗2-3次; 将爬片置于湿盒内, 滴加一抗(*Bcl-2*, *Bax*及*P53*抗体), 37℃孵育箱中孵育30-60 min; PBS洗2-3次, 每次3 min; 其余步骤按SP试剂盒操作说明进行. 判断结果: 每张玻片在40 × 10高倍显微镜下观察, 细胞染色呈棕褐色被判为阳性细胞, 不染为阴性细胞. 凋亡相关基因蛋白*Bcl-2*, *Bax*及其免疫反应阳性物质定位于胞质和胞膜, *P53*阳性物质定位于胞核. 每个视野下分别计算: 表达率(%) = (阳性细胞数/细胞总数) × 100%, 每张涂片观察5个视野.

统计学处理 使用SPSS10.0统计软件. 实验数据以mean ± SD表示, 完全随机分组实验所得数据的计量资料采用方差分析、*t*检验, 完全随机分组实验所得数据的计数资料和率的比较采用χ²检验.

2 结果

2.1 Pae对HT-29细胞增殖的抑制作用 Pae在7.81-250 mg/L浓度范围内对HT-29细胞的增殖均有抑制作用, 药物浓度越高, 作用时间越长, 其抑制作用越强, 呈现明显的剂量依赖效应关系和时间依赖效应关系(表1).

2.2 Pae对HT-29细胞凋亡的诱导作用 倒置显微镜下观察: 对照组细胞生长旺盛, 呈高折光率, 胞体大, 随时间延长变化不大. Pae组细胞增殖减慢, 随着药物浓度增大和时间延长, 细胞逐渐变小、折光率减弱, 部分脱落漂浮于培养瓶中, 但细胞膜完整, 最后裂解. Pae浓度越高, 作用时间越长, 上述表现越明显, 漂浮细胞越多. 250 mg/L Pae组除见少数圆形细胞外, 可见大量悬浮的细胞碎片.

HE染色: 对照组正常细胞核均匀着色呈淡

应用要点
探索丹皮酚对大肠癌细胞杀伤作用的可能机制,为Pae的临床应用提供理论和实验依据,给大肠癌的治疗开辟一条新途径。

表2 Pae对HT-29细胞周期的影响

Pae(mg/L)	凋亡率	细胞周期(%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	2.3	61.3	20.3	18.4
15.63	7.6 ^b	28.1 ^b	55.8 ^b	16.1 ^a
62.5	16.2 ^b	50.7 ^b	35.8 ^b	13.5 ^b
250	34.5 ^b	38.0 ^b	45.6 ^b	16.4 ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 0 mg/L Pae.

表3 Pae对HT-29细胞*Bcl-2*、*Bax*及*P53*基因表达的影响

Pae(mg/L)	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>P53</i>
0	95.6 ± 4.03	93.2 ± 5.76	90.2 ± 13.04
15.63	89.2 ± 9.21 ^a	94.1 ± 6.07	87.6 ± 10.10 ^a
62.5	80.4 ± 7.89 ^b	92.9 ± 7.05	83.7 ± 9.43 ^b
250	73.1 ± 6.52 ^b	94.3 ± 7.23	77.4 ± 8.22 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 0 mg/L Pae

蓝色或蓝色,未见凋亡小体.31.25-250 mg/L浓度范围Pae组出现较多的细胞凋亡,表现为细胞体积极小、核固缩、碎裂、深染,部分裂解形成凋亡小体.另可见肿胀的坏死细胞,细胞膜的连续性破坏,核染成很淡的蓝色甚至蓝色消失.

AO/EB双荧光染色法:经不同浓度Pae处理48 h后,大肠癌细胞表现出凋亡细胞的特征性形态变化:细胞体积缩小,胞核固缩染色质凝聚、破裂,核断裂形成凋亡小体等,部分细胞被染成橘红色,以250 mg/L Pae组最为明显.而对照组细胞大小及形态较一致,胞核较大,为黄绿色,形态正常.

透射电镜下表现:实验组凋亡细胞体积小,胞质浓缩,胞质内空泡增多,染色质固缩、边集或碎裂成不规则块状,细胞器保存较好,核膜完整,还可见有膜包裹且细胞器完整、有细胞核碎片的凋亡小体.

TUNEL法:光镜下观察到实验组凋亡细胞的棕褐色染色颗粒定位于细胞核内,染色阳性的细胞出现细胞核碎裂,核质固缩,细胞膜突出形成质膜小泡等凋亡细胞形态学变化.经Pae处理48 h,大肠癌细胞株HT-29的凋亡细胞数明显增加,Pae在15.63, 62.5, 250 mg/L 3种浓度浓度下的AI值分别为8.16 ± 2.24%、15.35 ± 3.07%、23.70 ± 3.42%,对照组为3.32 ± 0.41%,差异均有显著性(*P*<0.01),且AI与Pae浓度呈正相依赖关系.

流式细胞仪检测:不同浓度的Pae作用于

HT-29细胞48 h后,细胞周期分布发生明显改变,表现为S期细胞比例上升,G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降(表2),并出现明显的凋亡峰(图1).对照组显示HT-29细胞的自然凋亡率仅2.3%.两组结果相比差异均有显著性(*P*<0.05).

2.3 Pae对凋亡相关基因*Bcl-2*、*Bax*及*P53*表达的影响
Bcl-2蛋白表达:对照组的Bcl-2蛋白表达水平最高,胞质染色细胞数最多并且呈深棕色,Pae组细胞Bcl-2表达均有下降,染色阳性细胞减少,染色明显变浅,且与药物浓度呈反比关系,各组结果与对照组相比均具有显著性差异(*P*<0.01).

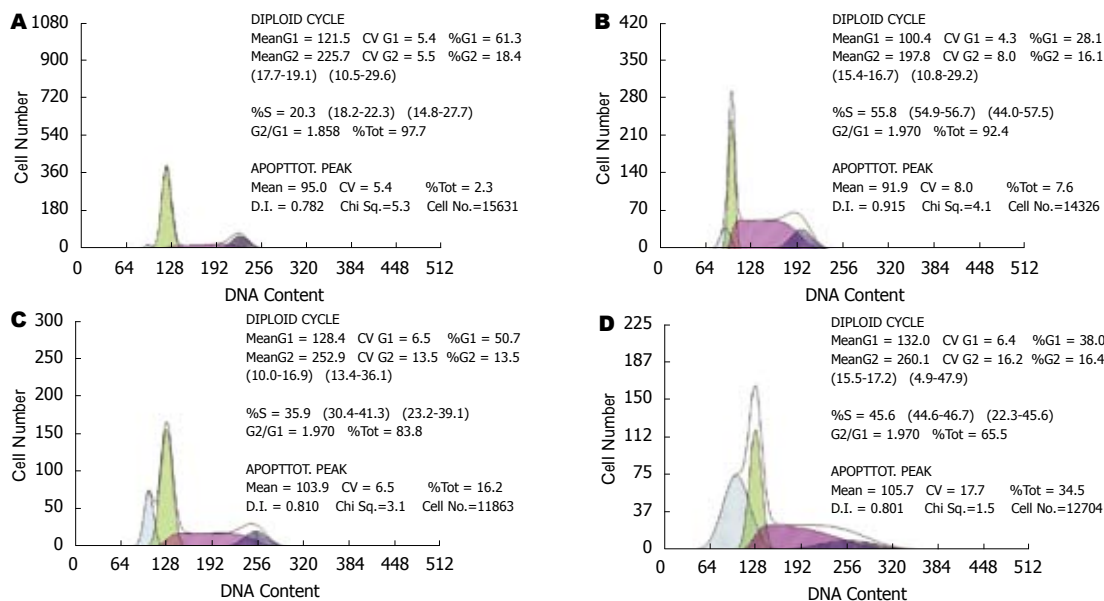
Bax蛋白表达:阳性细胞胞质、膜染成深棕色.Pae组染色阳性细胞数及染色程度与对照组相比无显著性差异(*P*>0.05).

P53蛋白表达:阳性细胞胞核染成深棕色,Pae组细胞胞核染色细胞数减少,且与药物浓度呈反比关系,各组结果与对照组相比有显著性差异(*P*<0.01)(表3).

3 讨论

研究表明,Pae具有镇静催眠、解热镇痛、抗菌消炎、免疫调节、抗氧化及保护心脑血管等广泛的药理活性^[4-5].本实验研究发现,Pae在7.81-250 mg/L 6个浓度下,对HT-29细胞株的增殖均有抑制作用,随着药物浓度的升高和作用时间的延长,抑制细胞增殖的作用逐步增强,呈现明显的剂量效应及时间效应关系,提示Pae具有一定的抗肿瘤活性.

细胞增殖过盛及通过抑制凋亡促进肿瘤细胞存活被认为是肿瘤发生、发展的关键^[6].众多研究已表明,细胞凋亡的减少与大肠癌的发生、发展相关.抗肿瘤药物对肿瘤细胞作用的结果有多种,如细胞增殖抑制、分化、凋亡和坏死.多种化疗药物均可引起肿瘤细胞凋亡^[7].通过诱导凋亡治疗肿瘤是目前的一个热点^[8].本实验中Pae作用于大肠癌HT-29细胞,通过光镜HE染色及荧光显微镜、透射电镜均可观察到典型的凋亡细胞形态学改变.TUNEL法发现经Pae处理后大肠癌细胞的凋亡指数显著提高,且与Pae呈剂量依赖关系.流式细胞仪发现HT-29细胞经Pae作用后出现了明显的凋亡峰,250 mg/L Pae诱导细胞凋亡率达到34.5%,与对照组显示的自然凋亡率(2.3%)相比有显著性差异(*P*<0.01).细胞周期分布也发生了明显变化,表现为S期细胞比例上升,G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降,表明Pae对HT-29细胞周期分布的影响主要是阻滞



同行评价
本文立意较新, 层次分明, 方法合理, 具有一定的临床指导价值.

图 1 各组凋亡率的检测. A: 对照组; B: 15.63 mg/L Pae; C: 62.5 mg/L Pae组; D: 250 mg/L Pae组.

细胞周期中 S 期向 G₂/M 期的转变过程, 减少有丝分裂, 并引起细胞凋亡. 证实 Pae 作用于大肠癌 HT-29 细胞的作用机制与诱导该细胞株凋亡及影响其细胞周期分布有关. 同时提示 Pae 在应用时若能同时合用对 S 期敏感的药物可能有助于提高抗肿瘤的疗效.

凋亡的过程是程序化的、多基因调控的. 通过研究其分子调控机制, 将对有计划地诱导肿瘤细胞凋亡产生重要的指导作用^[9]. 与细胞凋亡相关的基因大致有 *Bcl-2* 家族、*P53*、*Fas*、*c-myc* 和 *k-ras* 等, 细胞是否进入凋亡通道取决于这些凋亡相关基因的综合调控结果, 其中 *Bcl-2* 是凋亡调控的中心环节. 在生理和病理状态下, *Bcl-2* 基因及其蛋白产物都是重要的凋亡调节因素. 体外实验表明: 当去除了生长因子后, 正常细胞便逐渐转向凋亡; 而当 *Bcl-2* 过度表达时, 这一凋亡现象便被抑制了^[10]. 由此可见, *Bcl-2* 通过抑制诱导凋亡而使细胞寿命延长, 细胞堆积, 在肿瘤发生中起始动作用. *Bax* 基因是转录产物 α RNA 编码的一种 21 kDa 蛋白质, 是近年来新发现的一种凋亡促进基因, 属 *Bcl-2* 同一家族^[11]. *Bax* 蛋白的氨基酸序列有 21% 与 *Bcl-2* 同源. *Bax* 基因的作用与 *Bcl-2* 相反, 其单体以及形成 *Bax/Bax* 形式的同源二聚体均有促凋亡作用. *Bax* 又可与 *Bcl-2* 形成异源二聚体, 抑制后者的功能达到促进凋亡. 近期研究表明, *Bcl-2* 家族中促凋亡和抗凋亡蛋白之间的平衡在调节促凋亡因子 *c-Myc* 从线粒体的释放起着重要的作用^[12]. *Bcl-2/Bax* 两蛋白之间的比例是

细胞凋亡发生与否的关键因素^[13]. 本实验发现, Pae 能明显下调大肠癌 HT-29 细胞 *Bcl-2* 基因的表达 ($P < 0.01$), 而 *Bax* 在 Pae 作用后与对照组相比表达率无明显差异 ($P > 0.05$), 故可认为经 Pae 作用后是通过 *Bcl-2/Bax* 比例的下降, 从而诱导大肠癌细胞的凋亡.

此外, *Bcl-2* 可改变 *P53* 和 *cdc2* 及 *cdk2* 等细胞周期蛋白的核-胞质转运. 实验表明 *Bcl-2* 与 *P53* 的共表达可以延缓 *P53* 诱导的生长停滞, *Bcl-2* 还可和 *c-Myc* 协同封闭 *P53* 进入核中, 从而阻断 *P53* 诱导的凋亡和生长停滞. 有研究表明 *P53* 直接下调 *Bcl-2* 基因的表达, 而 *Bcl-2* 能抑制 *P53* 介导的细胞凋亡, 表明 *P53* 和 *Bcl-2* 共同参与调节细胞的生存和死亡^[14-16]. 该基因发生突变后则具有促癌作用, 突变型 *P53* 蛋白在细胞内积聚促进细胞转化和增殖, 上调 *COX-2* 的表达, 导致肿瘤发生. 野生型 *P53* 蛋白由于其半衰期短, 代谢不稳定及含量低, 故常规免疫组化难以检测到; 而突变型 *P53* 蛋白构象改变, 半衰期明显延长 (>24 h), 在恶性细胞的核内堆积, 可通过该法检出. 因此在本研究中检测出的 *P53* 蛋白多为突变型 *P53* 基因的表达产物. Pae 作用于大肠癌细胞 48 h 后, *P53* 及 *Bcl-2* 基因的表达与对照组相比均明显降低 ($P < 0.01$), 提示 Pae 同时下调 *P53* 及 *Bcl-2* 基因的表达可能是其诱导 HT-29 细胞凋亡的机制之一.

总之, 本实验研究发现中药 Pae 在一定的浓度范围内能显著抑制人大肠癌 HT-29 细胞的增殖并诱导其发生凋亡, 具体机制可能与 Pae 影响

HT-29细胞的细胞周期分布、下调Bcl-2/Bax的比例及P53基因的表达有关。

4 参考文献

- 1 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 周爱武, 魏伟, 徐叔云. 丹皮酚对HepA荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究. *中国药理学通报* 2003; 19: 160-162
- 2 Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer* 1991; 27: 897-900
- 3 Wang C, Eshleman J, Lutterbaugh J, Bin Y, Willson J, Markowitz S. Spontaneous apoptosis in human colon tumor cell lines and the relation of wt p53 to apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 1996; 109: 537-541
- 4 丘少鹏, 王道虎, 刘卓炜, 李俊彪, 梅骅. 丹皮酚磺酸钠在动物肾缺血再灌注损伤中的作用. *中华肾脏病杂志* 2001; 17: 185-187
- 5 Chang HL, Hung CF, Yeh CC, Chang WC, Chung JG. Paeonol promoted 2-aminofluorene and p-aminobenzoic acid acetylations by mononuclear leucocytes from Sprague-Dawley rats. *Cytobios* 2000; 103: 149-158
- 6 Khor TO, Gul YA, Ithnin H, Seow HF. Positive correlation between overexpression of phospho-BAD with phosphorylated Akt at serine 473 but not threonine 308 in colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 210: 139-150
- 7 Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res* 1992; 12: 773-779
- 8 Dong JT, Luo XM. Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res* 1994; 315: 11-15
- 9 Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169: 431-437
- 10 Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258: 302-304
- 11 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
- 12 Tuynman JB, Peppelenbosch MP, Richel DJ. COX-2 inhibition as a tool to treat and prevent colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 52: 81-101
- 13 Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499
- 14 Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M, Dumollard JM, Balique JG, Perpoint B, Boucheron S. An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 654-659
- 15 Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996; 74: 216-223
- 16 Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer* 1997; 75: 537-541

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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 2007-11-15)

RNA干扰供体大鼠库普弗细胞B7分子表达对受体大鼠淋巴细胞激活的影响

李涛, 朱继业, 柳枫, 冷希圣

李涛, 朱继业, 柳枫, 冷希圣, 北京大学人民医院肝胆外科 北京市 100044
李涛, 2003年北京大学医学部普通外科博士, 主治医师, 主要从事肝硬化门静脉高压症发病机制和肝移植免疫耐受的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30471637
通讯作者: 朱继业, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝胆外科. litao_pku@yahoo.com.cn
电话: 010-88324553 传真: 010-68318386
收稿日期: 2007-09-09 修回日期: 2007-12-22

Effect of RNA interference B7 expression of donor rat Kupffer cells on activation of recipient rat lymphocytes

Tao Li, Ji-Ye Zhu, Feng Liu, Xi-Sheng Leng

Tao Li, Ji-Ye Zhu, Feng Liu, Xi-Sheng Leng, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471637
Correspondence to: Dr. Ji-Ye Zhu, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, 11 Xizhimen South Street, West Cheng District, Beijing 100044, China. litao_pku@yahoo.com.cn
Received: 2007-09-09 Revised: 2007-12-22

Abstract

AIM: To investigate the effect of RNA interference B7 expression of donor Lewis rat Kupffer cells (KC) on proliferation and interleukin (IL)-2 production of recipient BN rat lymphocytes.

METHODS: Lewis rat KC were isolated and identified. Rat B7 RNA interference vector Psilencer 3.1 H1-Neo-B7 was constructed and identified. KC were transfected by B7 RNA interference vector. RT-PCR was used to measure the expression of B7 in KC. After transfection, KC were divided into three groups: Group A served as a control; group B was KC transfected with vector without B7 interference; Group C was RNA interference B7 expression of KC. Recipient BN rat lymphocytes were isolated and co-cultured with the three groups of KC. MTT assay was used to evaluate lymphocyte proliferation.

ELISA was used to detect the production of IL-2.

RESULTS: The yield of KC was 5×10^7 and cell viability was $> 98\%$. After B7 RNA interference vector transfection, B7 expression of KC decreased by 22% ($P < 0.01$). After co-culture with recipient BN rat lymphocytes, the proliferation and IL-2 production of lymphocytes were inhibited. As compared with the controls, lymphocyte proliferation decreased by 49% ($P < 0.01$). IL-2 production decreased by 67% ($P < 0.01$).

CONCLUSION: RNA interference B7 expression of donor Lewis rat KC significantly decreases the proliferation and production of recipient BN rat lymphocytes.

Key Words: Kupffer cells; B7; Co-stimulatory pathway; RNA interference; Immunotolerance

Li T, Zhu JY, Liu F, Leng XS. Effect of RNA interference B7 expression of donor rat Kupffer cells on activation of recipient rat lymphocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 39-44

摘要

目的: 观察RNA干扰供体Lewis大鼠库普弗细胞(KC)B7分子表达对受体BN大鼠淋巴细胞增殖和生成IL-2的影响。

方法: 分离培养供体Lewis大鼠KC, 设计大鼠B7分子的干扰片段, 构建并鉴定含B7干扰片段的RNA干扰载体Psilencer 3.1H1-Neo-B7, 将RNA干扰载体转染供体大鼠的KC, 转染后采用RT-PCR方法检测KC上B7分子表达的变化。将转染后的KC分为3组, 对照组(A); 空载体组(B); RNA干扰B7表达组(C)。分离培养受体BN大鼠的淋巴细胞, 将以上各组细胞分别与BN大鼠的淋巴细胞进行共培养, 采用MTT法检测各组淋巴细胞的增殖情况。采用ELISA方法检测各组培养上清中IL-2的含量。

结果: 分离培养的供体Lewis大鼠KC得率为 5×10^7 , 活率大于98%。构建的RNA干扰载体

背景资料
器官移植术后的急性排斥反应是受体淋巴细胞激活后攻击、破坏新植入的供体器官, 使其丧失功能的细胞免疫应答过程。淋巴细胞的活化需要双信号刺激, 一个是抗原肽-MHC分子-CD3/TCR复合物, 另一个是共刺激信号, 由抗原呈递细胞表面的共刺激分子与T细胞膜上的配体结合提供共刺激信号, 是T淋巴细胞活化所必须的, 其中最重要的共刺激信号为CD28/B7。通过改变抗原呈递细胞表面分子表达来阻断共刺激信号是目前免疫耐受研究的热点。

研发前沿
封闭抗原递呈的共刺激途径诱导免疫耐受是目前移植免疫研究最活跃的领域之一。针对抗原呈递细胞,如树突状细胞(DC),采用反义寡核苷酸、或单克隆抗体等封闭共刺激通路是目前常用的研究方法。

经酶切和测序鉴定正确。RNA干扰KC后其B7的表达降低了22%($P<0.01$)。将干扰B7表达的KC与BN大鼠的淋巴细胞进行共培养,与对照组相比,受体BN大鼠的淋巴细胞增殖降低了49%($P<0.01$),细胞培养上清中IL-2的分泌量下降了67%($P<0.01$)。

结论: RNA干扰供体Lewis大鼠KC B7分子的表达可明显抑制受体BN大鼠淋巴细胞的增殖和IL-2的产生。

关键词: 库普弗细胞; B7; 共刺激通路; RNA干扰; 免疫耐受

李涛, 朱继业, 柳枫, 冷希圣. RNA干扰供体大鼠库普弗细胞B7分子表达对受体大鼠淋巴细胞激活的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 39-44

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/39.asp>

0 引言

器官移植术后的急性排斥反应是受体淋巴细胞激活后攻击、破坏新植入的供体器官,使其丧失功能的细胞免疫应答过程。T淋巴细胞的活化和增殖在同种异体移植的急性排斥反应中起重要作用。T淋巴细胞的活化需要双信号刺激,一个是抗原肽-MHC分子-CD3/TCR复合物,另一个是共刺激信号,由抗原呈递细胞(antigen processing cell, APC)表面的共刺激分子与T细胞膜上的配体结合提供共刺激信号,是T淋巴细胞活化所必须的,其中最重要的共刺激信号为CD28/B7^[1-6]。活化的T淋巴细胞分泌大量的IL-2以自分泌或旁分泌的方式作用于自身及其他T细胞,使得T细胞持续激活并大量分裂增殖^[1]。

目前已经证明,阻断共刺激信号能够成功地诱导免疫耐受,通过改变抗原呈递细胞表面分子表达诱导免疫耐受的发生是完全可能的^[7-11]。肝脏的库普弗细胞(kupffer cells, KC)是肝脏中的一种重要的抗原呈递细胞,在肝移植的急性排斥反应过程中起重要的作用^[12]。在大鼠的肝移植模型中, Lewis大鼠→BN大鼠是肝移植急性排斥反应模型。本研究分离供体Lewis大鼠的KC,采用RNA干扰KC中B7的表达,然后再将KC与受体BN大鼠的淋巴细胞共培养,通过KC的介导,封闭CD28/B7共刺激信号,抑制T细胞增殖及IL-2的产生,防止大量效应性T淋巴细胞的产生,从而达到防止急性排斥反应发生的目的。

1 材料和方法

1.1 材料 供体Lewis δ 大鼠, SPF级, 体质量

300-400 g; 受体BN δ 大鼠, SPF级, 体质量300-400 g, 购自北京维通利华公司。普通饲料喂养, 自由进食水。IV型胶原酶(collagenase type IV, 活性125 kU/g)、链霉菌蛋白酶E(pronase E, 活性4000 KPU/g)、Histodenz和latex-beads荧光颗粒为美国Sigma公司产品。Dnase I 和胰蛋白酶(华美生物工程公司), 活性600-1000 kU/mg。RPMI 1640无钙培养基(Gibco公司)。胎牛血清(hyclone公司)。小鼠抗大鼠CD163 ED2 mAb(mouse anti rat CD163, Serotec公司), 鼠抗兔溶酶体膜相关蛋白2(lysosomal associated Membrane protein 2, LAMP-2为美国生物学公司产品)。HindIII, BamH I, T₄ DNA连接酶, 感受态宿主菌为大肠杆菌DH5α, pSilencer 3.1H1-Neo真核表达载体, pEGFP-N1绿色荧光蛋白载体, IL-2的ELISA检测试剂盒, 均购自北京鼎国生物技术公司。大鼠B7引物及内参照GAPDH自行设计, 均由上海生工公司合成。引物序列及扩增片段长度见表1。

1.2 方法

1.2.1 供体Lewis大鼠KC的分离培养和鉴定: 我们改良的方法^[13]: 大鼠麻醉后, 开腹门静脉插管, 灌注链霉菌蛋白酶E和IV型胶原酶消化肝脏, 得到肝脏非实质细胞悬液, 用Histodenz密度梯度离心分离KC, 于37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养30 min, 计数, 以 1×10^9 个/L的浓度接种于新瓶中培养, 24 h后洗去未贴壁的细胞, 即可获得纯化的大鼠KC。使用ED2(mouse anti rat CD163)、LAMP2(rabbit anti-rat lysosome associated membrane protein 2)免疫细胞化学, 并联合latex-beads吞噬实验和电镜观察来鉴定KC。0.4%的台盼蓝染色鉴定细胞的产量和存活率。

1.2.2 含大鼠B7干扰片段的Psilencer 3.1H1-Neo真核表达载体的构建和鉴定及转染供体大鼠KC: 参考大鼠的全基因序列, 利用siRNA Target软件, 由北京鼎国生物公司设计并合成B7的RNA干扰片段。在干扰片段的两端分别加入BamH I 和HindIII两个酶切位点, 以确保干涉片段可以定向插入真核表达载体Psilencer 3.1-H1 Neo。并以绿色荧光蛋白作为报告基因, 构建好的载体进行酶切和测序鉴定。

将培养的供体Lewis大鼠KC分为以下三组: A组为对照组; B组为空载体组; C组为RNA干扰B7表达组。采用电穿孔法转染KC。转染48-72 h后行以下检测。

1.2.3 RT-PCR方法检测供体大鼠KC B7分子表达的变化: 采用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA。

表 1 PCR引物

引物	引物序列	扩增片段长度
B7	5-GGAATCAACCTTCCCAAGCTAAAG-3 5-AGACTTCATTTCTGGAGAAGC-3	153 bp
GAPDH	5-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3 5-GTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3	286 bp

取5 μg RNA进行cDNA的合成, 采用20 μL 反应体系合成cDNA. PCR扩增B7, 同一标本扩增GAPDH作为内对照. 引物序列及扩增片段长度见表1. cDNA合成体系为: 取1 μL RNA(1 g/L)样品, 加入0.5 mL离心管中, 按下列参数加入试剂, 聚体随机引物: 0.1 μL (50 ng); AMV 5 \times buffer: 3 μL ; dNTP(10 mmol/L): 0.4 μL ; RNasin(20 单位/ μL): 1 μL ; AMV(10 U/ μL): 0.5 μL H₂O(DEPC处理): 9.0 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 灭活AMV 5 min. cDNA合成后再进行PCR反应, 体系如下: 取5 μL cDNA模板按下列参数加入试剂: 10 \times PCR buffer 2.0 μL ; dNTP 0.5 μL ; GAPDH引物0.5 μL (50 ng); B7引物0.5 μL (50 ng); Taq酶(2 U/ μL), 0.5 μL (1 U); H₂O, 16 μL , 循环条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 扩增30轮, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸加时1 min. 取15 μL PCR扩增产物于12 g/L琼脂糖凝胶进行电泳, 数码相机拍照, 记录结果. 用软件分析结果, 得到B7/GAPDH的灰度值比值.

1.2.4 建立各组供体Lewis大鼠KC和受体BN大鼠淋巴细胞的共培养体系, 采用MTT法检测受体淋巴细胞的增殖: BN大鼠淋巴细胞悬液的制备: 无菌条件下切除BN大鼠脾脏, 研磨后, 用80 μm 尼龙网过滤, 1200 r/min离心5 min, 用红细胞裂解液FASTlysingTM Solution 20 mL, 等渗裂解脾淋巴细胞悬液中的红细胞10 min, 过滤后, 再次离心1200 r/min 5 min, 调整终浓度为实验所需(10¹⁰/mL). 建立供体Lewis大鼠KC和受体BN大鼠淋巴细胞的共培养体系, 共培养48-72 h后, 取96孔板, 每孔加入100 μL 受体淋巴细胞悬液(1 \times 10⁷/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO₂孵育箱中过夜; 细胞同步化: 灭菌PBS洗3遍细胞后加入无血清培养基继续培养16-24 h; 每孔中加入5 g/L的MTT 40 μL , 终浓度0.1 g/L, 在同样条件下继续培养4 h; 弃去培养液, 每孔加入等体积的DMSO, 充分溶解代谢产物, 酶标仪测定540 nm吸光度.

1.2.5 各组细胞共培养上清中IL-2含量的检测: 采用双抗体夹心ELISA法, 测定各组培养上清

表 2 供体大鼠库普弗细胞B7表达的变化(mean \pm SD, $n = 6$)

分组	B7/GAPDH
对照组	1.145 \pm 0.56
空载体组	1.054 \pm 0.24
RNA干扰B7表达组	0.897 \pm 0.69 ^a

^a $P < 0.01$ vs 对照组.

中IL-2的含量. 按照试剂盒说明进行操作, 在450 nm处测A₄₅₀值, IL-2浓度与A₄₅₀值之间呈正比, 通过绘制标准曲线求出各组标本中IL-2浓度.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 以组间 t 检验进行统计学处理. 采用SPSS10.0软件分析, $P < 0.05$ 认为有统计学差异.

2 结果

2.1 供体Lewis大鼠KC的分离培养和鉴定 供体Lewis大鼠KC得率为5 \times 10⁷个, 以0.4%的台盼蓝染色, 细胞活率为98%. 培养24 h后, KC贴壁生长, 呈圆形、三角形或多角形(图1A), 电镜观察可见胞质丰富, 细胞表面有大量的突起(图1B), 细胞内含大量核糖体和吞噬体, 有发达的内质网、高尔基体和分泌型囊泡. 免疫细胞化学染色鉴定, CD163 ED2 mAb细胞大于98%, lysosome膜相关蛋白2阳性细胞占99%. 吞噬实验1 h后可见超过98%的细胞都吞噬了latex-beads, 胞质中见大量的吞噬颗粒(图1C-D).

2.2 含大鼠B7干扰片段的Psilencer 3.1H1-Neo真核表达载体的鉴定 共设计10条干扰片段, 经过测算后从其中选出1条片段进行合成. 在其两端加上BamH I 和HindIII两个酶切位点后, 定向克隆到Psilencer 3.1H1-Neo真核表达载体, 转化感受态大肠杆菌DH5 α , 经筛选后提取重组的Psilencer 3.1H1-Neo, 经过酶切和测序鉴定正确(图2).

2.3 重组Psilencer 3.1H1-Neo-B7转染供体大鼠KC后B7表达的变化 构建成功的重组Psilencer 3.1H1-Neo-B7真核表达载体转染供体Lewis大鼠KC, 绿色荧光蛋白为报告基因(图3), 转染效率为30%-40%.

转染72 h后提取供体大鼠KC的总RNA, 采用RT-PCR方法检测B7表达的变化(图4). 与对照组相比, RNA干扰后B7的表达降低了22%(表2, $P < 0.01$).

2.4 供体大鼠KC与受体BN大鼠淋巴细胞共培养后淋巴细胞的增殖情况 采用MTT法检测表明,

相关报道

目前已经证明, 阻断共刺激信号能够成功地诱导免疫耐受, 通过改变抗原呈递细胞表面分子表达诱导免疫耐受的发生是完全可能的. 已进行的尝试包括将Fas-L的基因片段导入抗原呈递细胞中、应用反义寡核苷酸或CD40L的单抗封闭共刺激信号以及利用体外合成的HLA相关肽改变抗原呈递细胞表面分子结构等方法都达到了诱导T细胞凋亡的目的.

应用要点
 本文证明在体外降低抗原呈递细胞B7分子的表达可以抑制效应T细胞的活化,从而达到诱导特异性免疫耐受的效果,为进一步的体内诱导特异性免疫耐受以及将来的临床应用打下了基础.

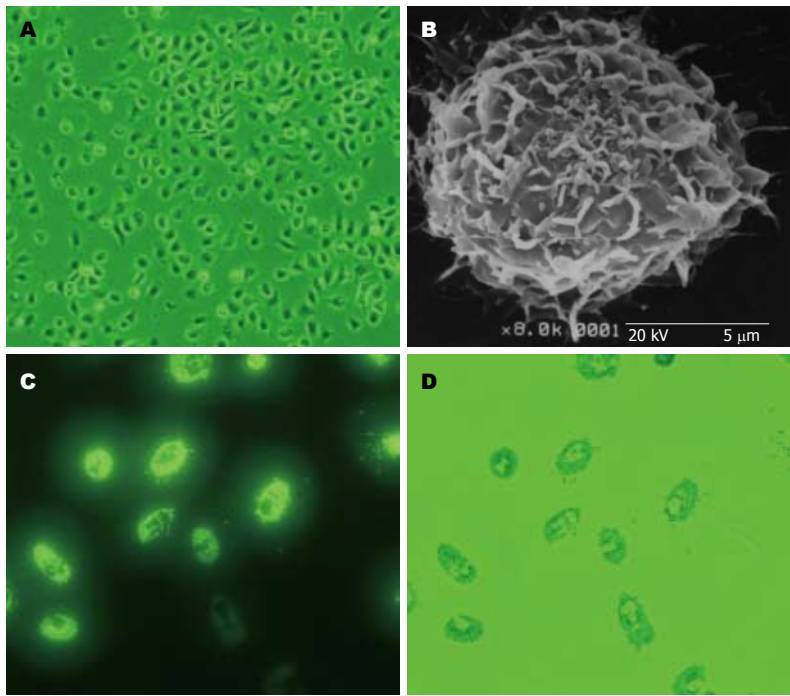


图 1 KC 的分离培养和鉴定. A: 培养24 h的KC($\times 100$); B: KC的扫描电镜观察($\times 8000$); C: 吞噬实验, 荧光显微镜下观察($\times 200$); D: 普通显微镜下同一视野($\times 200$).

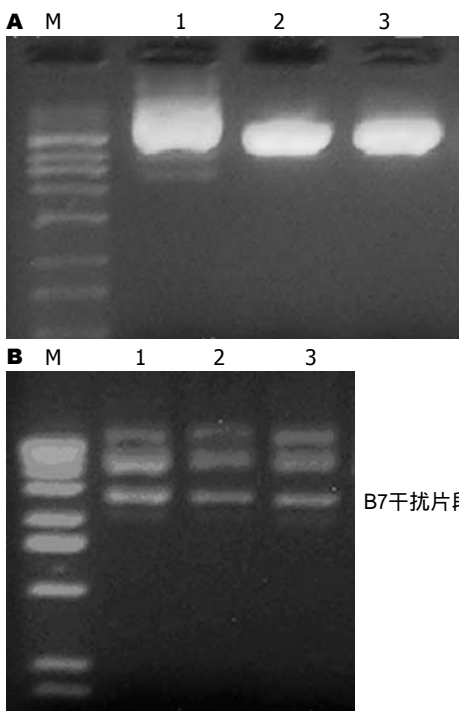


图 2 重组Psilencer 3.1H1-Neo-B7真核表达载体的酶切鉴定. A: *Hind* 单酶切鉴定, M: Marker(λ DNA/*Eco*R+*Hind*); 1: 重组的Psilencer 3.1H1-Neo; 2-3: *Hind* 单酶切; B: *Hind* 和*Bam*H 双酶切鉴定, M: Marker(λ DNA/*Eco*R+*Hind*); 1-3: *Hind* +*Bam*H 双酶切.

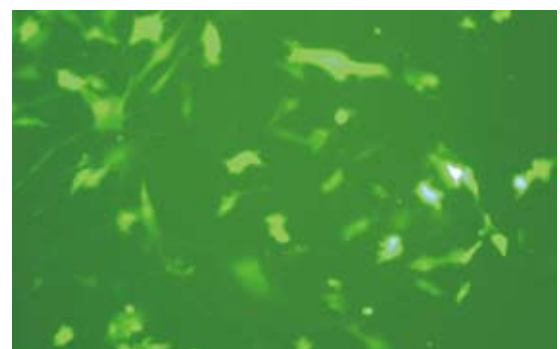


图 3 重组Psilencer 3.1H1-Neo-B7真核表达载体转染供体Lewis大鼠KC($\times 200$).

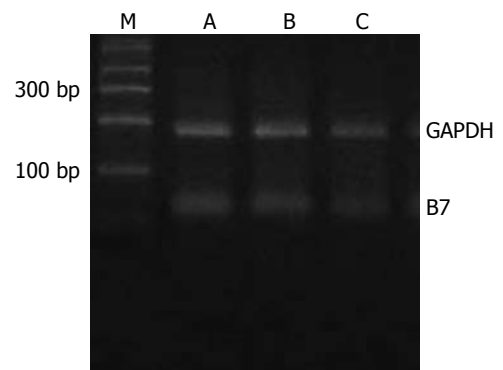


图 4 RNA干扰B7表达后RT-PCR检测各组细胞B7表达. M: Marker; A: 对照组; B: 空载体组; C: RNA干扰B7表达组.

RNA干扰供体KC B7分子的表达能显著抑制受体淋巴细胞的增殖,与对照组相比,淋巴细胞的增殖降低了49%(图5A, $P < 0.01$).

2.5 各组共培养上清中IL-2含量的变化 ELISA法检测各组细胞培养上清中的IL-2含量,结果表明,

RNA干扰供体KC B7分子表达能显著抑制受体淋巴细胞的IL-2分泌(图5B).与对照组相比,IL-2的分泌量下降了67%($P < 0.01$).

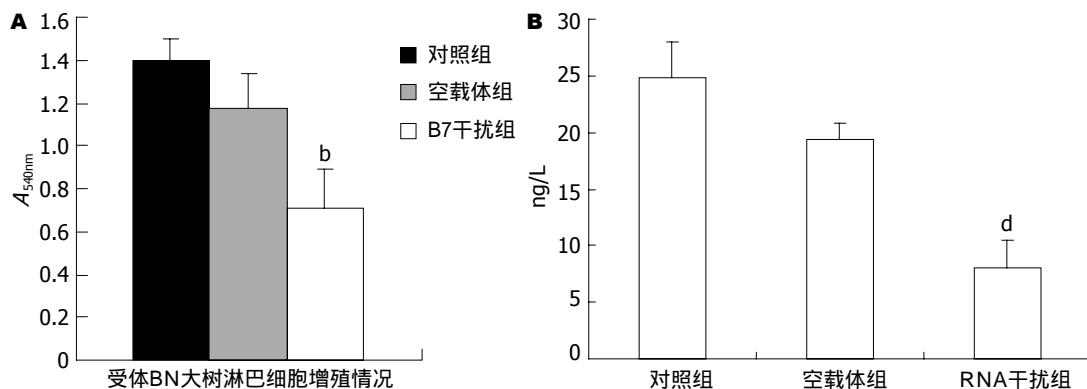


图 5 A: MTT法检测受体BN大鼠淋巴细胞增殖; B: ELISA法检测各组细胞培养上清中的IL-2含量。^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

T淋巴细胞的活化需要两个信号, 第一个信号是T淋巴细胞表面的TCR-CD3复合物同抗原呈递细胞(APC)上的MHC-II类抗原肽复合物结合, 赋予免疫应答的特异性, 但不引起T细胞增生和分泌细胞因子; 第二个信号是抗原非特异性的共刺激(costimulatory)信号, 由抗原呈递细胞表面的共刺激分子与T细胞上的配体结合所诱导, 启动维持并调节活化级联反应, 决定了T细胞是活化增殖, 或者转变为无反应状态甚至凋亡^[1]。CD28/B7是最经典也是最重要的共刺激通路。CD28广泛表达于T细胞。B7则表达在树突状细胞(DC)、肝库普弗细胞、血管内皮细胞、肺巨嗜细胞等。CD28与抗原呈递细胞上的B7结合后, 为T细胞提供共刺激信号^[2]。CD28和B7的结合对初次免疫应答的诱导是必需的, 主要涉及抗原呈递细胞与T细胞相互作用的起始阶段, 该信号修饰和补充TCR信号, 并将多种信号整合后, 起信号传递、增强或放大免疫应答的作用。初始T细胞上的CD28与抗原呈递细胞上的B7结合后, 可以促进白细胞介素-2(IL-2)的转录, 同时使IL-2受体在T细胞上表达增加, 从而促进T细胞增殖, 还可以通过增加Bcl-xL的表达途径使T细胞免于凋亡^[14-15]。如果只有第一信号而无CD28/B7共刺激信号, 则T细胞无能或凋亡, 如果只有共刺激信号而无第一信号则无任何作用^[1,3-5]。CD28/B7共刺激信号对T细胞的活化有重要的加强作用。

因此, 在器官移植免疫中, 如果能够降低抗原呈递细胞上B7分子的表达, 阻断CD28/B7共刺激信号通路, 则能抑制效应T细胞的活化和增生, 受体免疫系统就无法进一步产生针对移植器官的免疫应答。受体对供体器官的特异性无免疫应答即为免疫耐受现象, 可使移植器官获得

长期存活。以往的研究表明, 在同种异体移植中, 阻断共刺激通路能够成功地诱导免疫耐受^[7-11,16]。研究发现, 在肝脏中的DC主要是不成熟的DC, 由于其表面的B7分子、MHC-II类分子的表达明显下降, 因此不能有效地介导免疫反应。在肝脏中主要起作用的抗原呈递细胞是KC, 其位于肝窦内, 能表达B7, MHC-II类分子。在肝移植动物模型中, 随着排斥反应的启动, KC的MHC-II类分子表达明显增加; 而在人体肝移植中, 移植物的排斥反应和胆管消失综合征的程度与来源于供体的KC数量成正比^[12,17-19]。

我们采用RNA干扰来降低KC上B7分子的表达, RNA干扰(RNAi, RNA interference)即双链RNA介导的、序列特异的、同源基因转录后的基因沉默效应^[20-25]。他可以通过抑制蛋白表达模拟基因敲除技术。在此过程中, 与双链RNA有同源序列的信使RNA(mRNA)被降解, 从而抑制该基因的表达。RNA干扰是存在于真核细胞内的一种自我保护现象, 既能对抗如病毒基因或人工转入基因所表达的mRNA等外源基因的危害, 又能降解自身异常基因产生的mRNA。RNA干扰主要发生在基因转录后, 即mRNA的修饰或翻译水平上, 具有特异、高效和持久的特点, 为临床上特异性的基因干预治疗开辟了一条通路。并为通过阻断共刺激通路来诱导免疫耐受提供了新的方法, 即应用RNA干扰技术敲除供体抗原呈递细胞中共刺激分子的表达以阻断共刺激信号从而使效应性T细胞无能, 达到免疫耐受的作用。

在本研究中, 我们成功地分离培养并鉴定了作为供体的Lewis大鼠KC, 采用RNA干扰的方法降低了供体大鼠肝脏中的抗原呈递细胞KC上B7分子的表达, RNA干扰后B7的表达降低了22%。同时我们分离培养了受体BN大鼠的淋巴

名词解释

RNA干扰: 双链RNA介导的、序列特异的、同源基因转录后的基因沉默效应。他可以通过抑制蛋白表达模拟基因敲除技术。在此过程中, 与双链RNA有同源序列的信使RNA(mRNA)被降解, 从而抑制了该基因的表达。RNA干扰是存在于真核细胞内的一种自我保护现象, 既能对抗如病毒基因或人工转入基因所表达的mRNA等外源基因的危害, 又能降解自身异常基因产生的mRNA。

同行评价
本文选题新颖, 实验方法合理, 结果可信, 有一定的学术价值.

细胞, 将干扰B7表达的KC与受体大鼠的淋巴细胞进行共培养. 本研究发现, 这种方法能有效地阻断CD28/B7共刺激通路, 明显地抑制了淋巴细胞的活化和增殖, 并抑制了淋巴细胞产生细胞因子IL-2. 与对照组相比, 受体BN大鼠的淋巴细胞增殖降低了49% ($P < 0.01$). 细胞培养上清中IL-2的分泌量下降了67% ($P < 0.01$).

总之, 我们以供体Lewis大鼠的KC为介导, 采用RNA干扰的方法降低了KC上共刺激分子B7的表达, 以此来封闭共刺激通路CD28/B7, 达到抑制受体效应T细胞激活、增殖以及分泌IL-2等细胞因子的能力, 证明在体外降低抗原呈递细胞B7分子的表达可以抑制效应T细胞的活化, 从而达到诱导特异性免疫耐受的效果.

4 参考文献

- Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* 2006; 25: 2623-2633
- Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005; 6: 223
- Wang S, Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 37-42
- 任亚琳. B7-CD28家族成员的免疫调节功能及其最新研究进展. *国外医学免疫学分册* 2005; 28: 324-328
- 陈佳佳, 李兰娟. B7-CD28家族共刺激途径的研究进展及其临床意义. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2004; 31: 334-338
- 纪志鹏. 共刺激分子CD28/B7家族在抑制肝脏移植排斥反应中的研究现状及展望. *中国现代普通外科进展* 2005; 8: 260-264
- Snanoudj R, de Préneuf H, Créput C, Arzouk N, Deroure B, Beaudreuil S, Durrbach A, Charpentier B. Costimulation blockade and its possible future use in clinical transplantation. *Transpl Int* 2006; 19: 693-704
- 李红卫, 孟自力, 张卫民, 邱玉华, 沈振亚, 滕小梅. 阻断B7/CD28途径诱导异种免疫耐受的体外研究. *同济大学学报(医学版)* 2004; 25: 108-111
- 王伟, 刘彤, 朱理玮, 王鹏志. RNA干扰阻断B7/CD28共刺激通路在小鼠心脏移植中的抗排斥作用. *中华器官移植杂志* 2006; 27: 648-651
- Fan K, Wang H, Wei H, Zhou Q, Kou G, Hou S, Qian W, Dai J, Li B, Zhang Y, Zhu T, Guo Y. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation* 2007; 84: 746-754
- Oderup C, Malm H, Ekberg H, Qi Z, Veress B, Ivars F, Corbascio M. Costimulation blockade-induced cardiac allograft tolerance: inhibition of T cell expansion and accumulation of intragraft cD4(+)Foxp3(+) T cells. *Transplantation* 2006; 82: 1493-1500
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7413-7420
- 柳枫, 朱继业, 李涛, 冷希圣. 大鼠库普弗细胞分离培养方法的改良. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 532-535
- 耿磊, 郑树森. B7-H1与肝脏免疫. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 718-720
- Carreno BM, Carter LL, Collins M. Therapeutic opportunities in the B7/CD28 family of ligands and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 424-430
- Wang G, Feng Y, Hao J, Li A, Gao X, Xie S. Induction of xenogeneic islet transplantation tolerance by simultaneously blocking CD28-B7 and OX40-OX40L co-stimulatory pathways. *Sci China C Life Sci* 2005; 48: 515-522
- Everett ML, Collins BH, Parker W. Kupffer cells: another player in liver tolerance induction. *Liver Transpl* 2003; 9: 498-499
- Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489-497
- Fung J, Kelly D, Kadry Z, Patel-Tom K, Egtesad B. Immunosuppression in liver transplantation: beyond calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2005; 11: 267-280
- Aphasizhev R, Sbicego S, Peris M, Jang SH, Aphasizheva I, Simpson AM, Rivlin A, Simpson L. Trypanosome mitochondrial 3' terminal uridylyl transferase (TUTase): the key enzyme in U-insertion/deletion RNA editing. *Cell* 2002; 108: 637-648
- Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 2000; 101: 235-238
- Kappel S, Matthes Y, Kaufmann M, Strebhardt K. Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nat Protoc* 2007; 2: 3257-3269
- Grimm D, Kay MA. Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest* 2007; 117: 3633-3641
- Grimm D, Kay MA. RNAi and Gene Therapy: A Mutual Attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007: 473-481
- Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1998-2012

编辑 程剑侠 电编 何基才

IL-6体外对PC12细胞株DA和NE代谢抑制的机制

李荣, 王杰军, 沈毅珺, 吴欣, 王妙苗, 王喜, 何晓静

李荣, 王杰军, 吴欣, 王妙苗, 王喜, 何晓静, 第二军医大学长征医院肿瘤科 上海市 200070
沈毅珺, 上海复旦张江生物医药股份有限公司基因工程研发部 上海市 200070
李荣, 第二军医大学在读博士, 主要从事肿瘤患者生活质量的研究.
通讯作者: 王杰军, 200070, 上海市和田路64号, 第二军医大学长征医院肿瘤科. jiejunw@csc.org.cn
收稿日期: 2007-06-19 修回日期: 2007-09-13

In vitro effect of interleukin-6 on the synthesis of DA and NE in PC12 cell line and the related signal transduction

Rong Li, Jie-Jun Wang, Yi-Jun Shen, Xin Wu, Miao-Miao Wang, Xi Wang, Xiao-Jing He

Rong Li, Jie-Jun Wang, Xin Wu, Miao-Miao Wang, Xi Wang, Xiao-Jing He, Department of Oncology, Second Military Medical University Changzheng Hospital, Shanghai 200070, China
Yi-Jun Shen, Fudan-Zhangjiang Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203, China
Correspondence to: Jie-Jun Wang, Department of Oncology, Second Military Medical University Changzheng Hospital, 64 Hetian Road, Shanghai 201203, China. jiejunw@csc.org.cn
Received: 2007-06-19 Revised: 2007-09-13

Abstract

AIM: To examine the relationship between interleukin (IL)-6 and the synthesis of DA and NE in the PC12 cell line, and to explore the related signal transduction.

METHODS: Differentiated PC12 cells were used to examine the effect of IL-6 (0.5, 1 and 1.5 mg/L) on the synthesis of DA and NE. Apoptosis of PC12 cells was measured by flow cytometry. The concentration of DA and NE in PC12 cells and the medium was determined by HPLC. After exposure to IL-6 (1 mg/L), protein expression of p-STAT3 in the nucleus and STAT3 and Tyrosine Hydroxylase (TH) in the cytoplasm of PC12 cells was measured by Western blotting.

RESULTS: The apoptosis rate of PC12 cells cultured in the presence of different concentrations of IL-6 did not differ significantly. The synthesis of DA and NE in PC12 cells changed in accordance with the concentration of IL-6 added to

the medium, and it obviously differed from that of the controls at a concentration of 1 mg/L. IL-6 enhanced the protein expression of STAT3 and the transcription to nucleus and decreased protein expression of TH.

CONCLUSION: IL-6 reduced the synthesis of DA and NE in vitro. The mechanism underlying the effects of IL-6 on the synthesis of DA and NE involved JAK-STATs signal transduction and decreased protein expression of TH.

Key Words: Signal transduction; JAK-STAT3; Dopamine; Tyrosine Hydroxylase

Li R, Wang JJ, Shen YJ, Wu X, Wang MM, Wang X, He XJ. *In vitro* effect of interleukin-6 on the synthesis of DA and NE in PC12 cell line and the related signal transduction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 45-49

摘要

目的: 体外研究IL-6与PC12细胞株神经递质DA, NE合成代谢之间的关系及JAK-STATs途径在其中的作用.

方法: 用不同剂量的IL-6(0.5 mg/L, 1 mg/L和1.5 mg/L)处理分化的PC12细胞, 采用磷脂酰丝氨酸外翻法检测细胞凋亡率, 应用HPLC检测上清和细胞裂解液中DA和NE的含量. 采用1 mg/L IL-6处理分化的PC12细胞, 用免疫印迹法(Western blotting)检测IL-6处理不同时间内全细胞裂解液中STAT3、TH蛋白表达水平, 浆蛋白及核蛋白裂解液内STAT3和p-STAT3表达水平.

结果: 各组细胞凋亡率无明显差别. 加入IL-6后, 随着浓度的增加, DA和NE代谢呈近似剂量依赖性降低, 当IL-6为1 mg/L时DA和NE的变化有统计学意义. 1 mg/L IL-6可以增加STAT3蛋白的表达、p-STAT3蛋白的转核、降低酪氨酸强化酶的表达.

结论: IL-6通过JAK-STAT3信号转导途径, 影响酪氨酸羟化酶的表达, 从而降低DA和NE的合成.

背景资料
中枢单胺类神经传导缺陷是抑郁症较为公认的假说之一, 即脑内NE、5-HT和DA神经递质含量下降为抑郁症主要病因的假说. 到目前为止, 神经生化学理论是迄今被临床药理充分利用以阐述抑郁症发病的神经生物学机制.

研发前沿
现代研究证明, IL-6影响儿茶酚胺类神经递质的代谢, 但是不同的研究组观察得到的结果不尽一致, 国内外的现有研究都局限在现象研究, 且都集中在体内研究, 而关于IL-6影响儿茶酚胺类神经递质代谢之间的信号转导通路及体外研究都鲜有报道。

关键词: 信号转导; JAK-STAT3; 多巴胺; 酪氨酸羟化酶

李荣, 王杰军, 沈毅珺, 吴欣, 王妙苗, 王喜, 何晓静. IL-6体外对PC12细胞株DA和NE代谢抑制的机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 45-49
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/45.asp>

0 引言

一些以神经递质代谢障碍为基础的疾病如抑郁, 常伴随脑脊液或脑组织中IL-6的升高. 现代研究已经证明, IL-6可以影响儿茶酚胺类神经递质的代谢, 但是不同的研究组观察得到的结果不尽一致, 如Maes *et al*^[1]发现IL-6可以降低5-HT的合成代谢, 而Zhang *et al*^[2]发现IL-6可以促进5-HT的合成代谢^[2]. 但国内外的现有研究都局限在现象研究, 且都集中在体内研究, 而关于IL-6影响儿茶酚胺类神经递质代谢之间的信号转导通路及体外研究都鲜有报道. 为此, 我们采用国际实验研究常用的用于研究离子通道、神经递质合成和释放的体外模型^[3](分化的PC12细胞)为研究对象, 通过体外实验观察IL-6对儿茶酚胺类神经递质代谢的影响以及可能的细胞信号转导途径.

1 材料和方法

1.1 材料 HPLC检测仪器和流式细胞仪, 显微镜(Cytomics™FC500系列), 流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司), Western blot仪器, 孵箱. PC12细胞由第二军医大学神经生物教研室惠赠(购自ATCC), NGF(购自Sigma公司), 胎牛血清、马血清、DMEM和多聚赖氨酸(Gibico), PI和Annexin V(Sigma公司), 所有应用于细胞HPLC检测的溶剂和物质中, 除乙腈外均购自于Merck公司, 乙腈购自于上海中科院药物研究所; STAT3和p-STAT3的一抗(Santa cruz biotechnology公司), 工作浓度1:1000, STAT3和p-STAT3的二抗(Cell signaling公司), 工作浓度1:3000, 酪氨酸羟化酶的一抗(Chemicon公司), 工作浓度1:1000, 二抗(Cell Signaling公司), 工作浓度1:3000; β -actin一抗, 二抗, 工作浓度1:2000; 细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、Western及IP细胞裂解液和PVDF膜(Beyotime Biotechnology公司).

1.2 方法 选用第13-15代的PC12细胞, 以 6×10^5 个/孔接种在铺被有多聚赖氨酸的6孔板中, 培养液选用含100 mL/L马血清, 50 mL/L胎牛血清的DMEM, 在含有50 mL/L CO₂, 37℃的孵箱中培育. 接种后第1天, 用50 μ g/L的NGF诱导分化, 在

含有NGF的DMEM中培养7-10 d, 隔天换液^[4], 然后分为对照组, 不同剂量IL-6处理组(0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L).

1.2.1 细胞凋亡的检测: 在细胞诱导分化后, 分为8组, 为空白对照组, IL-6处理组(0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L). 在培养12, 24, 36, 48 h后收集PC12细胞做如下处理, 用Biovision公司生产的Annexin V-FITC试剂盒检测细胞凋亡率, 分别用磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞洗2次, 取 5×10^5 个细胞, 800 r/min离心5 min, 加入结合缓冲液450 μ L、Annexin V-FITC 5 μ L, PI 2 μ L避光染色5 min, 应用流式细胞仪进行检测.

1.2.2 高效液相检测神经递质的合成和分泌: 在细胞诱导分化后, 同上分为8组, 处理24 h. 按照参考文献[5]的方法, 分别收集培养液和细胞, 培养液离心(17 500 g, 10 min, 4℃)去掉蛋白及可能存在的细胞碎屑, 立即取5 μ L用做HPLC检测. 收集的细胞用0.2 mol/L高氯酸处理后低温离心(17 500 g, 10 min, 4℃), 然后参照文献[6], 将细胞裂解液和上清应用高效液相电化学检测器检测, 结果见图1.

1.2.3 STAT3和酪氨酸羟化酶的检测: 将培养的PC12细胞接种于6孔细胞培养板中, 在进行Western blot检测STAT3时将细胞分为IL-6(1 mg/L)处理0, 0.5, 1, 2 h组; 在进行Western blot检测TH时将细胞分为IL-6处理0, 6, 12, 24 h组. 在垂直电泳两玻璃板(BIO-RAD, 美国)间隙中灌注分离胶及浓缩胶, 将已备好的蛋白样本煮沸5 min后, 用15 μ L微量注射器按预定顺序加样, 并加入标准分子质量对照(CST公司, 美国)3 μ L. 将凝胶固定于电泳装置(BIO-RAD, 美国), 并加入Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 稳压200 V电泳40 min, 至样品到达分离胶底部. 转膜使用BIO-RAD转移仪, 在稳压100 V的电流下转移60 min, 将凝胶上的蛋白条带转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 后将PVDF膜放入阻断缓冲液, 封闭60 min. 在阻断缓冲液中加入一抗(抗STAT3抗体, 抗酪氨酸羟化酶抗体, 抗p-STAT3抗体)4℃温度下摇过夜; 次日, 将摇过夜的PVDF膜放入阻断缓冲液, 并加入二抗, 在室温下摇1 h. 在暗室中进行显影, 室温中, 将PVDF膜置于显色混合液(Phototope-HRP Western blot detection)反应1 min, 在片夹中曝光. 底片在显影液中显影, 并在定影液中定影.

2 结果

2.1 IL-6与DA, NE代谢之间的关系 应用不同剂

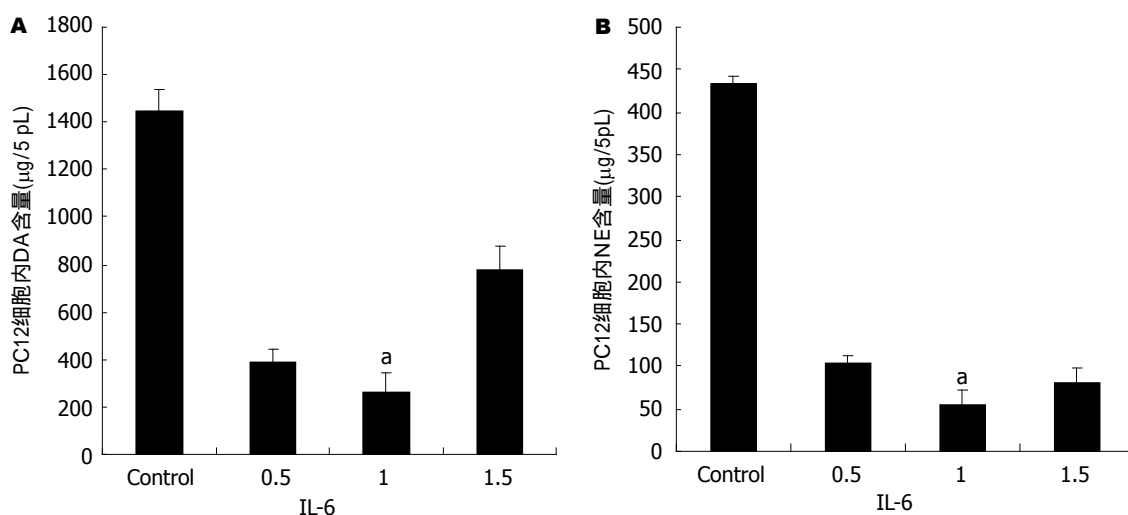


图 1 IL-6与PC12细胞内DA, NE代谢之间的关系. $P < 0.05$ vs Control.

量IL-6处理分化的PC12细胞, 然后参照文献[6], 将细胞裂解液和上清应用高效液相电化学检测器检测, 结果如图1所示.

2.2 PC12细胞全细胞裂解液中stat3表达 用1 mg/L的IL-6处理分化的PC12细胞, 不同时间点收集细胞. 抽提的蛋白用于Western blot分析, 结果如图2所示.

2.3 PC12细胞核和质蛋白中STAT3, p-STAT3表达 用1 mg/L的IL-6处理分化的PC12细胞, 用细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒处理分化的PC12细胞, 抽提的蛋白用于Western blot分析, 结果如图3所示.

2.4 PC12细胞中酪氨酸羟化酶表达 用1 mg/L的IL-6处理分化的PC12细胞, 抽提的蛋白用于Western blot分析, 结果如图4所示.

3 讨论

IL-6是一个双重作用的细胞因子, 在神经系统的生长和存活中发挥重要作用. 在正常生理条件下处于低水平状态, 可像神经生长因子一样促进神经系统的正常发育和修复, 但在高水平表达时可造成神经系统损伤^[7]. 在中枢神经系统(central nervous system, CNS), IL-6由激活的星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元细胞产生^[8-9]. 病理情况下产生高浓度的IL-6, 可引发许多病理行为, 包括抑制食欲^[10]、学习和记忆能力减退^[11], 引起神经功能退化等^[12]. 大量研究显示, 抑郁等以神经递质代谢障碍为基础病变的神经系统病变患者, 脑脊液及脑组织中IL-6水平明显升高^[13]. 有许多学者根据抑郁患者外周血中IL-6水平升高以及应用IL-6会引发与抑郁症状极为

创新盘点
本研究率先采用体外研究模式了解IL-6与DA、NE代谢之间的关系及可能信号转导途径, 对进一步进行该方面的研究具有启发意义.

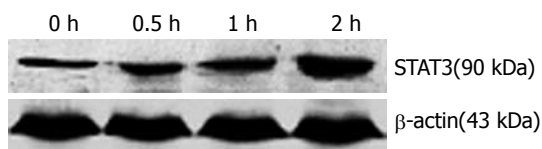


图 2 PC12细胞全细胞裂解液中stat3表达.

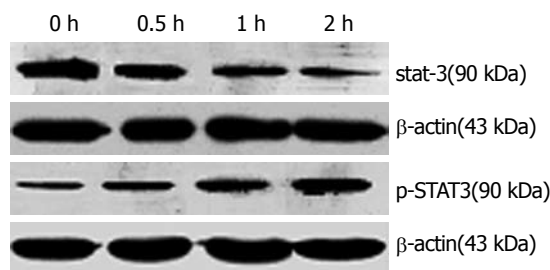


图 3 PC12细胞核和质蛋白中STAT3, p-STAT3表达.

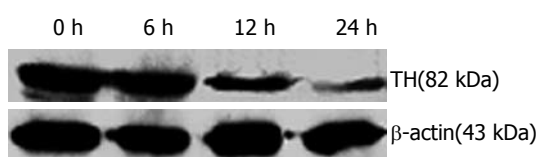


图 4 PC12细胞中酪氨酸羟化酶表达.

相似的病态综合征, 因而提出细胞因子导致抑郁的假说. 当前大量研究也同样指出, IL-6可以影响儿茶酚胺类神经递质的代谢, 但研究结果不尽一致, 究其原因, 可能是体内研究涉及到的神经内分泌的调节作用, 而鲜见相关信号转导机制及体外研究的报道.

PC12细胞株是来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 并可以在NGF诱导后分化的细胞株, 分化的PC12细胞为类交感神经元, 具有合成和分泌Ach, DA, NE和5-HT的功能. 广泛用于神经递质代谢的研究^[14]. 分化PC12细胞表面有IL-6受体,

应用要点

本实验从体外研究的角度再一次证实IL-6确实可以影响DA、NE的代谢,而这两种神经递质与抑郁的发生密切相关,支持Maes *et al*有关免疫功能与神经递质代谢之间联系的研究。

而且低剂量的IL-6对分化的PC12细胞具有保护作用,可以避免其免于无血清诱导的凋亡^[15-16]。我们应用不同剂量IL-6处理分化的PC12细胞后,发现细胞凋亡率无显著差别(结果未列出)。

我们应用不同剂量的IL-6处理分化的PC12细胞,发现5-HT的代谢没有明显变化,而高浓度的IL-6可以抑制PC12细胞合成和分泌DA、NE,以1 mg/L的作用最明显(图1)。在DA代谢方面,Goodwill *et al*^[17]发现IL-6升高的实验对象中DA浓度下降,结果与此一致,Zalcman *et al*也研究发现注射人IL-6(200 ng)可以升高大脑前皮质二羟苯乙酸(dihydroxy-phenyl acetic acid, DOPAC)的浓度^[18-19],即增加IL-6的分解代谢。但是,在NE及5-HT代谢方面与研究结果不一致^[1-2,20]。由于体外研究条件易于标准化,测试精确,因此对于IL-6对儿茶酚胺类神经递质代谢的结果更为客观,而体内研究的结果可能是众多细胞因子调控所得到的结果,并不能精确反应作用结果。

目前认为,IL-6的信号主要通过JAK-STAT途径转导至核内,在JAK-STAT途径中,IL-6主要激活STAT3^[21]。而JAK-STAT途径中的各主要蛋白在脑区的各个阶段和部位都有存在,并且参与中枢神经系统的发育及神经细胞的增殖、分化过程^[22],也与脑肿瘤、缺血等病理过程密切相关^[23]。通过Western blot方法,我们发现1 mg/L IL-6可以增加全细胞裂解液中STAT3蛋白的表达,以IL-6作用2 h最为明显。进一步研究表明细胞质中STAT3蛋白的表达没有明显变化,而细胞核内p-STAT3的含量明显升高,提示该细胞因子的作用主要是增加STAT3的活化及转核。而PC12细胞内的酪氨酸羟化酶的表达也随着下降,以IL-6作用24 h后最为明显,提示IL-6可能通过激活JAK-STAT3途径影响儿茶酚胺类神经递质酪氨酸羟化酶的表达,进而影响儿茶酚胺类神经递质的合成代谢。Goodwill *et al*的研究结果中也认为IL-6可以影响儿茶酚胺类神经递质合成的限速酶的表达进而影响DA的合成代谢^[17]。

我们的实验从体外研究的角度在一次证实IL-6确实可以影响DA、NE的代谢,而这两种神经递质与抑郁的发生密切相关,支持Maes *et al*的免疫功能与神经递质代谢之间的联系。但是,由于低浓度IL-6通过JAK-STAT3途径对分化的PC12细胞发挥保护作用,那么高浓度的IL-6是单独通过JAK-STAT3途径还是其他信号转导途径的共同作用,仍有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Maes M, Scharpe S, Meltzer HY, Bosmans E, Suy E, Calabrese J, Cosyns P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res* 1993; 49: 11-27
- 2 Zhang J, Terreni L, De Simoni MG, Dunn AJ. Peripheral interleukin-6 administration increases extracellular concentrations of serotonin and the evoked release of serotonin in the rat striatum. *Neurochem Int* 2001; 38: 303-308
- 3 Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 2424-2428
- 4 Ireland LM, Yan CH, Nelson LM, Atchison WD. Differential effects of 2,4-dithiobiuret on the synthesis and release of acetylcholine and dopamine from rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 1453-1462
- 5 Liu HQ, Zhu XZ, Weng EQ. Intracellular dopamine oxidation mediates rotenone-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 17-26
- 6 Liang YQ, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1127-1136
- 7 Zhao B, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res* 1998; 52: 7-16
- 8 Fernandes A, Falcao AS, Silva RF, Brito MA, Brites D. MAPKs are key players in mediating cytokine release and cell death induced by unconjugated bilirubin in cultured rat cortical astrocytes. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1058-1068
- 9 Ghorbel MT, Sharman G, Leroux M, Barrett T, Donovan DM, Becker KG, Murphy D. Microarray analysis reveals interleukin-6 as a novel secretory product of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Biol Chem* 2003; 278: 19280-19285
- 10 Elwan O, Madkour O, Elwan F, Mostafa M, Abbas Helmy A, Abdel-Naseer M, Abdel Shafy S, El Faiuomy N. Brain aging in normal Egyptians: cognition, education, personality, genetic and immunological study. *J Neurol Sci* 2003; 211: 15-22
- 11 Nishiyama N. Thymectomy-induced deterioration of learning and memory. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47: 161-165
- 12 Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res* 2000; 885: 25-31
- 13 Muller N, Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; 22: 1-33
- 14 Kim CH, Koo BS, Kim KO, Kim JK, Chang YC, Lee IS. *Salviae miltiorrhizae radix* increases dopamine release of rat and pheochromocytoma PC12 cells. *Phytother Res* 2006; 20: 191-199
- 15 Kunioku H, Inoue K, Tomida M. Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or

- chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci Lett* 2001; 309: 13-16
- 16 Umegaki H, Yamada K, Naito M, Kameyama T, Iguchi A, Nabeshima T. Protective effect of interleukin-6 against the death of PC12 cells caused by serum deprivation or by the addition of a calcium ionophore. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 911-916
- 17 Goodwill MH, Lawrence DA, Seegal RF. Polychlorinated biphenyls induce proinflammatory cytokine release and dopaminergic dysfunction: protection in interleukin-6 knockout mice. *J Neuroimmunol* 2007; 183: 125-132
- 18 Dunn AJ. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Sci* 1988; 43: 429-435
- 19 Zalcman S, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res* 1994; 643: 40-49
- 20 Terao A, Oikawa M, Saito M. Cytokine-induced change in hypothalamic norepinephrine turnover: involvement of corticotropin-releasing hormone and prostaglandins. *Brain Res* 1993; 622: 257-261
- 21 Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 2007; 178: 2623-9
- 22 Cattaneo E, Conti L, De-Fraja C. Signalling through the JAK-STAT pathway in the developing brain. *Trends Neurosci* 1999; 22: 365-369
- 23 Cattaneo E, Magrassi L, De-Fraja C, Conti L, Di Gennaro I, Butti G, Govoni S. Variations in the levels of the JAK/STAT and ShcA proteins in human brain tumors. *Anticancer Res* 1998; 18: 2381-2387

同行评价
本文图片清晰, 内容较新, 对基础研究有一定的参考价值.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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.

乙型肝炎病毒X蛋白与原发肝癌

侯全玲, 唐红, 黄飞骏

背景资料
HBV的感染与HCC的发生密切相关, HBx作为一种多功能蛋白在HBV相关性HCC发生发展过程中可能起至关重要的作用。

侯全玲, 黄飞骏, 四川大学华西基础医学与法医学院法医病理教研室 四川省成都市 610041
唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染病分子生物学研究室 四川省成都市 610041
国家自然科学基金资助项目, No.30570064
通讯作者: 黄飞骏, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西基础医学与法医学院法医病理教研室. fjhuang60123@163.com.
电话: 028-85568478
收稿日期: 2007-05-08 修回日期: 2007-12-22

Hepatitis B virus X protein and hepatocellular carcinoma

Quan-Ling Hou, Hong Tang, Fei-Jun Huang

Quan-Ling Hou, Fei-Jun Huang, Department of Forensic Pathology, Medical School of Basic and Forensic Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Hong Tang, Division of Biotherapy of Infectious Disease, State Key Laboratory of Biotherapy of China and Department of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China.

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570064.

Correspondence to: Fei-Jun Huang, Department of Forensic Pathology, Medical School of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. fjhuang60123@163.com

Received: 2007-05-08 Revised: 2007-12-22

Abstract

Primary hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the top 10 malignant tumors worldwide, and chronic infection with HBV is one of the major causes of HCC. HBV X protein (HBx) is an important regulatory protein, which plays a crucial role in the pathogenesis of HCC induced by HBV. This review focuses on the role and mechanism of HBx in the pathogenesis of HCC.

Key Words: Hepatitis B virus; HBV X protein; Hepatocellular Carcinoma

Hou QL, Tang H, Huang FJ. Hepatitis B virus X protein and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 50-55

摘要

原发性肝癌(HCC)是目前世界上十大恶性肿

瘤之一, 而慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是导致HCC最主要的原因之一. 由HBV X基因编码的X蛋白(HBx)是一种重要的调节蛋白, 在HBV诱发HCC过程中扮演重要角色, 因此一直是研究的热点. 本文就近年有关HBx在HCC发生中的作用及作用机制作一综述.

关键词: 乙型肝炎病毒; X蛋白; 肝癌

侯全玲, 唐红, 黄飞骏. 乙型肝炎病毒X蛋白与原发肝癌. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 50-55

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/50.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈全球范围广泛流行, 仅HBV慢性携带者就达近4亿. HBV感染不仅可引起急性、慢性和重型肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生密切相关. 大量流行病学和分子生物学资料已经证实, HBV在原发肝癌(HCC)发生中扮演重要角色, 而HBx在HBV相关性HCC发生发展过程中可能起至关重要的作用^[1-5]. 因此, HBx在HCC发生中的作用及作用机制一直是研究的热点. 现有资料显示, HBx是一种多功能蛋白, 对基因转录、信号传递、细胞周期和细胞增生凋亡等均具有调节作用, HBx可能通过这些作用直接或间接地导致肝细胞癌变.

1 HBx的结构、功能和定位

HBx由HBV DNA开放读码框架中最小的X基因编码, 由154个氨基酸组成, 分子量16.5 kDa. 全长的HBx由N-端1/3负调节区(1-50位氨基酸)和C-端2/3反式激活或共激活区(51-154位氨基酸)两个功能区构成. 研究表明, HBx本身不能直接与双链DNA结合, 但他可通过蛋白-蛋白相互作用与反式作用因子如AP-1、NF- κ B、TATA结合蛋白及RNA聚合酶II亚单位RBP5等结合, 增强转录因子NF- κ B、AP-1和SP-1等的活性, 并反式激活基因启动子如HBV的C启动子, 调节*N-ras*、*c-myc*、*c-jun*等癌基因及*P53*、*P21*和*P19*等抑癌基因的表达. HBx还可激活PI3K、JNKs,

MAPK等信号传导系统而参与HCC的发生发展.

目前, HBx的亚细胞定位尚有争议. HBx的分布与其功能密切相关. 研究表明, HBx在感染细胞中的定位依赖于HBx的总表达水平. HBx在低表达时完全或绝大部分位于胞核, 而高表达时分布于胞质和胞核, 主要蓄积于胞质. 胞质中的HBx又分为线粒体和非线粒体分布, 前者通过影响线粒体的功能, 而参与信号传导通路的活化和细胞凋亡的调控; 后者可能与信号传导及其他细胞器的功能调节相关. 而胞核中的HBx通过与转录因子相互作用, 调节基因的转录表达^[6-9].

2 HBV DNA X基因的整合、突变

HBV DNA在细胞中以游离和整合两种形式存在, 两者可同时存在. 在大部分HCC和癌旁组织中可见HBV DNA的整合. 整合常发生于HBV DNA链末端的两个直接重复序列(DR1和DR2), 而X基因紧邻DR序列, 因此整合也常发生于X基因及其附近. 研究证实, X基因是十分稳定的主要整合基因, 其整合率显著高于S、Pre-S和C等基因. 研究还发现, X基因的整合与HBx的表达和HCC的发生有着密切的关系.

2.1 X基因的整合对原癌基因及抑癌基因的影响

在表达HBx的HCC和癌旁组织中, 可见*c-myc*和*N-ras*等多个癌基因表达增加的现象. 研究也发现, X基因整合的肝癌细胞中P16 mRNA和蛋白水平均受影响, X基因可能通过整合使*P16*基因序列变异, 引起*P16*表达缺陷, 导致其G₁-S期滞留和抗增殖效应丧失^[10]. X基因可能通过整合直接激活原癌基因、抑制抑癌基因的表达而参与肝细胞癌变的发生.

2.2 X基因的整合致HBx序列变异对其功能的影响

对HCC患者肿瘤组织中整合的HBV DNA和非瘤组织及血清中游离的HBV DNA序列分析发现, 游离的HBV DNA多含全序列X基因, 而整合的HBV DNA序列X基因常出现多种序列变异, 包括核苷酸的缺失和点突变等. 其中以X基因3'-端核苷酸的缺失最常见, 130位和131位密码子突变次之. X基因3'-端核苷酸的缺失, 导致HBx出现C-端的缺失. 研究发现, 全序列的HBx抑制*ras*和*myc*转化细胞的能力, 而C-端缺失的HBx使*ras*、*myc*转化鼠胚胎纤维母细胞的活性增强. 研究还发现, C-端缺失的HBx能加速Huh7细胞G₀/G₁-S期的进程, 并使生长抑制效应结构域丢失. 可见C-端缺失的HBx失去全长HBx对细胞增生和转化的抑制作用, 并促进细

胞周期进程在肝癌形成中起重要作用^[11-14]. 整合的X基因还高频出现130位密码子和131位密码子分别发生AAG-ATG和GTC-ATC突变. 研究发现, 这种双重突变的HBx出现新的肝细胞核因子1(HNF-1)结合位点, 虽然野生型和突变型HBx均可与HNF-1结合, 但突变型较野生型HBx与HNF-1结合功能更强, 并激活其转录活性, 调节基因转录. 此突变位点接近X基因上反式激活功能至关重要的3个区域(密码子46-52、61-69和132-139)中第3个重要区域, 可能这种双重突变通过影响HBx的反式激活功能, 在致癌过程中起重要作用^[15]. 总之, X基因的整合可能是对HBx生物学结构和功能的修饰, 通过修饰使HBx的一些生物活性减弱甚至丧失, 而使某些生物活性增强或出现一些新的功能, 参与HCC的发生发展.

3 HBx对肝细胞增生的影响

细胞的无限增生是肿瘤发生的前提, HBx可通过多种机制刺激肝细胞增生, 参与肝细胞癌变的发生.

3.1 HBx与信号传导通路 HBx可通过受体酪氨酸蛋白激酶途径、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)途径及非受体酪氨酸蛋白激酶途径等多种信号传导通路参与肝细胞增生的调节: (1)促胰岛素样生长因子(IGF)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)和表皮生长因子受体(EGFR)等高表达, 激活Src家族激酶, 活化Jak1-STAT或与*P53*结合使*P53*下游对PI3K/AKT的负性调节作用的靶基因PTEN表达下调, 激活PI3K/Akt/Bad信号通路. HBx也可直接与PI3K的催化亚基p110结合激活PI3K, 或使Akt和(或)Bad磷酸化激活PI3K信号通路^[16-18]. (2)通过促IGF、IGFR的高表达进而活化受体酪氨酸激酶(RTK), 或通过触发内质网Ca²⁺的释放活化酪氨酸激酶-2激酶(Pyk2)/src酪氨酸激酶, 进而激活RAS/RAF/MAPK信号通路. (3)促进Jaks和/或STATs的酪氨酸磷酸化, 活化Jaks-STATs信号通路, 促进STAT依赖性基因转录^[19]. (4)与MEKK1, SEK1, SAPK和14-3-3蛋白形成胞质复合物, 上调SAPK/JNK通路^[20]. HBx通过激活以上各信号传导通路参与肝细胞生长、增生和转化的调节.

3.2 HBx与端粒酶 端粒酶的激活与肿瘤细胞的增生密切相关, 85%以上人类恶性肿瘤组织、细胞可以检测到端粒酶活性升高, 端粒酶的激活被认为是肿瘤发生的重要事件. 人端粒酶逆转录酶(hTERT)是端粒酶的一个亚单位, 且是调节

研发前沿
HBx在HBV相关性HCC发生中的作用及致病机制一直是研究的热点. 本文重点就HBx在HCC发病中的几种重要的作用机制包括细胞增生、凋亡及癌细胞浸润等方面可能的调控作用作一总结.

相关报道
HBx作为一种多功能蛋白, 目前研究发现其对基因转录、信号传递、细胞周期和细胞增生凋亡等均具有调节作用.

创新盘点

近年对HBx的功能及其在HBV相关性HCC发病过程中的作用的研究和认识取得了重大进展,本文综述了几种可能的致病机制,为今后HBV相关性HCC的防治提供理论依据。

端粒酶的一个限速决定因素, hTERT的表达与端粒酶的活性密切相关. 在HBV相关性HCC中HBx阳性肝癌细胞hTERT mRNA水平明显高于HBx阴性肝癌细胞. TERT基因的启动子序列上含有AP-2和Sp1结合位点, HBx有可能通过AP-2和Sp1调节TERT的转录, 激活端粒酶的表达^[21-23].

3.3 HBx与蛋白酶体 蛋白酶体是一类与多数真核细胞非溶酶体蛋白降解有关的复合物. 他不仅能降解变形的、异常的蛋白质, 而且能降解转录因子、c-Jun和c-Fos等天然蛋白质. 在细胞分化、细胞周期调控、DNA修复及凋亡等过程中具有重要的作用. 蛋白酶体功能上的改变可以导致细胞的高度增生和恶性转化, 在细胞的癌变过程中具有不可忽视的作用. HBx可通过与26S蛋白酶体的19S及20S的亚单位相互作用导致蛋白酶体功能改变, 从而逆转蛋白酶体对一些转录因子的降解, 使这些因子半衰期延长, 增强基因的转录, 参与HCC的发生发展^[24].

4 HBx对肝细胞凋亡的影响

细胞凋亡在肿瘤发生发展中具有重要作用. 研究发现, HBx对肝细胞凋亡具有调节作用, 提示HBx有可能通过对肝细胞凋亡的调节而起到致HCC的作用. HBx对凋亡既有抑制作用又有激活作用, 可能抑制凋亡利于肝细胞的无限增生, 而激活凋亡则利于HBV的复制和扩散.

4.1 HBx与信号传导通路 HBx可通过以下信号传导通路参与肝细胞凋亡的调节: (1)通过增强早期生长应答元件(Egr)与其辅助因子结合, 促进IL-18及Nur77表达, 促FasL/Fas信号通路的激活而诱导凋亡^[25-27]. 但也有报道, HBx可与P53结合而下调FasL/Fas信号通路增强凋亡抵抗. (2)经RAS/RAF/MAPK通路促NF- κ B的激活, 激活NF- κ B抑制物I κ B激酶(IKK)使I κ B失活, 并I κ B降解、或直接与I κ B结合干扰I κ B对NF- κ B的抑制作用, 而激活NF- κ B对抗由Fas及TNF- α 及TNF- β 引起的凋亡^[28-29].

4.2 HBx与线粒体 线粒体的形态和功能的改变往往是细胞凋亡的先兆信号. HBx通过抑制线粒体膜上死亡配体Bid表达而抑制细胞色素C(ctyC)从线粒体释放或者直接阻止ctyC从线粒体释放, 降低caspase-8和caspase-3的活性而抑制凋亡. 相反, HBx也可结合于线粒体电压依赖性阴离子通道3(HVDAC3)降低跨膜电压, 使ctyC从线粒体释放, 或结合于线粒体渗透性转换通道(PTP), 而不改变ctyC和凋亡相关因子的重新

分布, 诱导凋亡^[8,30]. 由上可见, HBx既可诱导细胞凋亡, 又可抑制凋亡. 产生如此截然相反效应的原因可能是: (1)使用了不同的细胞系和表达系统; (2)同一细胞系中, 细胞分化状态不同; (3)HBx发生序列变异; (4)感染时期不同, HBx的作用不同. 肝细胞在凋亡不断的激活与抑制过程中出现恶性转化. 因此, 对HBx如何通过影响细胞凋亡而致HCC的发生尚需进行进一步的深入研究.

5 HBx对细胞周期的影响

HBx对细胞周期的影响也有许多报道. 细胞周期的控制主要由cyclins-cyclin依赖性蛋白激酶(CDK)及cyclin依赖性蛋白激酶抑制剂(CDKI)形成一个级联网络控制, 各种原因引起这一网络中某一环节失调, 将导致细胞的生长失控及肿瘤的形成. HBx可通过对cyclins、CDKs和CDKI的活性及细胞周期校验点的调节而影响细胞周期进程, 参与对细胞周期的调节. 研究发现, HBx促进转化的肝细胞中cyclinD1、A和B1的活化, CDK2, 促进了G₁、S和G₂/M进程. 而对非转化的肝细胞, HBx促细胞进入G₁和S期, 接着出现S期暂停, 并诱导CDKI-p21cip1表达, 抑制CDK2的活性, 但HBx通过下调G₂/M校验点使细胞并不停滞于G₂/M期, 促进细胞周期进程^[31-32]. 可见, HBx可通过不同的方式促进不同分化状态的细胞周期进程, 促细胞分裂、增生.

6 HBx对染色体稳定性的影响

HBV相关性肝癌细胞遗传信息的不稳定可能与肝癌的发生密切相关. 研究发现, HBx可影响肝细胞染色体结构的完整性、抑制损伤DNA修复, 使HBV感染细胞出现遗传信息的不稳定, 细胞发生恶性转化.

6.1 HBx影响染色体结构的完整性 研究发现, HBx在胞质可与NF- κ B从核内运输到核外的核输出受体-Crml结合, 使Crml在胞质滞留, NF- κ B滞留于胞核, 引起过量中心体和多极纺锤体的形成, 引起细胞有丝分裂失常^[33-34]. 研究还发现, 转染X基因的HepG2细胞出现了3、18、20号染色体重组, 而未转染X基因的HepG2细胞染色体没有此变化, 同时转染X基因的HepG2细胞微核数量是未转染X基因细胞的3倍^[35]. HBx可能影响正常染色体结构的完整性参与HCC的发生.

6.2 HBx抑制损伤DNA修复及其在致HCC中的作用 在核内, HBx可与损伤DNA结合蛋白DDB

的两个亚基DDB1和DDB2结合形成HBx-DDB1-DDB2复合物干扰DDB1-DDB2复合物的形成及与损伤DNA的结合而干扰损伤DNA的修复^[36-37]. HBx也可通过与P53的结合, 干扰P53与TFII H最重要的两个亚单位XPB、XPD结合形成核苷转录外切修复复合体, 或者通过与Sp1结合, 使Sp1对XPB、XPD启动子的激活作用减弱, 抑制了XPB和XPD的内源性表达^[38-39], 通过影响核苷酸切除修复(NER)而抑制损伤DNA修复, 使环境致癌因素如黄曲霉毒素B1、UV射线和二乙基亚硝基胺(DEN)引起的DNA损伤累积, 遗传信息不稳定导致细胞发生恶性转化。

7 HBx对肿瘤细胞的浸润和转移的影响

HBx通过影响肿瘤细胞之间的分离、细胞外基质(ECM)的降解和肿瘤细胞入侵血管或淋巴管等步骤而参与调节肿瘤细胞的浸润、转移。

7.1 HBx与肿瘤细胞的相互分离 HBx表达细胞中CD44呈极性分布并诱导细胞骨架重排、伪足的伸出及 β -整合素亚单位被重新分布到细胞的伪足尖上, 增强细胞的运动能力。HBx也可通过降低E-纤连素的表达或激活Src激酶磷酸化 β -整合素使细胞间肌动蛋白骨架和钙黏蛋白复合物间的连接断裂, 促进肿瘤细胞的分离、扩散^[40-43]。

7.2 HBx与ECM的降解 多种肿瘤组织中均可检测到环氧化酶-2(COX-2)的表达, COX-2与肿瘤的发生与发展密切相关。HBx促COX-2的表达, 进而促其靶基因MMP1的表达, 并激活MMP-2; HBx还可经MAPK等信号传导通路提高细胞中MMP-9和MMP-3的水平。MMPs通过降解ECM及血管基底膜, 促进肿瘤细胞的浸润转移^[44-47]。

7.3 HBx与新生血管形成 研究显示, 转染X基因的肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)的表达较未转染者明显增高, 肿瘤组织的生长速度增快^[48-49]。VEGF是新生血管形成的中心调控因子, 为缺氧诱导因子1(HIF-1)的重要靶基因。HBx激活HIF-1的转录表达, 并增加HIF-1的稳定性而减少其降解, 增强HIF-1对VEGF的激活作用^[50-51], 促新生血管形成, 不仅使肿瘤细胞获得充足的养分, 也是转移的基础。

8 结论

HBx在HCC发生发展中的作用机制是多方面的, 他可通过基因转录调控和多种信号途径影响细胞增生和凋亡、抑制损伤DNA的修复、影响细胞周期进程并促肿瘤细胞浸润和转移等。虽然

HBx许多功能的作用机制尚不明确, 甚至还存在一些相反的研究报道, 但其生物学功能在HBV相关性HCC发生发展中具有重要作用是毋庸置疑的, 其确切作用机制尚需进一步深入研究。

9 参考文献

- 1 Arbutnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 77-100
- 2 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999; 42: 81-99
- 3 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001; 36: 651-660
- 4 Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
- 5 Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66
- 6 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882
- 7 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
- 8 Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 15460-15471
- 9 Nomura T, Lin Y, Dorjsuren D, Ohno S, Yamashita T, Murakami S. Human hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells, and is active for transactivation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 330-340
- 10 Wang ZW, Peng ZH, Li K, Qiu GQ, Zhang Y, Gu W. Effect of p16 gene on carcinogenesis of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 356-8
- 11 Liu XH, Lin J, Cao XZ, Zheng JM, Chen Y, Zhu MH. Biological impact of the COOH-terminal 40 amino acid deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 825-830
- 12 Liu XH, Zhu MH, Cao XZ, Zheng JM, Chen Y. Biological effects of COOH-terminal amino acid deletions of hepatitis B virus X protein on hepatocellular carcinoma cell line Huh7. *Ai Zheng* 2005; 24: 1213-1219
- 13 Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Bréchet P, Bréchet C, KKremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810
- 14 Lin J, Zhu MH, Qu JH, Ni CR, Li FM. Hepatitis B virus and deletion of its COOH-terminal forty amino acids: proliferative impact on hepatoma cell line SMMC-7721. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2005; 34: 592-595
- 15 Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-

应用要点
本文通过阐述HBx的可能调控作用, 为HBV感染及HCC预防、分子治疗研究等提供理论依据以及可能靶点。

名词解释

MMPs: 基质金属蛋白酶, 几乎能降解细胞外基质(ECM)中的各种蛋白成分, 破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障, 在肿瘤侵袭转移中起关键性作用, 被认为是该过程中主要的蛋白水解酶。

- type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002; 76: 5875-5881
- 16 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864.
- 17 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein activates a survival signaling by linking SRC to phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2003; 278: 31807-31813
- 18 Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001; 276: 16969-16977
- 19 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 25510-25515
- 20 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 8328-8340
- 21 Zhang X, Dong N, Zhang H, You J, Wang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 98-104
- 22 Qu ZL, Zou SQ, Cui NQ, Wu XZ, Qin MF, Kong D, Zhou ZL. Upregulation of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression by in vitro transfection of hepatitis B virus X gene into human hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5627-5632
- 23 Qu ZL, Zou SQ, Wang X. The effect of hepatitis B virus X gene transfection on expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in human bile duct carcinoma cell lines. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2004; 42: 1254-1257
- 24 Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000; 275: 15157-15165
- 25 Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 36242-36249
- 26 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1162-1168
- 27 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001; 82: 171-182
- 28 Um HR, Lim WC, Chae SY, Park S, Park JH, Cho H. Raf-1 and protein kinase B regulate cell survival through the activation of NF-kappaB in hepatitis B virus X-expressing cells. *Virus Res* 2007; 125: 1-8
- 29 Wei W, Huang W, Pan Y, Zhu F, Wu J. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras. *Cancer Lett* 2006; 244: 119-128
- 30 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003; 278: 22071-22078
- 31 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002; 277: 8730-8740
- 32 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 3384-3394
- 33 Forgues M, Marrogi AJ, Spillare EA, Wu CG, Yang Q, Yoshida M, Wang XW. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 22797-22803
- 34 Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP, Ried T, Nagashima K, Feden J, Valerie K, Fukasawa K, Wang XW. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5282-5292
- 35 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutat Res* 2002; 505: 63-74
- 36 Bergametti F, Sitterlin D, Transy C. Turnover of hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex. *J Virol* 2002; 76: 6495-6501
- 37 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- 38 Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIH transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus X protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001; 276: 14124-14132
- 39 Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999; 80: 875-879
- 40 Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoya MC, Zamora D, Yáñez-Mó M, Carretero M, Furthmayr H, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis. *Hepatology* 2001; 33: 1270-1281
- 41 Liu J, Lian Z, Han S, Waye MM, Wang H, Wu MC, Wu K, Ding J, Arbutnot P, Kew M, Fan D, Feitelson MA. Downregulation of E-cadherin by hepatitis B virus X antigen in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 1008-1017
- 42 Lee JO, Kwun HJ, Jung JK, Choi KH, Min DS, Jang KL. Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene* 2005; 24: 6617-6625
- 43 Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* 2001; 20: 3323-3331
- 44 Lara-Pezzi E, Gómez-Gavero MV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, Martínez-A C, Arroyo

- AG, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002; 110: 1831-1838
- 45 Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007; 120: 1208-1214
- 46 Yu FL, Liu HJ, Lee JW, Liao MH, Shih WL. Hepatitis B virus X protein promotes cell migration by inducing matrix metalloproteinase-3. *J Hepatol* 2005; 42: 520-527
- 47 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
- 48 Li DH, Chen XP, Zhang WG, Qiu FZ. HBx can facilitate the expression of vascular endothelial growth factor in human hepatoma tissue of nude mice. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 440
- 49 Wang HP, Chen XP, Ding L, He SQ, Ali M, Li DH, Zhang WG. Hepatitis B x protein activated vascular endothelial growth factor expression through hypoxia inducible factor-1 pathway. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 433-436
- 50 Yoo YG, Cho S, Park S, Lee MO. The carboxy-terminus of the hepatitis B virus X protein is necessary and sufficient for the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett* 2004; 577: 121-126
- 51 Yoo YG, Oh SH, Park ES, Cho H, Lee N, Park H, Kim DK, Yu DY, Seong JK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 39076-39084

同行评价
本文阐述全面, 行文流畅, 内容充实, 具有一定的理论价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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)

胰腺癌的生物治疗研究进展

王国江, 高泽立

背景资料
胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一, 预后很差, 传统的治疗方法对其疗效及预后无明显改善, 而应用生物学手段治疗则有可能成为改善胰腺癌疗效和预后的一条有效途径。

王国江, 上海交通大学医学院附属第三人民医院消化科 上海市 201900
高泽立, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科 上海市 201900
通讯作者: 高泽立, 201900, 上海市漠河路280号, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科. gzeli@vip.sina.com
电话: 021-56691101-6711
收稿日期: 2007-09-20 修回日期: 2007-12-23

Advances in biological therapy for pancreatic cancer

Guo-Jiang Wang, Ze-Li Gao

Guo-Jiang Wang, Department of Gastroenterology, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China
Ze-Li Gao, Department of Infectious Diseases, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China
Correspondence to: Ze-Li Gao, Department of Infectious Diseases, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China. gzeli@vip.sina.com
Received: 2007-09-20 Revised: 2007-12-23

Abstract

The pathogenesis of pancreatic cancer is concealed, its progress is rapid, its prognosis is poor, and the mortality rate is high. Surgery is the main form of treatment, but an early diagnosis is extremely difficult, and a majority of patients have lost the chance of surgical treatment when they receive a definite diagnosis. The clinical efficacy of chemotherapy and radiotherapy is not exact and most of these treatments have many adverse effects. With the development of biotechnology, biological therapy for pancreatic cancer, e.g., immunotherapy and gene therapy, is becoming increasingly popular. Careful application of biological therapy can improve prognosis of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Biological therapy; Immunotherapy; Gene therapy

Wang GJ, Gao ZL. Advances in biological therapy for pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 56-61

摘要

胰腺癌发病隐匿, 进展迅速, 死亡率高, 预后差。手术虽是主要治疗手段, 但因早期诊断困难, 大部分患者确诊时已无手术机会。放疗、化疗疗效不确切, 且有较多副作用。随着生物技术的发展, 针对胰腺癌所进行的基因治疗、免疫治疗等生物治疗研究日趋增多, 使得对该病的治疗手段更加多样化。合理运用生物治疗将会改善胰腺癌的预后。

关键词: 胰腺癌; 生物疗法; 免疫疗法; 基因疗法

王国江, 高泽立. 胰腺癌的生物治疗研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 56-61
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/56.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是恶性程度很高的肿瘤, 因其独特的解剖位置, 症状隐匿, 早期诊断困难, 其根治性切除术后较高的复发与转移率以及对传统化疗、放疗不敏感已成为制约胰腺癌有效治疗的主要障碍^[1-2]。据统计, 肿瘤患者只有约15%病例可进行手术治疗, 5年生存率不足3%, 超过90%患者在确诊后1年内死亡, 平均存活期少于6 mo^[3]。为此, 基础研究和临床工作者不断探索治疗胰腺癌的有效途径, 在生物治疗方面取得了一些进展, 现综述如下。

1 基因治疗

基因治疗是随着DNA重组技术的成熟而发展起来的, 他通过将正常基因或有治疗作用的基因导入靶细胞(瘤细胞、机体免疫细胞或能达到治疗作用的细胞)来纠正突变或缺陷的基因, 最终消灭肿瘤。目前用以治疗胰腺癌最常用的基因治疗是将靶向基因载体直接注射或导入体内的肿瘤组织, 进行局部性基因治疗。近年更有采用联合基因治疗, 以增强疗效, 由于能针对肿瘤内特有的基因变异情况进行修复或促使肿瘤细胞死亡, 基因治疗具有广阔的应用前景^[4-6]。胰腺癌基因治疗常见的载体有: 腺病毒载体、脂质

体、逆转录病毒载体、单纯疱疹病毒载体、裸DNA等。基因治疗主要策略包括补充抑癌基因, 失活癌基因, 抗血管生成基因治疗, 病毒增生溶瘤治疗, 基因介导的药物前体激活疗法, 免疫基因治疗和反义基因治疗^[7-8]。

胰腺癌中被激活的癌基因包括*K-ras*、*HER-2/neu*、*c-myc*、*c-fos*等。*K-ras*点突变发生于约90%的胰腺癌, 而胰腺其他疾病不具有这种标志性改变, 基因突变的检测, 可能成为早期诊断胰腺癌的可靠分子生物学手段^[9-10]。*K-ras*编码具有GTP酶活性的P-21ras蛋白, 可促使细胞增殖。胰腺癌发生的关键在于一系列抑癌基因的突变失活, 与胰腺癌的发生有关的基因超过10种, 其中*P53*、*SMAD4/DPC4*和*p14ARF*的突变分别可见于约40%-70%、90%和85%的胰腺癌^[11-13]。现已证实, 腺病毒载体PRI/INGN201和Ci-104用于胰腺癌进行基因治疗有效^[14]。Miura *et al*^[15]以腺病毒为载体, 用*K-ras*反义基因转染入胰腺癌细胞, 体外培养观察到显著的细胞凋亡, 能抑制胰腺癌细胞株的生长。有研究将含CEA启动子的重组腺病毒为载体, *HSK-tv*基因导入分泌CEA的胰腺癌细胞, 获得满意效果^[16]。Aubert *et al*^[17]用鼠 α -1, 3半乳糖转移酶基因转导金黄色鼠胰腺癌细胞HaP-T1, 使其表达 α -半乳糖表位, 结果荷瘤鼠生存期延长。陈笑雷 *et al*^[18]将*p14ARF*导入*P53*缺失的胰腺癌PC-3细胞, *P53*表达增加, 细胞周期阻滞, 凋亡指数增加。然而胰腺癌并非单基因遗传, 而是涉及到多基因、多步骤的复杂过程^[19]。所以针对单个基因的治疗效果有限, 通过基因芯片和组织芯片分析胰腺癌基因组的不平衡性, 明确与发病最密切相关的原癌基因和抑癌基因, 是胰腺癌基因治疗的首要任务。

2 免疫治疗和肿瘤疫苗

过去针对胰腺癌免疫治疗不满意的主要原因: (1)肿瘤因免疫源性弱和共刺激分子的缺乏使肿瘤逃脱免疫系统的监视。(2)肿瘤环境中的一些因子使免疫细胞在发挥作用前死亡。(3)肿瘤的发生、发展是多因素、多阶段、多基因突变的结果。(4)肿瘤宿主可增强抑制性T细胞的非特异性免疫抑制。目前肿瘤免疫治疗的方法主要有: (1)非特异性免疫治疗, 如卡介苗及一些细胞因子如IL-2等。(2)被动免疫治疗, 是指给机体输注外源的免疫效应物质。(3)主动免疫治疗, 是指给机体输入具有抗原性的疫苗, 刺激机体免疫系

统产生抗肿瘤免疫以治疗肿瘤的方法^[20]。

目前胰腺癌的疫苗从抗原角度分为细胞疫苗、蛋白质/多肽疫苗和DNA疫苗三个层次。细胞疫苗包括放射、细胞裂解物、基因修饰的肿瘤细胞; 肽免疫包括基于B细胞表位、T细胞表位、糖蛋白/多糖表位的肽疫苗; DNA疫苗可分为编码全抗原和基于表位的DNA疫苗。其核心是诱导机体产生特异性主动免疫。大量的细胞因子参与了胰腺癌的免疫应答, 如TNF- α 、IL-18、IL-2、IL-12和GM-CSF等。胰腺癌患者血清中IL-10, TGF- β , VEGF, PSCA和KU-CT-1呈高表达^[21-23]。细胞疫苗包括树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗和肿瘤细胞疫苗, 近年来抗原或者基因修饰的DC疫苗成为研究的热点。DC是人体内抗原递呈能力最强的细胞, 可高水平的表达共刺激分子、黏附分子和细胞因子等。同时, 他通过提供双信号刺激、细胞辅助作用、细胞因子等直接或间接地启动特异性细胞免疫及辅助B细胞产生特异性抗体, 介导细胞免疫和体液免疫, 在细胞免疫应答、体液免疫应答中发挥重要作用。DC在抗胰腺癌中的主要作用有: (1)DC具有很强的抗原递呈能力, 参与调节特异性和非特异性细胞免疫。(2)高水平表达共刺激分子和黏附分子而促进DC与T细胞的结合。(3)通过自身分泌或者诱导其他细胞分泌细胞因子介导体液免疫和细胞免疫。陈鑫 *et al*^[24]通过实验证实胰腺癌细胞冻溶物致敏的DC疫苗可以诱导T细胞产生高效的针对自体癌细胞的细胞毒效应。Stift *et al*^[25]运用肿瘤裂解物激活的DC疫苗对20例实体瘤患者进行I期临床试验, DC和肿瘤裂解物来自患者自体, 经过TNF- α 、IL-4、GM-CSF刺激形成成熟的疫苗, 注射于患者腹股沟淋巴结, 结果患者无自体免疫状态, 其中18例出现迟发性超敏反应(Delayed-type hypersensitivity, DTH), 8例观察到有肿瘤标志物的改变。此实验提示自体来源的DC疫苗可安全有效的引发细胞免疫。Kalady *et al*^[26]研究发现胰腺癌细胞全部mRNA转染的DC疫苗能诱发人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)限制的针对多种抗体的T细胞克隆。Morse *et al*^[27]报道给胰腺癌患者接种编码癌胚抗原的mRNA修饰的DC疫苗, 可以在患者体内产生足够数量的DC。Miyazaki *et al*^[28]用胰腺癌细胞溶胞产物激活的DC疫苗联合抗血管生成药TNP-470治疗小鼠胰腺癌, 结果显示该疫苗能有效诱导CD4+和CD8+淋巴细胞在肿瘤组织的浸润, 与TNP-470联用组

研发前沿
胰腺癌的生物治疗成为除手术、放疗和化疗等传统疗法以外的第四种重要的治疗手段。随着生物科学技术的发展以及对胰腺癌发生发展机制了解的深入, 目前对胰腺癌生物治疗的研究和临床应用取得了很大进步。胰腺癌的生物治疗已成为胰腺癌治疗的研究热点。

相关报道
目前针对胰腺癌的生物治疗报道较多, 主要从免疫治疗、基因治疗、抗体导向治疗和抗血管形成治疗等方面进行探索。但运用单一生物治疗技术治疗胰腺癌策略已经较少, 大部分研究综合了多种机制或技术方法。

创新盘点
本文就近年来胰腺癌的生物治疗研究进展进行综述, 从不同生物治疗角度来综述生物治疗的新技术、新方法。

小鼠生存时间明显延长. 针对胰腺癌蛋白多肽疫苗亦有较多研究, 以突变的ras肽、黏蛋白核心肽(MUC)、癌胚抗原(CEA)、胃泌素、Her2/neu蛋白、端粒酶及p53突变产物等作为免疫原. Gjertsen *et al*^[29]用突变的ras肽疫苗和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)作为佐剂对晚期胰腺癌患者进行皮下注射, 在43例可评价患者中有25例可成功诱导ras特异性免疫应答, 产生应答的患者与无应答的患者中位生存期分别为148 d和61 d, 且无严重不良反应发生. Takhar *et al*^[30]用G17DT肌注治疗41例晚期胰腺癌患者, 结果显示自第1次注射G17DT后的中位生存期为204 d, 25%患者生存期大于305 d. Berzofsky *et al*^[31]认为将DNA疫苗以编码肿瘤抗原或相关分子的DNA质粒直接肌注, 在胞内合成抗原, 诱导长期、有效的细胞免疫, 可能是新一代疫苗的发展方向.

3 抗体导向治疗

抗体导向治疗是指利用单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)及其偶联物与肿瘤的特异性结合而发挥导向性治疗作用. 单抗抗肿瘤作用机制只要为抗体直接作用, 细胞毒效应; 或与肿瘤细胞表面对肿瘤生长增殖有关的各种受体或抗体等结合, 使肿瘤不能分裂或生存的调节疗法. 单克隆抗体治疗主要有单纯抗体治疗和偶联抗体治疗两方面. 单纯抗体治疗是依赖细胞介导的细胞毒作用和补体依赖的细胞毒作用; 偶联抗体通过生物工程技术将单克隆抗体与毒素、放射性核素、药物等偶联, 将杀伤因子特异地导向肿瘤细胞. Kindler *et al*^[32]报道给52例转移性胰腺癌患者联合输注重组人源性EGFR单抗bevacizumab和吉西他滨(gemcitabine), 结果中位生存期为8.8 mo, 半年生存率为77%. Gardner-Thorpe *et al*^[33]报道用人自身免疫抗核抗体P和多个胰腺癌细胞系进行共同培养, 并进行裸鼠实验, 结果发现抗核抗体P可以显著抑制癌细胞增殖, 促进凋亡, 减小肿瘤体积. Nishihara *et al*^[34]利用¹³¹I标记的抗CEA单抗(mN2, 鼠IgG1)对胰腺癌模型进行体内特异性放射治疗, 取得了一定效果. 目前有关单克隆抗体HER2/neu、LMB9、C017-1A、BW494/32和抗EGFR在胰腺癌中的应用已进入临床研究阶段. 随着基因工程技术的发展, 逐渐出现了针对更多新靶点的单克隆抗体, 如单链抗体、多价抗体等. Thomas *et al*^[35]报道间皮素(mesothelin)

是高表达于胰腺癌细胞表面的肿瘤相关抗原, 其中间皮素-1相关性最好.

4 抗血管形成治疗

血管形成是指在原有血管的基础上通过内皮细胞增殖、基底膜与细胞外基质释放、内皮细胞迁移, 以出芽的方式形成新的毛细血管. 肿瘤血管形成是个复杂的过程, 研究表明, 肿瘤内的血管增生活性远高于正常组织内的血管增生活性, 而肿瘤的生长依赖于肿瘤内血管为其提供必须的营养, 因此可通过抑制肿瘤血管生成达到治疗肿瘤的目的. 以新生血管为靶点治疗肿瘤生成一抗血管生成治疗为人们提供了一个全新的视野, 关于肿瘤血管生成的研究目前已经进入临床应用阶段, 如用机体肿瘤内的血管密度作为评价治疗、预后的指标, 以及应用抗血管新生药物开发治疗策略等. 抗肿瘤血管形成治疗策略是针对肿瘤血管形成的某些因子及其作用的关键环节进行干预, 主要是从基因水平控制细胞表达及释放血管生成因子, 或促使抗血管生成因子表达, 或诱导血管内皮细胞凋亡. 由于胰腺癌的高度侵袭性和转移性与诸多蛋白酶和血管生成因子的上调相关, 如VEGF、uPA、tPA、TNF、TGF、MMPs、PDGF及其受体等, 因此, 针对这些信号元件作为靶点, 可以进行胰腺癌的抗血管形成治疗. Khorana *et al*^[36]对手术后胰腺癌患者的多中心回顾性分析显示: 56%的患者VEGF表达阳性, 54%的患者DPC4(一种血管生成抑制因子)表达缺失. 血管生成抑制剂血管抑制素(angiotatin)对胰腺癌基因治疗的研究也证实其具有显著抑制内皮细胞生长、降低肿瘤血管内密度、抑制肿瘤生长的作用^[37]. 将血管生成抑制剂(如angiotatin, bevacizumab^[38-39], endostatin和PEDF^[40]等)注射到体内, 阻抑肿瘤血管形成, 使胰腺癌细胞因供养不足而凋亡^[41]. 朱少俊*et al*^[42]研究显示: 血管形成抑制剂3TSR能抑制肿瘤新生血管生成, 具有显著减小肿瘤体积、肿瘤血管和增加肿瘤细胞坏死的作用. Nakahara *et al*^[43]对接种有胰岛细胞癌的裸鼠研究显示, 抗VEGF治疗使肿瘤血管减少86%. Kuo *et al*^[44]构建了表达血管内皮生长因子受体Flk1、Fit1的病毒载体, 通过离体和在体转染胰腺癌细胞, 结果表明胰腺癌生长受到抑制, 而转染血管抑素及内抑素进行基因治疗的效果却不明显. Xie *et al*^[41]研究证实在胰腺癌治疗中, 针对单一核转录因子对抑制肿瘤血管和肿瘤细胞的生长

应用要点
胰腺癌的生物治疗在临床应用已经取得很大进展, 应用生物学手段治疗则有可能成为改善胰腺癌疗效和预后的一条有效途径.

比单一效应因子(VEGF)更有效. Kumar *et al*^[45]研究显示, 生长抑素受体亚型2基因治疗, 同时下调胰腺癌细胞株的VEGF、MMP2的mRNA和蛋白表达. Jain^[46]提出了抗血管生成治疗的新概念—使肿瘤血管“正常化”, 而不是最大限度抑制血管. “正常化”的血管可增加周细胞和基底膜, 降低渗透性, 降低间质高压, 增加药物在肿瘤内的分布可提高化疗疗效, 增加的氧气可提高放疗和化疗对肿瘤细胞的杀伤作用, 避免肿瘤细胞进入循环系统, 形成转移灶.

另外选择性抑制COXs通路也有抗胰腺癌血管形成的作用. Okami *et al*^[47]用COX-2抑制剂JTE-522处理COX-2阳性表达的胰腺癌细胞株PSN-1和KMP-4, 发现细胞的运动性、黏附性和侵袭性均明显减弱. Chu *et al*^[48]发现将COX-2阳性表达的胰腺癌细胞BxPC-3与内皮细胞共同培养可显著增加血管内皮细胞的迁徙能力, 而经过COX-2抑制剂NS-398处理过的BxPC-3细胞诱导内皮细胞形毛细血管的能力明显减弱. 抗血管生成治疗具有特异性、靶向性, 以及生理毒性小等优点. 随着对肿瘤血管生成基因调控研究的深入, 抗肿瘤血管生成将成为一种全新的抗肿瘤策略.

随着胰腺癌生物治疗的不断深入, 许多问题也暴露出来. 主要体现在以下几个方面: (1) 大多研究为单基因、单免疫调节剂治疗, 多基因、多因素的治疗研究目前较少. (2) 基因转导的效率仍不高, 特异靶向性不强, 设计出高效、稳定、特异、安全的新载体是基因治疗中尚待解决的问题. (3) 有关生物治疗在体内外模型中已经取得较好的效果, 但目前的应用仍比较局限, 应用于临床的只是较少部分细胞因子和某些非特异性免疫调节剂等, 其余大部分治疗的有效性仍在探索中.

不可否认, 胰腺癌的治疗至今仍然十分棘手, 由于胰腺癌可能起源于多种细胞, 其发生是由多基因参与的多步骤过程, 因此其治疗也必须是多靶点、多手段的综合治疗. 传统临床治疗手段已接近疗效的瓶颈, 突破较困难. 而各种芯片技术和蛋白质组学技术的发展为我们提供了大量有关胰腺癌的生物分子生物学信息. 如何选择真正有价值的靶点, 并针对这些靶点设计治疗方案, 开发、筛选能评价生物治疗疗效的标志物, 用以确定能从生物治疗中获益的患者群, 并将分子靶向治疗与传统治疗方法相结合, 根据不同患者胰腺癌细胞化疗敏感性以及细胞内

关键靶点分子的表达水平差异, 制定出完全个体化的综合治疗方案, 将是未来治疗的关键所在. 相信分子靶向治疗与抗血管形成治疗、基因治疗和免疫治疗相互融合、渗透, 可进一步提高胰腺癌的疗效. 虽然目前大部分研究仍处于实验或初期临床实验阶段, 但随着分子生物学的进一步发展, 胰腺癌的生物治疗必然会出现实质性的突破和广阔的应用前景.

5 参考文献

- 1 Ko AH, Dito E, Schillinger B, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA. Phase II study of fixed dose rate gemcitabine with cisplatin for metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 379-385
- 2 Abrams RA, Yeo CJ. Combined modality adjuvant therapy for resected periampullary pancreatic and nonpancreatic adenocarcinoma: a review of studies and experience at The Johns Hopkins Hospital, 1991-2003. *Surg Oncol Clin N Am* 2004; 13: 621-638, ix
- 3 Laheru D, Biedrzycki B, Thomas AM, Jaffee EM. Development of a cytokine-modified allogeneic whole cell pancreatic cancer vaccine. *Methods Mol Med* 2005; 103: 299-327
- 4 MacKenzie MJ. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2004; 5: 541-549
- 5 Kindler HL. Front-line therapy of advanced pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: S33-S36
- 6 Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 285-298
- 7 Ramirez PJ, Vickers SM. Current status of gene therapy for pancreatic cancer. *Curr Surg* 2004; 61: 84-92
- 8 Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 400-403
- 9 He Y, Yang B, Ruan CG. Anti-pancreatic cancer immune response induced by K-ras mutated peptide. *Ai Zheng* 2005; 24: 559-562
- 10 Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6765-6769
- 11 Yoshida T, Ohnami S, Aoki K. Development of gene therapy to target pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 283-289
- 12 Hatanaka K, Suzuki K, Miura Y, Yoshida K, Ohnami S, Kitade Y, Yoshida T, Aoki K. Interferon-alpha and antisense K-ras RNA combination gene therapy against pancreatic cancer. *J Gene Med* 2004; 6: 1139-1148
- 13 Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1147-1153
- 14 Tango Y, Fujiwara T, Itoshima T, Takata Y, Katsuda K, Uno F, Ohtani S, Tani T, Roth JA, Tanaka N. Adenovirus-mediated p14ARF gene transfer

名词解释

- 1 基因治疗: 基因治疗是随着DNA重组技术的成熟而发展起来的, 他通过将正常基因或有治疗作用的基因导入靶细胞来纠正突变或缺陷的基因, 最终消灭肿瘤.
- 2 生物治疗: 肿瘤的生物治疗是指应用生物反应调节剂来改变宿主的自身防御反应机制从而抑制或消除肿瘤的方法.

同行评价
本文内容全面,层次清楚,行文流畅,语句通顺,有一定的参考价值。

- cooperates with Ad5CMV-p53 to induce apoptosis in human cancer cells. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1373-1382
- 15 Miura Y, Ohnami S, Yoshida K, Ohashi M, Nakano M, Ohnami S, Fukuhara M, Yanagi K, Matsushita A, Uchida E, Asaka M, Yoshida T, Aoki K. Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. *Cancer Lett* 2005; 218: 53-62
- 16 Pan X, Li ZS, Xu GM, Cui L, Tu ZX. Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26: 274-278
- 17 Aubert M, Crotte C, Benkoel L, Panicot-Dubois L, Bernard JP, Lombardo D, Sadoulet MO, Mas E. Relationship between alphaGal epitope expression and decrease of tumorigenicity in pancreatic adenocarcinoma model. *Mol Carcinog* 2005; 42: 202-212
- 18 陈笑雷, 张群华, 倪泉兴. p14^{ARF}与p53抑癌基因对胰腺癌生物学行为的影响. *中华医学杂志* 2003; 83: 868-871
- 19 Choudhuri G, Singh D. Molecular mechanisms of pancreatic cancer. *Trop Gastroenterol* 2005; 26: 111-114
- 20 Laheru D, Biedrzycki B, Thomas AM, Jaffee EM. Development of a cytokine-modified allogeneic whole cell pancreatic cancer vaccine. *Methods Mol Med* 2005; 103: 299-327
- 21 Wentz MN, Jain A, Kono E, Berberat PO, Giese T, Reber HA, Friess H, BÃ¼chler MW, Reiter RE, Hines OJ. Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer. *Pancreas* 2005; 31: 119-25
- 22 Okada T, Akada M, Fujita T, Iwata T, Goto Y, Kido K, Okada T, Matsuzaki Y, Kobayashi K, Matsuno S, Sunamura M, Kawakami Y. A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 191-197
- 23 Mancuso A, Calabrò F, Sternberg CN. Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 58: 231-41
- 24 陈鑫, 杨帆, 杨兴无, 张帆. 树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2815-2818
- 25 Stift A, Friedl J, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Schueller G, Zontsich T, Benkoe T, Radelbauer K, Brostjan C, Jakesz R, Gnant M. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 135-142
- 26 Kalady MF, Onaitis MW, Emani S, Abdul-Wahab Z, Pruitt SK, Tyler DS. Dendritic cells pulsed with pancreatic cancer total tumor RNA generate specific antipancreatic cancer T cells. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 175-81; discussion 181-182
- 27 Morse MA, Nair SK, Boczkowski D, Tyler D, Hurwitz HI, Proia A, Clay TM, Schlom J, Gilboa E, Lyerly HK. The feasibility and safety of immunotherapy with dendritic cells loaded with CEA mRNA following neoadjuvant chemoradiotherapy and resection of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 32: 1-6
- 28 Miyazaki J, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Miura S. Combination therapy with tumor-lysate pulsed dendritic cells and antiangiogenic drug TNP-470 for mouse pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2005; 117: 499-505
- 29 Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhaug I, Søreide O, Eriksen JA, Moller M, Baksaa I, Lothe RA, Saeterdal I, Gaudernack G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92: 441-450
- 30 Takhar AS, Gilliam AD, Watson SA, Henwood M, Rowlands BJ, Broome P, Beckingham IJ. The effect of jaundice on the generation of anti-gastrin antibodies in G17DT immunized patients with advanced pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 197-200
- 31 Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 2004; 113: 1515-1525
- 32 Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8033-8040
- 33 Gardner-Thorpe J, Ito H, Ashley SW, Whang EE. Autoantibody-mediated inhibition of pancreatic cancer cell growth in an athymic (nude) mouse model. *Pancreas* 2003; 27: 180-189
- 34 Bergholdt R, Heding P, Nielsen K, Nolsøe R, Sparre T, Størling J, Nerup J, Pociot F, Mandrup-Poulsen T. Type 1 diabetes mellitus: an inflammatory disease of the islet. *Adv Exp Med Biol* 2004; 552: 129-153
- 35 Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 2004; 200: 297-306
- 36 Khorana AA, Hu YC, Ryan CK, Komorowski RA, Hostetter G, Ahrendt SA. Vascular endothelial growth factor and DPC4 predict adjuvant therapy outcomes in resected pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 903-911
- 37 Nie SL, Yuan SZ. Experimental study of gene therapy with angiostatin gene in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 452-457
- 38 Salmon JS, Lockhart AC, Berlin J. Anti-angiogenic treatment of gastrointestinal malignancies. *Cancer Invest* 2005; 23: 712-726
- 39 Crane CH, Ellis LM, Abbruzzese JL, Amos C, Xiong HQ, Ho L, Evans DB, Tamm EP, Ng C, Pisters PW, Charnsangavej C, Delclos ME, O'Reilly M, Lee JE, Wolff RA. Phase I trial evaluating the safety of bevacizumab with concurrent radiotherapy and capecitabine in locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1145-1151
- 40 Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y, Takahashi R, Mega S, Li L, Shichinohe T, Kawarada Y, Kondo S. Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8737-8744
- 41 Xie K, Wei D, Huang S. Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer.

- Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 147-156
- 42 朱少俊, 金洲祥, 张雪峰, 章小平, 董磊, 徐鲁白. 血管形成抑制剂3TSR对胰腺癌的治疗作用. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 1231-1233
- 43 Nakahara T, Norberg SM, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM. Effect of inhibition of vascular endothelial growth factor signaling on distribution of extravasated antibodies in tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 1434-1445
- 44 Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4605-4610
- 45 Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 393-399
- 46 Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58-62
- 47 Okami J, Nakamori S, Hiraoka N, Tsujie M, Hayashi N, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Suppression of pancreatic cancer cell invasion by a cyclooxygenase-2-specific inhibitor. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 577-584
- 48 Chu J, Lloyd FL, Trifan OC, Knapp B, Rizzo MT. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1-7

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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 2008-01-08).

结直肠癌血管形成、侵袭和转移的研究进展

施凉潘, 潘运龙

背景资料
结直肠癌从血管形成到侵袭转移, 其生物学行为在不断的改变着, 各种因子共同调节着肿瘤的生成与发展. 了解结直肠癌不同时期的分子生物学的改变可进一步了解结直肠癌的发生和发展, 并可通过抑制肿瘤分子生物学的改变达到治疗肿瘤的目的.

施凉潘, 潘运龙, 暨南大学附属第一医院外一科 广东省广州市 510630
国家自然科学基金资助项目, No. 30772131
通讯作者: 施凉潘, 510630, 广东省广州市, 暨南大学附属第一医院外一科. tian1159@126.com
电话: 020-85227303
收稿日期: 2007-09-16 修回日期: 2007-12-17

Advanced insights into angiogenesis, invasion and metastasis in colorectal carcinoma

Liang-Pan Shi, Yun-Long Pan

Liang-Pan Shi, Yun-Long Pan, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772131
Correspondence to: Liang-Pan Shi, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. tian1159@126.com
Received: 2007-09-16 Revised: 2007-12-17

Abstract

Colorectal carcinoma is a frequent malignant tumor. the occurrence, pathogenesis and progression of the tumor is constantly changing. The changes in oncological molecular biology have been confirmed as a new neo-index to distinguish metastasis and to predict prognosis. Tumor neovascularization is an important element in tumor development and affects its biological behavior, in terms of invasion and metastasis. Metastatic cells can induce neovascularization feedback. So repeatedly, forming a progressive chain reaction. This review focuses on the characterized molecules that are implicated in colorectal carcinoma angiogenesis, invasion and metastasis, and attempts to highlight their clinical correlates.

Key Words: Colorectal carcinoma; Angiogenesis; Invasion; Metastasis

Shi LP, Pan YL. Advanced insights into angiogenesis, invasion and metastasis in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 62-67

摘要

结直肠癌是一种常见恶性肿瘤, 在结直肠癌发生、发展过程中, 其机制在不断地改变. 肿瘤分子生物学的改变在许多临床肿瘤中已被证实是一个判断转移, 预测预后的新指标. 血管形成作为肿瘤生长中的一个重要因素, 参与并影响着肿瘤的特征性生物学行为, 即侵袭和转移. 而侵袭和转移的细胞又可诱发新一轮的血管形成, 如此反复, 形成一条递增链式反应. 本文主要描述与结肠癌的血管形成, 侵袭和转移相关的特征性分子, 并集中说明其与临床的相关性.

关键词: 结直肠癌; 血管形成; 侵袭; 转移

施凉潘, 潘运龙. 结直肠癌血管形成、侵袭和转移的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 62-67
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/62.asp>

0 引言

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的身心健康. 结直肠癌在不同的发展过程中, 其分子生物学也不同. 了解结直肠癌不同时期的分子生物学的改变可进一步了解结直肠癌的发生和发展, 并可通过抑制肿瘤分子生物学的改变达到治疗肿瘤的目的. 本文主要综述与结直肠癌的血管形成、侵袭和转移的相关特征性分子来说明其与疾病进展和术后生存率的相关性.

1 血管形成

Folkman^[1]在1971年首次提出肿瘤的血管形成是肿瘤发展的机制之一的观点现已得到证实. 肿瘤的血管形成受一系列正向和负向的相互调节. 形成一个肿瘤前血管原的环境, 必然有血管原因子增加和抗血管原因子的减少, 这种环境的改变导致肿瘤新生血管的生成. 一些潜在的血管原因子已得到证实, 包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生的内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)、血管

生成素(angiotensin)、凝血酶敏感素(thrombospondins, TSP)和Erythropoietin-producing hepa-tocellular(Eph)^[2].

1.1 VEGF 是第一个被发现具有刺激肿瘤血管形成的蛋白. 1983年Senger *et al*^[3]从豚鼠的肝癌中提炼出一种34-42 kDa的蛋白分子, 并发现其具有诱导微血管的通透性(后被命名为血管通透性因子). 1989年Ferrara *et al*^[4]在内皮细胞中发现一种能刺激有丝分裂的特征性蛋白, 并将这种蛋白命名为VEGF蛋白. 以后, 进一步对这些蛋白克隆和表达的研究, 揭露了他们同属一种分子^[5-6]. 后来其他被证明与VEGF结构和功能相似的蛋白被归为VEGF家族成员. 目前, 这个家族包括六个成员: VEGF(即VEGF-A), 胎盘生长因子(PLGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D和VEGF-E. 而VEGF(即VEGF-A)有五种亚型, 这些不同的亚型来自RNA的选择剪接, 并根据在其基本结构域的氨基酸个数的不同来命名: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆. 在多数细胞中, VEGF₁₆₅被公认为是最主要的亚型.

为了阐述VEGF及其亚型在肿瘤血管形成的重要性, 我们首先要认清这些蛋白的受体. 目前, 有三个已被证实能够靶向VEGF家族成员的受体, 这些受体包括VEGFR-1, 即flt-1(fetal liver tyrosine kinase-1); VEGFR-2, 即KDR/flk-1(kinase domain region/fetal liver kinase-1); VEGFR-3, 即flt-4(fetal liver tyrosine kinase-4). 检测这些受体的位点、结构和功能发现: 他们对内皮细胞相对专一并包含一个细胞内的酪氨酸激酶信号域. VEGFR-1和VEGFR-2主要在血管内皮上表达, VEGFR-3主要表达于淋巴内皮. VEGF的主要活性是通过VEGFR-1和VEGFR-2实现的, VEGFR-3主要作用是作为VEGF-C和VEGF-D的受体.

VEGF的表达受几种因子的共同调节: 局部组织缺氧, 细胞因子, 肿瘤基因, 肿瘤抑制基因和各种生长因子^[7]. 足够的组织氧合对细胞的生存至关重要, 组织缺氧与恶性肿瘤的发展, 转移灶的形成和对放疗的耐受性相关. 缺氧诱导因子-1(HIF-1)是一种在组织缺氧中调节VEGF表达的主要调节剂. HIF-1由两个亚单位组成, 即HIF-1 α 和HIF-1 β . HIF-1结合到内皮细胞的低氧易感增强子区而上调VEGF表达^[8]. 在体外实验中, 缺氧可上调VEGF的表达, 然而, 在活体实验中, 有关VEGF在慢性缺氧性疾病中的调节却意见不一. Oltmanns *et al*^[9]通过对14例健康人在人为控制的缺氧环境下(氧饱和度为75%)与含氧量正常的对

照组的双盲实验中发现: 在保持血糖和血浆胰岛素水平稳定的条件下, 急性缺氧可减少VEGF的表达水平($P<0.05$); 与体外实验的比较, 健康人群中, 急性缺氧可减少血浆VEGF的浓度, 这暗示全身的VEGF浓度可能受到多方面的调节, 而非仅在细胞基础上的表达. Semenza^[10]却认为在各种病理生理缺氧环境下, VEGF mRNA可被诱导并呈高表达. 参与VEGF的进一步调节机制的因子还包括转录生长因子- β 、上皮生长因子、白介素-1 α 、白介素-6和前列腺素E等^[11].

VEGF的生物效应包括: 在血管内皮细胞中有促进有丝分裂的活性并诱导血管形成的能力^[4]; 具有抑制细胞凋亡的能力并充当一种内皮细胞生存因子^[5]; 在阻断种植有肝癌细胞小鼠的肝动脉研究中, VEGF能刺激基质金属蛋白酶(MMP)中间质胶原酶(MMP-1)的表达, 这种表达体现在mRNA和蛋白水平上^[12]. 同时, VEGF也能诱导纤溶酶原活化因子的mRNA和蛋白水平的表达和活性, 从而推断VEGF可能有细胞外蛋白水解的作用. 由于VEGF能诱导微血管的通透性, 血管通透性的增加而出现的血浆蛋白的外漏造就了一个纤维素丰富的环境, 在这个环境中可刺激成纤维细胞和内皮细胞的迁移, 因此他也被看成有促进肿瘤的血管形成的作用^[13].

由于VEGF在肿瘤血管形成中的重要作用, 大量的研究正在验证VEGF表达、肿瘤血管计数和VEGFRs的表达对结肠癌的预后价值. Ishigami *et al*^[14]通过免疫印迹杂交法对60例确认为结肠癌的患者检测其VEGF mRNA水平, 结果发现: VEGF与肿瘤的发展、侵袭和转移相关; VEGF mRNA的过度表达与不良预后高度相关. Doger *et al*^[15]却认为, VEGF在结肠癌标本的表达情况不能作为生存时间和淋巴结转移的影响因子. Des Guetz *et al*^[16]通过近年来发表的关于结肠癌的MVD(45篇)或者VEGF(27篇)表达的论文进行分析, 发现高MVD的患者暗示高复发率和低生存时间, MVD与生存率呈现负相关, 高VEGF表达的患者预示高复发率和低更差的生存时间.

总之, 大多研究支持VEGF可作为肿瘤预后不良的一个参照因子. 阻断VEGF的表达将可抑制肿瘤的血管形成、并可能阻止肿瘤的侵袭和转移. 通过十多年的努力, 世界上首个批准上市的VEGF抑制剂-贝伐单抗(Avastin), 于2004年通过美国FDA的批准并上市用于一线治疗晚期结肠癌. 相信在不久的将来, 抗血管形成的药物将成为治疗晚期肿瘤的一种有效、副作用小的

研发前沿
目前对结肠癌的发生、发展(特别是肿瘤的生物学行为, 如血管形成、侵袭和转移)各个不同时期的分子生物学改变尚未完全清楚. 但VEGF和MMPs等蛋白的改变对结肠癌的发生、发展起着关键的作用. 通过了解并阻断这些关键蛋白的生物学表达, 将有助于结肠癌的进一步治疗.

相关报道

Ferrara *et al*对肿瘤的血管形成特别是VEGF进行了详细的研究,指出其与肿瘤的血管形成密切相关;Zucker *et al*对MMPs进行详细的报道,并指出了其与肿瘤的侵袭和转移高度相关。

新治疗药物。

1.2 血小板衍生的内皮细胞生长因子 PD-ECGF 也被称为胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP),目前已被证实其在结直肠癌中的表达有两种功效。第一,其已涉及作为一种血管原的刺激因子, Takahashi *et al*^[17]通过对96例结肠癌标本行PD-ECGF免疫染色,观察到在高血管计数、低VEGF表达的标本中比在高血管计数、高VEGF表达的标本中PD-ECGF有更高的表达。这暗示在VEGF表达低的肿瘤中,PD-ECGF作为一种重要的血管因子。第二,PD-ECGF催化可逆的嘧啶磷酸分解作用,如脱氧胸腺嘧啶,这是一个对正常代谢的重要角色。PD-ECGF在结直肠癌肿瘤的行为机制可能是提高氟嘧啶的活性,由此可提高结直肠癌对5-FU治疗的敏感性。支持这个理论的证据是通过把PD-ECGF互补DNA转入到多细胞株中(包括HT29人结直肠癌细胞株),应用转染分析法可证明其增强了对5-FU的敏感性^[18]。PD-ECGF是否作为一个预后参数,其意见不一。Takebayashi *et al*^[19]对163例结肠癌标本行PD-ECGF免疫染色,发现结肠癌标本的PD-ECGF染色与肿瘤大小、侵入范围、淋巴结转移和静脉的侵入明显相关。而Saito *et al*^[20]通过对86例结直肠癌标本行PD-ECGF的免疫染色,结果发现PD-ECGF高表达的标本有较低的淋巴结和远处转移的发生率,但却与肿瘤大小、组织类型、浸润深度、淋巴和静脉转移无相关性。因此,有关PD-ECGF表达的预后价值有待于进一步的研究。

1.3 凝血酶敏感素 TSP家族包含五种大分子物质,他们共同作用于细胞表面和细胞外基质,调节细胞和血管形成的相互作用,基于三维结构的不同可将其进一步分成若干个亚科。TSP-1和TSP-2同是三聚体蛋白而被归属为亚科A,而TSP-3、TSP-4和软骨低聚物基质蛋白均是五聚物蛋白而被归属为亚科B。TSP-1和TSP-2已被较为广泛的研究并证实他们在肿瘤的血管形成中扮演重要的角色。TSP-1由 α -血小板颗粒释放,具有正向调节创面愈合的功能。TSP-1的过度表达可导致创伤愈合和损伤性肉芽组织增生的延迟,降低内皮细胞的增殖,减少成纤维细胞移入到创口中,并且减少肉芽组织中30%的血管密度^[21]。TSP-2主要是由促进成纤维细胞的释放,从而治疗皮肤的创伤。TSP-1和TSP-2两者都表现出有抑制肿瘤生长和血管形成的功能,但是,有关他们在预后的功能却相矛盾。Maeda *et al*^[22]通过对100例结

直肠癌标本进行TSP-1表达的检测发现TSP-1阴性的肿瘤有更差的预后。Tokunaga *et al*^[23]应用逆转录多聚酶链式反应法,评估61例结肠癌患者的TSP-2和VEGF的表达发现,TSP-2阳性/VEGF阴性的肿瘤患者其预后较好。这些研究支持,在结直肠癌中,抗血管原因子的正向平衡可成为较好预后的前兆的理论。

1.4 血管生成素 是一类生长因子家族,能特异性结合内皮细胞特异的酪氨酸激酶受体Tie-2并作为其配体。目前有4种已知的血管生成素,即Ang-1, Ang-2, Ang-3和Ang-4,但仅仅Ang-1和Ang-2涉及结直肠癌的肿瘤生成。Ang-1被认为起着稳定血管的效应,这种稳定效应是通过与Tie-2受体结合,促进内皮细胞和周围的细胞外基质的相互作用而起效。Ang-2是肿瘤血管发生不稳定的信号,表达于血管出芽区和退变区。Ahmad *et al*^[24]把经过Ang-1和Ang-2互补DNA转染的HT29结肠癌细胞sc到裸鼠中,通过CD31介导的免疫组化染色法,检测肿瘤血管计数。实验表明,Ang-1转染的肿瘤有明显低下的血管密度,而经Ang-2转染的肿瘤却有明显增高的血管密度,并能促进肿瘤的生长。虽然确切的机制尚未清楚,目前资料提示Ang-2在VEGF存在的情况下可诱导血管形成,而Ang-1在VEGF存在情况下的过度表达却是抗血管原性的。

1.5 Ephrins 促红细胞生成素产生的肝癌扩增序列家族是一种相对新的酪氨酸激酶受体家族,其功能已被认为与胚胎发生和肿瘤血管形成相关,这一点是通过调节细胞的黏附和迁移而起作用的。目前,这个家族包括14个受体和8个配体,大量研究表明这些受体在不同的人类肿瘤中呈增量调节或者过度表达,如成胶质细胞瘤、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌和结直肠癌等各种实体瘤。这些受体的配体位于ephrins末端,存在于质膜内或锚定在质膜上。这些受体和配体基于其结构、序列的同源性和亲合力大小可划分为A、B两个亚型。Liu *et al*^[25]通过在人结直肠癌标本中,运用免疫组化法对ephrin家族成员EphB4和ephrin-B2进行染色,在与癌旁正常黏膜的比较中发现ephrin-B2和EphB4在所有肿瘤标本中均有过度表达,这一点表明ephrins在结肠癌的发展中扮演着角色。

2 侵袭和转移

结直肠癌的生成和发展的一个重要机制是转化的细胞侵入和跨过基底膜的能力,这个过程有

利于腺瘤发展成为癌和转移灶. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)就是涉及这个过程的特定酶类. MMPs不仅包括降解过程的一部分酶素, 而且包括限制肿瘤活性的抑制因子. MMPs的一般功能就是降解蛋白多糖和基质糖蛋白. 同时, MMPs对于肿瘤的演进、基底膜完整性的缺失也是相当重要的, 这可能与肿瘤远处转移和预后不良的可有性增加相关^[26]. 因此, MMPs的过度表达可能是多级过程的一部分, 这个过程就是赘生细胞能够增殖和转移的过程. 在这里, 我们主要描述MMPs的主要类别和MMPs的组织抑制子(TIMPs), 并主要说明其在体内、外的动物研究资料上的进展.

MMPs是一组结构相关的肽链内断酶, 他们涉及正常组织降解和重塑的过程, 如血管形成和创伤修复. MMPs也与一些病理状况有关, 如关节炎. 每一个独特的MMPs共享几个相似的蛋白结构域, 他们基础结构的改变, 靶向相对应的细胞膜底物, 并能够激活其他的MMPs成员, 形成级联效应. MMP家族的原始类别包括胶原蛋白酶、间质溶解素、基质溶解因子、明胶酶、膜型金属蛋白酶和TIMPs. 胶原蛋白酶(MMP-1, -8和-13)主要是降解胶原, 并限制其他MMPs的活性. 间质溶解素(MMP-3, -10, -11和-12)主要是降解弹力蛋白、蛋白聚糖、层粘连蛋白和纤维结合素, 并能够激活胶原蛋白酶. 基质溶解因子(MMP-7)是最基本的MMP并且有最广泛的活性, 他能降解广泛的蛋白聚糖、层粘连蛋白、纤维结合素、明胶酶、胶原IV和弹力蛋白, 他也是一些胶原蛋白酶和明胶酶A(MMP-2)的原始激活剂. 明胶酶(MMP-2和-9)可降解明胶剂、胶原和弹力蛋白, 他们几乎没有激活其他MMPs的能力. 膜型金属蛋白酶(1-6)是一类锚在细胞膜上并可能参与细胞外基质元件的降解, 但是他们在明胶酶的激活中可能扮演着主要的角色. TIMPs是抑制MMP家族一些成员激活的一类蛋白, 包括TIMP-1和TIMP-2, 尤以后者为重要^[27]. 有资料报告TIMPs具有抗肿瘤或者抗转移的效能, 但最近的研究多表明TIMPs具有双面效应, TIMPs也可能与恶性肿瘤的活性相关. Roca *et al*^[28]通过回顾性研究并随访5年, 应用免疫染色法对81例结直肠癌患者进行研究, 结果发现, 通过多变量分析显示TIMP-1和TIMP-2与肿瘤的预后呈负相关, 但通过单变量分析却显示只有TIMP-2的过度表达可作为总生存率的预后因子.

至今, 已证明三种MMPs与结直肠腺

瘤和结直肠癌密切相关. MMP-2是主要的降解胶原IV的分子. 已有报道MMP-2在胃癌、胰腺癌和结直肠癌等实体瘤中的过度表达. MMP-7可能通过赘生细胞来表达, 并可能作用于新生物生长的早期阶段. 通过与正常黏膜的比较学习发现MMP-9 mRNA在结直肠癌中呈现高水平, 同时伴随着无瘤生成率和总体生存率的明显缩短. Heslin *et al*^[29]指出, MMP-7的过度表达发生在致癌的级联效应的早期阶段, 即从正常黏膜发展到腺瘤的阶段. 腺瘤需要一定的能力才能发展成为具有侵袭力的腺癌, 研究发现MMP-7在这阶段仍然保持着较高的水平, 这种能力是通过MMP-7的活化作用或者其他调节子(在这些组织中还没被定义的调节因子, 如其他的MMPs、前列腺素和生长因子等)的激活效应而使MMP-2和MMP-9的表达增强. 这可能有助于肿瘤细胞发展成为具有侵袭能力的癌细胞, 或者在原先正常组织中新血管的发生.

最近, Zinzindohoué *et al*^[30]通过对201例结直肠癌患者行多重PCR技术来检测MMP-1和MMP-3的基因型, 结果发现, MMP基因型与临床结果存在相关性, MMP-1的高度表达与肿瘤的侵入, 转移和预后存在正相关, 而MMP-3的活性则做为MMP-1的补充, MMP-3的高度表达与癌症危险性相关. Jung *et al*^[31]通过免疫印迹法对41例结直肠癌患者进行分析, 结果发现, 肿瘤的浸润深度与MMPs和TIMPs无相关性, 但微血管计数与肿瘤的浸润深度存在正相关. TIMP-2的上调与邻近淋巴结的侵入成正相关, TIMP-2的过度表达与淋巴结的转移亦存在正相关.

3 结论

总之, MMPs在从结直肠腺瘤发现到结直肠癌阶段起着重要的作用. TIMPs是抑制MMP家族一些成员的一类蛋白, 具有抗肿瘤又有促肿瘤生成的双面性. 临床上通过MMPs抑制物来控制肿瘤生长的应用既要注意本身的抗MMPs作用又要尽可能使TIMPs发挥出抗肿瘤的效应, 这一点仍需要进一步的研究学习.

结直肠癌从血管形成到侵袭和转移的过程, 其生物学效应(表现在蛋白分子水平上)亦在不断的改变中, 各种因子共同调节着肿瘤的生成与发展. 通过对癌发生的某个特定通道的深刻认识特别是对于不同过程、不同机制之间的相互作用的了解将有助于我们获得对结直肠癌的

创新盘点
本文以结直肠癌的血管形成、侵袭和转移相关的特征性分子来说明其与疾病进展和术后生存率的相关性为主线, 对结直肠癌各个不同发展时期的特征性生物学行为进行了全面的总结并综述不同蛋白之间的相互联系.

应用要点
对结直肠癌血管形成、侵袭转移的生物学变化的了解,可为临床基因治疗结直肠癌提供理论依据。

进一步了解. 从而为抑制肿瘤的药物研发提供理论依据, 相信在不久的将来, 通过抑制不同通道来抗肿瘤的药物将成为晚期肿瘤患者的新希望。

4 参考文献

- 1 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
- 2 Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shaheen RM, Reinmuth N. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2001; 28: 94-104
- 3 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985
- 4 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858
- 5 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309
- 6 Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312
- 7 Robinson CJ, Mulloy B, Gallagher JT, Stringer SE. VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J Biol Chem* 2006; 281: 1731-1740
- 8 Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Ise T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 14073-14082
- 9 Oltmanns KM, Gehring H, Rudolf S, Schultes B, Hackenberg C, Schweiger U, Born J, Fehm HL, Peters A. Acute hypoxia decreases plasma VEGF concentration in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E434-E439
- 10 Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 2003; 54: 17-28
- 11 Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Hwang WT, Nelson PT, Lustig RA, Jenkins K, Magarelli DP, Hahn SM, Collins RA, Grady MS, Koch CJ. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8177-8184
- 12 Guo WJ, Li J, Chen Z, Zhuang JY, Gu WH, Zhang L, Pang J, Lu CH, Zhang WZ, Cheng YF. Transient increased expression of VEGF and MMP-1 in a rat liver tumor model after hepatic arterial occlusion. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 381-386
- 13 Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 2002; 39: 225-237
- 14 Ishigami SI, Arai S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M.

- Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379-1384
- 15 Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 2006; 38: 540-544
- 16 Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94: 1823-1832
- 17 Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, Ellis LM. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1146-1151
- 18 Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 582-587
- 19 Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1110-1117
- 20 Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 42-49
- 21 Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown LF, Janes L, Lange-Asschenfeldt B, Yano K, Hawighorst T, Iruela-Arispe L, Detmar M. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *EMBO J* 2000; 19: 3272-3282
- 22 Maeda K, Nishiguchi Y, Yashiro M, Yamada S, Onoda N, Sawada T, Kang SM, Hirakawa K. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in colorectal carcinoma. *Int J Mol Med* 2000; 5: 373-378
- 23 Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y. Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 354-359
- 24 Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, Shaheen RM, Bucana CD, Ellis LM. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1255-1259
- 25 Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM. Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 934-939
- 26 Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 101-117
- 27 Boedefeld WM 2nd, Bland KI, Heslin MJ. Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*

- 2003; 10: 839-851
- 28 Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Specterman S, de Kier Joffé EB, Pallotta MG, Puricelli LI, Lastiri J. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2006; 93: 151-160
- 29 Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001; 233: 786-792
- 30 Zinzindohoué F, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, Blons H, Laurent-Puig P. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 594-599
- 31 Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 401-408

同行评价
本文内容充实, 思路清晰, 层次分明, 有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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 2007-11-15)

代谢组学分析技术及其在消化道肿瘤中的应用进展

洪静, 陈金联

背景资料
代谢组学、基因组学、转录组学和蛋白质组学等共同组成了系统生物学。其中代谢组学是较新的一个分支, 近年来各种相关技术发展迅速, 在生命科学的诸多领域如分子病理生理学、药物效能及毒性、基因识别和功能基因组学、环境科学、检验医学以及疾病诊断等方面均有广泛的研究和应用。

洪静, 陈金联, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233
通讯作者: 洪静, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. hj960046@sina.com
电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019
收稿日期: 2007-10-16 修回日期: 2007-12-12

Technology of metabonomics and their application in gastrointestinal cancer

Jing Hong, Jin Lian Chen

Jing Hong, Jin Lian Chen, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jing Hong, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. hj960046@sina.com
Received: 2007-10-16 Revised: 2007-12-12

Abstract

Metabonomics as a branch of systems biology has developed rapidly in recent years. With the development of NMR, MS, chromatography and capillary electrophoresis technology, and their combined application, metabonomics has a more in-depth application in oncology research. Gastrointestinal cancer, as one of the most common human tumor types, has a high mortality. Metabonomics has been found to have successful applications in gastrointestinal cancer, such as early diagnosis. The main technologies of metabonomics and their present application in gastrointestinal cancer are reviewed here.

Key Words: Metabonomics; Nuclear magnetic resonance; Mass spectrometry; Capillary electrophoresis; Gastrointestinal cancer; Early diagnosis

Hong J, Chen JL. Technology of metabonomics and their application in gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 68-75

摘要

代谢组学作为系统生物学的一个分支近年发展迅速。核磁共振技术、各种色谱质谱技术以

及毛细管电泳技术的发展和联用, 使得代谢组学在肿瘤学方面有着越来越深入的研究。消化道恶性肿瘤作为人类最常见的一类肿瘤, 由于患者早期并无特异性症状, 临床发现时多已为进展期, 化疗毒性反应严重, 病死率高。当前代谢组学作为肿瘤学的研究方法之一, 能从代谢的角度整体分析疾病, 在消化道恶性肿瘤的早期诊断等方面的研究已初显优势。本文主要介绍代谢组学各类技术方法及其在消化道恶性肿瘤中的应用, 并对其今后的发展趋势作出展望。

关键词: 代谢组学; 核磁共振; 质谱; 毛细管电泳; 消化道恶性肿瘤; 早期诊断

洪静, 陈金联. 代谢组学分析技术及其在消化道肿瘤中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2007; 16(1): 68-75
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/68.asp>

0 引言

代谢组学(metabonomics)作为系统生物学(systems biology)的一个分支, 是继基因组学、转录组学及蛋白质组学等之后迅速发展的一门学科, 在后基因时代的研究已成为热点。代谢组学各种技术的发展及联用, 在生命科学诸多领域如分子病理生理学、药物效能及毒性、基因识别和功能基因组学、环境科学以及疾病诊断等方面均有广泛应用^[1-6]。

消化道恶性肿瘤是人类最常见的一类恶性肿瘤, 如肝癌、胃癌及结直肠癌等发病率均很高, 其发病机制尚未能完全阐明, 且多数患者早期并无特异临床症状, 发现时已属于进展期癌肿, 病死率高, 严重危害人民的健康^[7-11]。目前消化道内镜结合活组织病理检查虽较为成熟, 但由于其有创性, 因此早期诊断价值受限^[12]; 而传统肿瘤标志物(如AFP、CEA和CA125等)的联合检测虽能提高诊断阳性率, 但特异性不高, 特别是早期诊断阳性率比较低^[13-15]。在肿瘤学方面, 代谢组学以小分子代谢物为研究对象, 运用高通量、高敏感度的分析技术, 结合化学计量方法, 从代谢角度描述肿瘤病理过程的瞬间概况, 揭

示消化道恶性肿瘤整体性代谢变化, 在肿瘤的发病机制、早期诊断、个体化疗以及预后判断等方面的研究具有独特优势和临床应用价值. 我们就代谢组学主要技术及在消化道肿瘤方面的研究进展作一综述.

1 代谢组学概况

各种组学(omics)的研究和迅速发展共同组成了系统生物学, 而代谢组学(metabonomics)作为基因组学(genomics)和蛋白质组学(proteomics)的延伸, 是各组学中较新的研究领域. 机体基因表达的最终产物-代谢产物, 可以总体称为“代谢中间物组”. 与基因组类似, 基因组代表机体总体遗传部分, 代谢中间物组则代表个体中所有代谢物的总体, 研究这些细胞过程中小分子的化学指纹即发展为代谢组学. Nicholson *et al*^[16]将代谢组学定义为: 以动物的体液和组织为研究对象, 研究生物体对病理生理刺激或基因修饰产生的代谢物质的质和量的动态变化, 关注的对象是分子量在1000 kDa以下的小分子化合物. Fiehn^[17]将代谢产物的分析分为代谢物靶标分析, 代谢轮廓分析, 代谢组学以及代谢物指纹分析几个层次.

代谢组学的研究过程包括三个步骤: 样品的制备; 代谢产物的分离, 检测和鉴定; 数据分析和模型建立^[1,3,6].

2 代谢组学分析技术

主要包括核磁共振技术, 质谱技术以及各种与质谱的联用技术.

2.1 核磁共振技术 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)是原子核的磁矩在恒定磁场和射频磁场同时作用, 且满足一定条件时所发生的共振吸收现象, 是一种利用原子核在磁场中的能量变化来获得关于核信息的技术. 核磁共振可用于体液分析研究和活体分析. NMR作为一种主要的技术, 在代谢组学的多个研究领域如遗传差别和生理效应、药物安全性评价以及疾病诊断等方面均得到非常广泛的应用. 目前常用的有氢谱(¹H-NMR), 碳谱(¹³C-NMR)和磷谱(³¹P-NMR). 如¹H-NMR^[18-20]可将各种体液或组织提取液检测所得¹H-NMR谱峰与样品中各化合物氢原子对应, 再与标准氢谱对照鉴定出其代谢物化学成分及其含量多少. Constantinou *et al*^[21]在研究家兔心肌缺血再灌注、缺血预适应和抗氧化干预实验中, 应用¹H-NMR技术结

合PCA(主成分分析法)进行数据分析, 证实此技术用来描绘由心肌再灌注引起的代谢变化简单有效. Makinen *et al*^[22]应用¹H-NMR技术分析血清用来诊断糖尿病性肾病, 结果显示此方法与临床白蛋白排泄率检测相比, 样品的收集更为简单实用, 并且数据分析结果敏感性和特异性均很高, 分别为87.1%和89.0%, 可明确区分1型糖尿病的代谢特征. Odunsi *et al*^[23]采用¹H-NMR结合PCA和SIMCA等模式识别技术建立血清代谢物检测方法, 应用于卵巢癌鉴别诊断. Coen *et al*^[24]用¹H-NMR技术结合PCA处理数据, 研究脑膜炎和脑室炎的脑脊液代谢图谱, 证明此代谢组学方法分析脑脊液的可行性, 与传统实验室病原菌检查相比是更为潜在强大的诊断工具. NMR的优点是无损伤性, 可研究动态系统中代谢产物的变化规律, 实验方法灵活多样. NMR的缺点是灵敏度低, 分辨率不高, 且仪器的价格和维修费用昂贵.

2.2 质谱技术 质谱分析是一种物理方法, 其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离, 生成不同荷质比的带正电荷的离子, 经加速电场的作用, 形成离子束, 进入质量分析器. 在质量分析器中, 再利用电场和磁场使离子发生相反的速度色散, 将他们分别聚焦而得到质谱图, 从而确定其质量. 以其高灵敏度和高通量的特性, 目前有许多质谱和相关的质谱技术, 而色谱和电泳等分离方法与质谱分析相结合为复杂代谢物的在线分离分析提供有力的手段, 如气相色谱-质谱联用(GC-MS), 液相色谱-质谱联用(LC-MS)和毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)等是质谱相关技术中的常见技术, 在代谢组学的各个领域有广泛的应用^[25-34].

2.2.1 GC-MS: 气相色谱技术以其特有的三高一快(高灵敏度、高分离效能、高选择性、快速分析)优点, 常与质谱联用广泛应用于代谢组学的研究领域. 气相色谱技术适用于分离挥发性化合物. Chen *et al*^[25]用高剂量氢化可的松诱导出小鼠的肾功能不全动物模型. 作者分别收集给药前以及给药后第1, 3, 7, 10天的24 h尿液, 用GC-MS技术和主成分分析法(PCA)建立小鼠的尿代谢物模型. 结果显示, 与对照组相比, 给药组代谢物出现了显著的代谢变化. 从而提示此代谢组学的方法可应用于早期诊断, 是研究诸如代谢综合征等疾病的病理状态的极具发展潜力的工具. 由于GC适用于分离挥发性化合物, 因此不能直接得到体系中难挥发的代谢组分信息. A

研发前沿
通过各种分析技术(如核磁共振、色谱质谱和毛细管电泳等)的优化组合与联用, 检测液体中修饰核苷的种类和数量, 鉴定出恶性肿瘤的类型和分化程度, 有望实现恶性肿瘤早期诊断, 从而对传统肿瘤标志物提出了挑战.

相关报道
当前代谢组学在恶性肿瘤方面的研究越来越多,也越来越深入。除了消化道肿瘤之外,国内外对乳腺癌、肺癌和泌尿系肿瘤等方面亦有一些报道。

et al^[26]用GC-MS分析人血浆中间代谢产物,并结合PCA和PLS(偏最小二乘法)数据分析,将5种有机溶剂(甲醇,乙醇,乙腈,丙酮,氯仿)用来最优化低分子化合物的萃取物,其中32种内生化合物显示良好的精密度和线性,可在大约0.1 pmol注射水平检测到大部分化合物,结果提示,GC/MS技术结合PCA、PLS进行数据分析可有效识别相关疾病的生物标记物。

2.2.2 LC-MS:液相色谱法开始阶段是用大直径的玻璃管柱在室温和常压下用液位差输送流动相,称为经典液相色谱法,此方法柱效低、时间长(常有几个小时)。液相色谱法适用于分离低挥发性或非挥发性、热稳定性差的物质。*Wagner et al*^[27]在一个对照实验中,连续3 d(2次/d,每次间隔8 h)收集30名健康男女受试者的尿液,采用LC-MS技术分析尿样中硫酸尿酸代谢轮廓,并结合PCA和PLS-DA的方法处理数据,证明此法可用于多种毒性代谢产物以及疾病生物标记物的检测。*Millea et al*^[28]在实验中用LC-MS法鉴定个体内部以及个体之间低分子量唾液蛋白轮廓。连续3 d以上对4个受试者进行唾液分析,观察到每个个体所分泌的唾液可在数天内有相似的唾液蛋白结构,而其中的特殊蛋白表达水平易变。从受试者蛋白质轮廓的个体图形可以看到个体之间蛋白轮廓有显著差异。

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是在经典液相色谱法的基础上,于60年代后期引入气相色谱理论而迅速发展起来的。他与经典液相色谱法的区别是填料颗粒小而均匀,小颗粒具有高柱效,但会引起高阻力,需用高压输送流动相,故又称HPLC,又因分析速度快而称为高速液相色谱法(high speed liquid chromatography, HSLP),也称现代液相色谱。*Williams et al*^[29]采用电喷射离子化的HPLC-TOF/MS和1H-NMR分光术相结合,将 δ WD大鼠和Zucket肥胖鼠的尿液成分进行与年龄相关的代谢组学比较,并应用此代谢组学的技术可了解疾病过程。*Zhang et al*^[30]用HPLC和联机电生成[Cu(HIO₆)₂]₅-鲁米诺化学发光检测法检测猪肝中糖皮质激素残基,该实验可成功检测出氟羟泼尼松龙、强的松龙、氢化可的松、考的松、甲基氢化泼尼松,地塞米松和曲安缩松。*Cheng et al*^[31]用HPLC法和荧光免疫技术测定小剂量大鼠血浆和胆汁中伐地那非。该试验成功研究了大鼠体内伐地那非的生理代谢和胆汁排泄。

超高相液相色谱法(UPLC)与常规HPLC相比,具有更好的分离效率、峰容量以及灵敏度。这一技术与能够测定化合物的精确质量并具有MS/MS功能的高分辨率时间飞行质谱(time-of flight mass spectrometer, TOF-MS)联用成为复杂体系分离分析以及化合物结构鉴定的良好平台。如*Lenz et al*^[32]应用微孔UPLC/oa-TOF-MS和1H-NMR技术进行帕伐他汀静脉给药途径的 δ 大鼠尿液代谢组学分析,结果表明此方法能很好地鉴定毒性作用的靶器官,且可用于监测毒物代谢机制的起始和时程。目前,代谢轮廓在中草药领域如育种、合成、质量控制以及临床试验等方面越来越重要。*Chan et al*^[33]采用基于代谢组学的UPLC/TOF-MS技术方法检测未加工和经过蒸法处理过的人参三七素。实验表明该技术能够直接检测中草药合成过程中代谢产物的顺水衍生物。结合无监督的多变量主成份分析法可识别和实验认证不同的中草药提取物相关的独特生物标记物。从而表明采用TOF-MS和高分辨率、高保存时间、高重复性的UPLC法能精确测定出人参三七素的生物标志物。

2.2.3 CE-MS:毛细管电泳技术(Capillary Electrophoresis, CE)又称高效毛细管电泳(HPCE)或毛细管分离法(CESM),其基本原理是根据在电场作用下离子迁移的速度不同而对组份进行分离和分析。毛细管电泳技术可检测多种样品,如血清、血浆、尿样、脑脊液、红细胞、体液或组织及其实验动物活体实验;毛细管电泳技术兼有高压电泳及高效液相色谱等优点,其突出特点是:(1)所需样品量少、仪器简单、操作简便。(2)分析速度快,分离效率高,分辨率高,灵敏度高。(3)操作模式多,开发分析方法容易。(4)实验成本低,消耗少。(5)应用范围极广。*Szymanska et al*^[34]用毛细管电泳技术结合PCA预处理生物信息数据检测肾恶性肿瘤、膀胱癌和前列腺癌患者尿中核苷代谢轮廓,与HPLC和GC相比,毛细管电泳技术分辨率更高,分析速度更快,所需检测的尿样和底液量更少,但样品的可重复性相对较差。*Ullsten et al*^[35]采用CE-ESR-MS(毛细管电泳电喷射离子质谱法)分析*po*扑热息痛前后人尿样代谢轮廓,可高效快速鉴别给药组和空白对照组,结论是CE-MS可通过分析体液的代谢轮廓作为毒理过程检测和疾病诊断的可行方法。

3 代谢组学数据处理和分析方法

代谢组学的研究方法是整体分析过程,因生物

样品(体液, 组织提取液)的组成复杂, 在得到分析对象的原始谱图后, 首先需要对数据进行预处理(归一化和滤噪), 消除干扰因素, 保留有用信息. 滤噪常用正交信号校正技术(orthogonal signal correction, OSC). 再从预处理后的信息中对样品进行归类, 将得到的分类信息和这些样本的原始信息(如药物的作用位点或疾病的种类等)进行比较, 建立代谢产物与这些原始信息的联系, 筛选与原始信息相关的标记物, 进而考察其中的代谢途径; 或者建立类别间的数学模型, 使各类样品间达到最大的分离, 并利用建立的多参数模型对未知的样本进行预测. 最常用的是主成份分析法(principle components analysis, PCA). 其他还有非线性映射(nonlinear mapping, NLM), 偏最小二乘法(partial least squares, PLS)和神经网络(neural networks, NN)^[36]等.

4 代谢组学在消化道肿瘤中的应用

4.1 病因和预防 代谢组学通过分析与毒性作用靶点和作用机制密切相关的生物体液中内源性代谢产物浓度的特征性变化, 可以确定毒性靶组织, 毒性作用过程以及生物标志物. Egner *et al*^[37]用HPLC和同位素稀释串联质谱测定人尿中黄曲霉素-B(1)-N(7)-鸟嘌呤[AFB(1)-N(7)-Gua]. AFB(1)-N(7)-Gua是一种主要的黄曲霉素DNA加合反应的复合物, 通过尿液排泄, 是暴露AFB(1)饮食后的生物有效剂量标志物. 通过测量尿中含量, 可帮助识别作为肝细胞癌发生的危险因素AFB(1). 实验采用三联四级质谱, 配以用稳定的同位素标记内标物AFB(1)-N(7)-(15)N(5)-Gua以及固相萃取物和免疫亲和性柱色谱, 测量已知暴露于黄曲霉素饮食的某地20人尿中AFB(1)-N(7)-Gua浓聚物. 此方法大大提高代谢标志物检测的准确性、精密度、特异性和敏感性. 测量AFB(1)-N(7)-Gua的极限值为0.04 ng/L尿(0.07 ng/L肌苷). 由于提高了精密度和准确度, 可以精确测量出人新近暴露于AFB(1)饮食的敏感性标志物, 在肝癌病因预防的监测中有实际意义. Cai *et al*^[38]通过测定鼠和人类肝脏中5, 7, 4-三羟黄酮和麦黄酮的组织分配与代谢进行肝癌的预防研究. 临床前动物实验已证实存在于多叶蔬菜和米糠中的黄酮对癌前病变具有预防作用. 实验中, 给予小鼠5-7 d黄酮饮食, 采用HPLC-UV技术比较血浆、肝和胃肠黏膜中的黄酮浓度. 结果显示, 7 d后麦黄酮在血浆、肝和黏膜中浓度分别超过5, 7, 4-三羟黄酮浓度的350%、33%和100%. 其中三羟黄酮在

肝微体中葡萄糖酸化比麦黄酮快, 而麦黄酮的磺化作用比三羟黄酮更迅速. 并且二者的葡萄糖酸化率均比磺化作用快. 此实验成功采用代谢组学技术方法比较出麦黄酮的药物代谢动力学优势, 在肝癌的预防研究中具有一定的价值.

4.2 早期诊断 代谢组学在肿瘤诊断方面当前正致力于通过机体动态代谢途径来寻找新的具有诊断价值的特异性肿瘤标志物^[39-40]. 生物机体RNA的代谢可产生普通核苷和修饰核苷. 前者可被机体重新利用或降解, 因而尿中含量很少. 后者因不能被重新利用而随尿液排出, 因而尿中修饰核苷的排量可以反映机体细胞代谢速度. 根据肿瘤细胞增殖代谢较正常细胞快, 修饰核苷的产生和排出增多这一原理, 可通过测定尿液中修饰核苷的种类和数量来检测恶性肿瘤的类型和分化程度, 实现早期诊断^[41]. 目前已有较多报道采用代谢组学的方法检测尿液核苷代谢轮廓用来诊断乳腺癌^[42]、卵巢癌^[23]、肺癌^[43]及泌尿系统肿瘤^[34]等. 在消化道恶性肿瘤方面的研究有.

4.2.1 肝癌: Yang *et al*^[44]在实验中, 用HPLC技术结合PCA方法分析有顺式二元醇结构的尿代谢产物用来鉴别肝癌和肝硬化及肝炎患者. 实验对象是50例健康志愿者, 77例肝感染性疾病患者(包括27例肝硬化, 30例急性肝炎和20例慢性肝炎患者)和48例肝癌患者. 年龄在20-85岁. 尿液的收集无饮食和其他限制, 尿样于-20℃保存, 室温下解冻, 用HPLC法分析尿样, 记录所有峰值信息, 用PCA将得到的15种尿核苷(Pseu, C, U, m1A, I, m5U, G, X, m1I, m1G, ac4c, m2G, A, m22G和m6A)数据集进行代谢物靶点分析, 肝癌阳性率为83%, 优于传统肿瘤标志物AFP的肝癌阳性率73%. 另外, 在假阳性率的比较中, 以AFP>20 μg/L为标准, 肝硬化患者诊断为肝癌的假阳性率为50%, 肝炎患者诊断为肝癌的假阳性率为52.2%; 以AFP>200 μg/L为标准, 仍有11.5%的肝硬化患者和17.4%的肝炎患者被误诊为肝癌. 而在基于代谢组学方法分析15种尿核苷对肝癌的诊断中, 仅有7.4%的肝硬化患者被误诊为肝癌, 慢性肝炎患者则无1例被误诊. 此实验成功阐明代谢组学方法结合主成份分析进行数据分析可将肝癌患者从肝硬化和肝炎患者中有效鉴别出来, 且假阳性率低; 用代谢组学方法检测尿核苷小分子化合物诊断肝癌优于传统肿瘤标志物AFP的单项检测.

4.2.2 胃癌: Chen *et al*^[45]探讨检测尿中核苷在胃

创新盘点
随着代谢组学研究的深入, 国内外众多学者在药理学、环境科学、营养科学和疾病研究等方面均有相关综述报道. 本文着重从消化道恶性肿瘤的各个环环节多角度阐明代谢组学在消化道肿瘤中的研究动态.

应用要点
本文总结了代谢组学技术在消化道肿瘤的病因、预防、早期诊断、治疗、预后以及个体化治疗等各个方面的研究进展。特别是在早期诊断方面,有望突破传统的诊断标准,有较好的临床应用价值。

癌诊断中的意义。实验对象是50名正常人(20-71岁)与48例胃癌患者(36-77岁),先收集术前尿样,将经苯基硼酸凝胶色谱法提纯后的尿中核苷用高效液相色谱法进行分离,并对核苷进行定性和定量分析,计算尿中15种核苷的平均含量及其标准偏差;用 t 检验比较健康人与胃癌患者尿中核苷含量的差异,应用Spearman等级相关检验分析尿中核苷含量与肿瘤体积、淋巴结转移及肿瘤分化程度的相关性。结果显示胃癌患者尿中15种核苷的平均含量除m5U外,其余14种皆明显高于健康人($P < 0.05$),健康人尿中核苷水平的变异较小,而胃癌患者尿中核苷的变异较大;其中I(次黄嘌呤核苷)与肿瘤大小、淋巴结转移正相关,X(黄嘌呤核苷)与肿瘤淋巴结转移正相关。此次实验中48例胃癌患者25例同时接受血清CEA的检测。胃癌患者尿中14种核苷的阳性率分别为Pseu 45.0%, C 15.0%, U 10.0%, m1A 55%, I 40.0%, G 20.0%, X 40.0%, m1I 55.0%, m1G 45.0%, ac4C 25.0%, m2G 47.5%, A 35.0%, m22G 50.0%, m6A 17.5%。再以这14种核苷浓度作为数据矢量结合主成份分析-投影判别法区分正常人和胃癌患者,63%的胃癌患者被识别,明显高于CEA检测的阳性率12%。此实验探讨修饰核苷作为胃癌肿瘤标志物的可行性,说明尿中修饰核苷的检测可用于胃癌早期诊断及进展程度的监测。

4.2.3 结肠癌: Qiu *et al*^[46]在用1, 2-二甲胍诱导的结肠癌前病变大鼠模型中,将收集的尿样用水相ECF衍生试剂处理,用GC/MS技术分析尿中小分子代谢物代谢轮廓。结果表明代谢组学方法在结肠癌前病变诊断中的潜在价值,此方法的分析变异度小于鼠尿样的生物学变异度,从而证明GC/MS的代谢组学方法用于分析大规模变化的代谢产物是可信的,可用于研究人的病理学,包括疾病的发生、发展和死亡。

Feng *et al*^[47]的临床研究通过尿核苷检测探讨其对结直肠癌病理特征的关系。研究中将实验对象分为三组:结直肠癌组(42例,全部经病理检查明确诊断),癌前病变组(10例,经病理证实的绒毛状腺瘤)和正常对照组(62例)。收集术前随机尿样标本,提取尿中核苷,并用高效液相色谱分离分析,用主成份分析法判断14种核苷对结直肠癌的诊断敏感性。使用 t 检验, Spearman检验判断核苷与结直肠癌临床病理特征的相关性。结果显示:(1)结直肠癌诊断敏感性为81%,癌前病变诊断敏感性为60%,正常组中57例被正确识

别,特异性为92%。(2)结直肠癌组Pseu、m1G与肿瘤面积呈正相关,m1A、ac4C与Dukes分期呈正相关。提示Pseu、m1G、m1A和ac4C可能与结直肠癌的预后相关。(3)结直肠癌组尿中Pseu、C.m1A、mU、m22G、I、m1G、ac4C、m6A等9种核苷浓度显著高于对照组,癌前病变组中Pseu、C.m1A、mU、m22G、I、m1G等7种核苷浓度亦显著升高,说明代谢组学技术检测尿核苷对结直肠癌的诊断具有以下优势:敏感性高;具有早期诊断价值;可协助判断预后;具有较高特异性。

Feng *et al*^[48]还探讨尿核苷检测在结直肠癌手术治疗监测中的应用。实验采用反相高效液相色谱法检测52例结直肠癌患者术前1 d与术后8 d尿中14种正常与修饰核苷水平,同时以62例健康人作对照,并与传统肿瘤标志物CEA、CA19-9、CA125、AFP相比较,结果显示尿核苷诊断结直肠癌敏感性为76.9%,与CEA(38.5%)、CA19-9(40.4%)、CA125(15.4%)及AFP(17.3%)相比差异有统计学意义。且结直肠癌组40例行根治性手术前后尿核苷浓度有显著降低,术前Pseu、m1G、m1A、m22G浓度与肿瘤大小成正相关,其中Pseu和m1G敏感性高,且与肿瘤病理分期相关,从而说明尿核苷在结直肠癌诊断,手术治疗以及随访中的临床实用价值,有望成为结直肠癌肿瘤新型标志物,其中Pseu和m1G更具临床应用前景。

4.3 治疗预后 代谢组学通过对药物毒理学及药物代谢动力学方面的研究,检测出药物引起的内源性代谢物变化,更直接地反映体内生物化学过程和状态的变化,并通过认识液体代谢指纹图谱变化原因,阐明药物作用靶点或受体,指导抗肿瘤细胞药物的个体化治疗,以及评价临床疗效和安全性^[2,6]。

氟尿嘧啶广泛用于转移性胃癌的化疗。5-FU代谢途径中酶活性差异常影响其代谢范围和化疗效能。Ichikawa^[49]在综述中讨论了遗传因素对氟尿嘧啶治疗效果的影响。结果表明5-FU代谢途径中有关酶:胸核苷酸合酶、二氢嘧啶脱氢酶、胸苷磷酸化酶及乳清酸磷酸核糖转移酶的基因阳性表达与FU化疗转移胃癌的疗效相关。这些候补基因与其他被识别的基因,将来有可能准确预测化疗预后。Nakayama *et al*^[50]在试验中应用HPLC和GC/MS技术测量尿中嘧啶代谢产物和血浆中5-FU水平,通过对比尿中二氢尿嘧啶比和 po 5-FU类似物患者5-FU血浆

浓度, 阐明了二氢嘧啶脱氢酶(DPD)缺陷在避免5-FU严重毒性反应中的重要性, 并用来评价胃和结直肠癌患者. 试验对象为14例胃癌和结直肠癌术后患者, 分为替加氟治疗组和优福定治疗组以及非治疗组. 尿中UH2(二氢尿嘧啶)、Ura(尿嘧啶)水平用HPLC法测定, 血浆中5-FU水平用GC/MS法测定. 结果5-FU类似物治疗组UH2/Ura和非治疗组UH2/Ura比值可明显提示尿中Ura与血浆中5-FU浓度呈负相关. 结论是无论尿中Ura, 治疗组UH2/Ura还是非治疗组UH2/Ura均能预测血浆中5-FU浓度或DPD缺乏. 从而说明UH2/Ura比值是预测5-FU分解代谢缺陷危险性的重要可能性.

甲基吡啶蕃菔皂甙(MPD), 一种呋喃甾醇皂甙, 是一临床前药物, 对非粒细胞白血病和实体瘤的大部分细胞系具有抗增殖活性能力. He *et al*^[51]用代谢组学的方法识别出大鼠尿中MPD代谢产物, 并显示出其中部分代谢物的抗肿瘤细胞增殖能力. 用高分辨MS、NMR(包括¹H-NMR, ¹³C-NMR, ²D-NMR)技术以及化学方法识别蕃菔皂甙等10个代谢产物. 蕃菔皂甙是MPD在鼠尿中主要代谢产物, 结果表明某些代谢产物体外对肝细胞系HepG2、NCI-H460、人乳癌细胞系MCF-7和海拉癌细胞株具有抗增殖活性.

5 结论

代谢组学作为系统生物学中一个新的分支, 正处于迅速发展的阶段. 代谢组学以其独特的视角, 从生物代谢层面进行研究, 以小分子代谢化合物为研究对象, 采用高通量, 高分辨率的化学分析技术, 并结合化学计量统计方法, 研究生物体的整体代谢变化, 在生物学各个领域均有广泛的研究和应用. 以核磁共振、色谱、质谱以及毛细管电泳等为主的代谢组学技术, 结合各种化学计量统计方法, 可以描绘出生物体内海量小分子代谢化合物的代谢轮廓, 从而进行代谢物靶标分析、药物靶点鉴定、阐明药物代谢动力学及毒理学特点, 在消化道肿瘤的早期诊断、病因、预防研究和个体化治疗等各个方面的研究均有很大的发展潜力. 然而代谢组学在消化道肿瘤方面的研究尚处于发展阶段, 还需各技术之间的联用和优化组合, 实验方法的选择和优化, 以及开发完善消化道肿瘤代谢物组数据库, 与其他组学相结合, 才能对消化道恶性肿瘤进行多角度、多层次的整体研究, 全面阐

明消化道肿瘤的发病机制, 寻找消化道肿瘤早期诊断有效的肿瘤标志物, 以提高消化道肿瘤患者治疗疗效.

6 参考文献

- Steinhauser D, Kopka J. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: primary metabolism. *EXS* 2007; 97: 171-194
- Robertson DG, Reily MD, Baker JD. Metabonomics in pharmaceutical discovery and development. *J Proteome Res* 2007; 6: 526-539
- Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 443-458
- Larive CK. Metabonomics, metabolomics, and metabolic profiling. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 523
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Anal Chem* 2006; 78: 4281-4290
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm Res* 2006; 23: 1075-1088
- Cronin-Fenton DP, Sharp L, Carsin AE, Comber H. Patterns of care and effects on mortality for cancers of the oesophagus and gastric cardia: a population-based study. *Eur J Cancer* 2007; 43: 565-575
- Okamoto N, Saruki N, Mikami H, Yamashita K, Maruyama Y, Yano T, Imamura Y, Kaneko S, Tanaka H. 5-year survival rates for primary cancer sites at cancer-treatment-oriented hospitals in Japan. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7: 46-50
- Marrelli D, Roviello F. Prognostic score in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 362-364
- Sjovall A, Holm T, Singnomklao T, Granath F, Glimelius B, Cedermark B. Colon cancer management and outcome in relation to individual hospitals in a defined population. *Br J Surg* 2007; 94: 491-499
- Sun HC, Zhuang PY, Qin LX, Ye QH, Wang L, Ren N, Zhang JB, Qian YB, Lu L, Fan J, Tang ZY. Incidence and prognostic values of lymph node metastasis in operable hepatocellular carcinoma and evaluation of routine complete lymphadenectomy. *J Surg Oncol* 2007; 96: 37-45
- Kong SH, Park DJ, Lee HJ, Jung HC, Lee KU, Choe KJ, Yang HK. Clinicopathologic features of asymptomatic gastric adenocarcinoma patients in Korea. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 1-7
- Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, Stadheim LM, Aderca I, Moser CD, Nagorney DM, LaRusso NF, de Groen PC, Menon KV, Lazaridis KN, Gores GJ, Charlton MR, Roberts RO, Therneau TM, Katzmann JA, Roberts LR. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 394-402; quiz 267
- Wang JY, Lu CY, Chu KS, Ma CJ, Wu DC, Tsai HL, Yu FJ, Hsieh JS. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg*

名词解释

- 系统生物学: 是在细胞、组织、器官和生物体整体水平研究结构和功能各异的各种分子及其相互作用, 并通过计算生物学来定量描述和预测生物功能、表型和行为.
- 基因组学: 是发展和应用DNA制图, 测序新技术以及计算机程序分析生命体(包括人类)全部基因组结构及功能. 包括结构基因组学、功能基因组学 and 比较基因组学.
- 蛋白质组学: 一般认为他是研究蛋白质组或应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的一门学科. 是对基因组所表达的整套蛋白质的分析.
- 主成份分析法: 主成份分析也称主份量分析, 旨在利用降维的思想, 把多指标转化为少数几个综合指标. 他是一种数学变换的方法, 把给定的一组相关变量通过线性变换转换成另一组不相关的变量, 这些新的变量按照方差依次递减的顺序排列.

同行评价

本文内容较新, 论证有据, 层次结构清楚, 文章引用恰当, 有较强的可读性.

- Res 2007; 39: 245-250
- 15 Hotta K, Kiura K, Tabata M, Takigawa N, Fujiwara Y, Umemura S, Tanimoto M. Role of early serial change in serum carcinoembryonic antigen levels as a predictive marker for radiological response to gefitinib in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 1737-1741
 - 16 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189
 - 17 Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 155-171
 - 18 Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in 1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. *Anal Chem* 2007; 79: 1181-1186
 - 19 Ott KH, Aranibar N. Nuclear magnetic resonance metabonomics: methods for drug discovery and development. *Methods Mol Biol* 2007; 358: 247-271
 - 20 Serkova NJ, Niemann CU. Pattern recognition and biomarker validation using quantitative 1H-NMR-based metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 717-731
 - 21 Constantinou MA, Tsantili-Kakoulidou A, Andreadou I, Iliodromitis EK, Kremastinos DT, Mikros E. Application of NMR-based metabonomics in the investigation of myocardial ischemia-reperfusion, ischemic preconditioning and antioxidant intervention in rabbits. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 303-314
 - 22 Makinen VP, Soinen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, Groop PH, Ala-Korpela M. Diagnosing diabetic nephropathy by 1H NMR metabonomics of serum. *MAGMA* 2006; 19: 281-296
 - 23 Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, Geisler JP, Miller G, Sellers T, Cliby W, Qian F, Keitz B, Intengan M, Lele S, Alderfer JL. Detection of epithelial ovarian cancer using 1H-NMR-based metabonomics. *Int J Cancer* 2005; 113: 782-788
 - 24 Coen M, O'Sullivan M, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrell T. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1582-1590
 - 25 Chen M, Zhao L, Jia W. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model. *J Proteome Res* 2005; 4: 2391-2396
 - 26 A J, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, Marklund SL, Moritz T. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem* 2005; 77: 8086-8094
 - 27 Wagner S, Scholz K, Sieber M, Kellert M, Voelkel W. Tools in metabonomics: an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine. *Anal Chem* 2007; 79: 2918-2926
 - 28 Millea KM, Krull IS, Chakraborty AB, Gebler JC, Berger SJ. Comparative profiling of human saliva by intact protein LC/ESI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774: 897-906
 - 29 Williams RE, Lenz EM, Rantalainen M, Wilson ID. The comparative metabonomics of age-related changes in the urinary composition of male Wistar-derived and Zucker (fa/fa) obese rats. *Mol Biosyst* 2006; 2: 193-202
 - 30 Zhang Y, Zhang Z, Song Y, Wei Y. Detection of glucocorticoid residues in pig liver by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated [Cu(HIO6)2](5-)-luminol chemiluminescence detection. *J Chromatogr A* 2007; 1154: 260-268
 - 31 Cheng CL, Kang GJ, Chou CH. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection for the determination of vardenafil in small volumes of rat plasma and bile. *J Chromatogr A* 2007; 1154: 222-229
 - 32 Lenz EM, Williams RE, Sidaway J, Smith BW, Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Shockcor J, Stumpf CL, Granger JH, Wilson ID. The application of microbore UPLC/oa-TOF-MS and 1H NMR spectroscopy to the metabonomic analysis of rat urine following the intravenous administration of pravastatin. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 845-852
 - 33 Chan EC, Yap SL, Lau AJ, Leow PC, Toh DF, Koh HL. Ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics of raw and steamed Panax notoginseng. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21: 519-528
 - 34 Szymanska E, Markuszewski MJ, Capron X, van Nederkassel AM, Heyden YV, Markuszewski M, Krajka K, Kalisz R. Increasing conclusiveness of metabonomic studies by chem-informatic preprocessing of capillary electrophoretic data on urinary nucleoside profiles. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 413-420
 - 35 Ullsten S, Danielsson R, Backstrom D, Sjoberg P, Bergquist J. Urine profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry and multivariate data analysis. *J Chromatogr A* 2006; 1117: 87-93
 - 36 Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 469-479
 - 37 Egnér PA, Groopman JD, Wang JS, Kensler TW, Friesen MD. Quantification of aflatoxin-B1-N7-Guanine in human urine by high-performance liquid chromatography and isotope dilution tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1191-1195
 - 38 Cai H, Boocock DJ, Steward WP, Gescher AJ. Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricrin, flavones with putative cancer chemopreventive properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60: 257-266
 - 39 Liebich HM, Muller-Hagedorn S, Klaus F, Mezziane K, Kim KR, Frickenschmidt A, Kammerer B. Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers. *J Chromatogr A* 2005; 1071: 271-275
 - 40 Dudley E, Lemiere F, Van Dongen W, Esmans E, El-Sharkawi AM, Games DE, Brenton AG, Newton RP. Urinary modified nucleosides as tumor markers. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2003; 22: 987-989
 - 41 Dieterle F, Muller-Hagedorn S, Liebich HM, Gauglitz G. Urinary nucleosides as potential tumor markers evaluated by learning vector quantization. *Artif Intell Med* 2003; 28: 265-279
 - 42 Cho SH, Jung BH, Lee SH, Lee WY, Kong G, Chung BC. Direct determination of nucleosides in the

- urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2006; 20: 1229-1236
- 43 Murphey LJ, Williams MK, Sanchez SC, Byrne LM, Csiki I, Oates JA, Johnson DH, Morrow JD. Quantification of the major urinary metabolite of PGE2 by a liquid chromatographic/mass spectrometric assay: determination of cyclooxygenase-specific PGE2 synthesis in healthy humans and those with lung cancer. *Anal Biochem* 2004; 334: 266-275
- 44 Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Pang T, Lv S, Yang Q. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabolomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 813: 59-65
- 45 Chen YJ, Zheng YF, Wang NF, Lu S, Pang T, Yang Q, Xu GW. Significance of urinary nucleosides in diagnosis of gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2003; 22: 537-540
- 46 Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, Jia W. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabolomic profiling. *Anal Chim Acta* 2007; 583: 277-283
- 47 Feng B, Zheng MH, Zheng YF, Lu AG, Li JW, Wang ML, Ma JJ, Xu GW, Liu BY, Zhu ZG. Normal and modified urinary nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1913-1919
- 48 Feng B, Zheng MH, Zheng YF, Lu AG, Li JW, Wang ML, Ma JJ, Xu GW, Yu BM. Application of urinary nucleosides in the diagnosis and surgical monitoring of colorectal cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005; 43: 564-568
- 49 Ichikawa W. Prediction of clinical outcome of fluoropyrimidine-based chemotherapy for gastric cancer patients, in terms of the 5-fluorouracil metabolic pathway. *Gastric Cancer* 2006; 9: 145-155
- 50 Nakayama Y, Matsumoto K, Inoue Y, Katsuki T, Kadowaki K, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Sako T, Nagata N, Itoh H. Correlation between the urinary dihydrouracil-uracil ratio and the 5-FU plasma concentration in patients treated with oral 5-FU analogs. *Anticancer Res* 2006; 26: 3983-3988
- 51 He X, Qiao A, Wang X, Liu B, Jiang M, Su L, Yao X. Structural identification of methyl protodioscin metabolites in rats' urine and their antiproliferative activities against human tumor cell lines. *Steroids* 2006; 71: 828-833

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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)

肝癌基因谱动态表达及HSPgp96异常的临床价值

吴信华, 姚登福, 苏小琴, 黄华, 邱历伟, 吴玮

背景资料
肝癌(HCC)防治是全世界的医学难题。正常肝细胞发生癌变是一个多病因、多步骤及多因子协同的复杂过程。晚期HCC切除后复发率高, 易转移, 所以早期诊断、早期治疗显得尤为重要。HSPgp96由于其独特的分子伴侣功能, 在细胞周期调节、DNA损伤的控制、基因产物的代谢和癌变方面起着重要的作用。

吴信华, 姚登福, 苏小琴, 黄华, 邱历伟, 吴玮, 南通大学附属医院医学实验中心 江苏省南通市 226001
江苏医学科学重点资助项目, No. RC2003100
南通市社会发展科技计划资助项目, No. S40034
通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院医学实验中心. yaodf@ahnmc.com
收稿日期: 2007-04-24 修回日期: 2007-12-12

Dynamic expression of entire hepatic genomes and heat-shock protein gp96 abnormality during development of hepatocellular carcinoma

Xin-Hua Wu, Deng-Fu Yao, Xiao-Qin Su, Hua Huang, Li-Wei Qiu, Wei Wu

Xin-Hua Wu, Deng-Fu Yao, Xiao-Qin Su, Hua Huang, Li-Wei Qiu, Wei Wu, Medical Research Center, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: Grants-in-aid from the Key Project of Medical Science from Jiangsu Province, No. RC2003100 and the Science and Technology Project for Social Development of Nantong, No. S40034

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Medical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 West Temple Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2007-04-24 Revised: 2007-12-12

Abstract

AIM: To investigate the dynamic expression of the entire hepatic genome during hepatocellular carcinoma (HCC) development, and the clinical values of heat-shock protein gp96 for early diagnosis of HCC and estimating its prognosis.

METHODS: A rat hepatoma model was induced with 0.05% 2-acetamidofluorene (2-FAA) in male Sprague-Dawley rats. Morphological changes were observed by pathological examination (HE staining). Total RNA was extracted from fresh liver tissues and analyzed by oligonucleotide array during liver carcinogenesis. Total RNA was transferred into cDNA by reverse transcription, and the gene fragment of gp96 was amplified by nested RT-PCR.

RESULTS: Histological examination suggested hepatocytes in rats fed with 2-FAA showed vacuole-like denaturation at an early stage, then dysplastic nodules appeared at the middle stage, and finally progressed to cancerous nest tubercles, all of which were highly differentiated during HCC development. gp96 increased three-fold in the liver of rats with HCC, in contrast with that of normal rats. gp96 mRNA in the liver of rats with denatured, precancerous and cancerous tissues increased in contrast with that in normal tissues(90.9%, 100%, 100% vs 16.67%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Alterations in the entire genome pattern and gp96 overexpression are observed during HCC development. gp96 may be a useful molecular marker for early diagnosis of HCC and prognosis estimation.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Heat-shock protein gp96; Oligonucleotide array; Nested RT-PCR

Wu XH, Yao DF, Su XQ, Huang H, Qiu LW, Wu W. Dynamic expression of entire hepatic genomes and heat-shock protein gp96 abnormality during development of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 76-80

摘要

目的: 探讨肝细胞癌变过程中基因表达谱的动态变化, 观察热休克蛋白(HSP)gp96表达及其在肝癌早期诊断及判断预后方面的临床价值。

方法: 以2-乙酰氨基芴(2-FAA, 0.05%)喂饲SD大鼠诱发肝癌发生, 观察肝病理组织学(HE染色)改变, 用全基因组芯片分析肝基因表达谱的动态变化, 以巢式逆转录酶链反应扩增gp96基因片段。

结果: SD大鼠在喂饲2-FAA后, 肝细胞在诱癌早期发生颗粒样变性, 中期出现不典型增生, 后期见大量癌巢结节。肝癌发生过程中大鼠肝基因表达谱明显改变, 与对照大鼠比较, 癌变大鼠gp96上调3倍; 诱癌变过程中, 肝组织gp96 mRNA表达明显增加, 变性组, 癌前组和

癌变组的肝组织中gp96基因表达均明显高于正常对照组(90.9%, 100%, 100% vs 16.67%, $P < 0.05$).

结论: 肝细胞癌变过程中基因表达谱明显改变, 其中gp96 mRNA呈过度表达, 其分析有利于肝癌的诊断和预后判断.

关键词: 肝细胞癌; 热休克蛋白gp96; 基因芯片; 巢式逆转录酶链反应

吴信华, 姚登福, 苏小琴, 黄华, 邱历伟, 吴玮. 肝癌基因谱动态表达及HSPgp96异常的临床价值. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 76-80
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/76.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是由病毒、化学致癌物等多病因作用以及经启动、促进、演变等多阶段的发病过程, 因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控, 出现持续增殖而致癌变, 与基因调控和表达密切相关^[1]. 目前在肝癌的早期诊断方面缺乏金标准, 寻找确实有效的肿瘤标志物以尽早发现肝癌并监测其转归一直是肿瘤学研究领域的重要课题. HSP通过多种途径参与细胞生长繁殖, 可与许多癌基因、抑癌基因的产物相互作用, 参与肿瘤细胞周期调控和凋亡, 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2]. 依据分子量的不同可分为HSP70和HSP90等, gp96属于HSP90家族^[3]. gp96在不典型性增生和HCC中的检出率高于HSP70^[4], 但gp96在肝癌发生过程中的动态改变及其机制尚不清楚. 我们以2-FAA诱发大鼠肝癌发生制作动物模型, 以寡核苷酸全基因组芯片技术进行高通量分析肝癌发生发展中的基因动态表达, 重点观察gp96在肝细胞癌变发生过程中的表达特点与改变.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley(SD)大鼠48只, 由南通大学实验动物中心提供, 体质量120-160 g, 随机分为8组, 每组6只. 任选一组为对照组, 其余为实验组(其中一组为备用鼠, 用以替换实验期间死亡鼠). 对照鼠给予一般颗粒饲料; 其余各实验鼠以2-FAA制作的颗粒饲料作恒环境饲养, 按文献[4]方法制备肝癌模型, 每2周处死一组实验鼠和一只对照鼠, 留取部分肝组织作病理学检查(HE染色)及组织匀浆的制备.

1.2 方法

1.2.1 标本与分组: 分别留取实验鼠及对照鼠新鲜肝组织约200 mg混合为癌前病变组、鼠肝细胞癌变组及正常鼠肝组、胎鼠肝组织, 浸泡于RNAlater中, 4℃过夜后再去除最上层液体, -20℃保存.

1.2.2 DNA合成: 以TRIzol法制备肝组织总RNA, 在岛津UV-2201型紫外分光光度计上测定 A_{260} 和 A_{280} 值, 检测RNA纯度并换算总RNA浓度($\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织). 纯化后合成双链cDNA(Affymetrix one-cycle cDNA Synthesis Kit)并纯化, IVT(in vitro transcription)合成cRNA(GeneChip IVT Labeling Kit), 纯化后定量、检测.

1.2.3 杂交与检测: cRNA片段化, 标记后的产物cRNA与表达谱芯片(900505-PART大鼠全基因组芯片, affymetrix公司)进行杂交. 杂交完毕, 将载体上未结合的多余cRNA片段洗去. 最后对载体进行激光共聚焦扫描, 微阵列上各点的荧光强度经过光电倍增管放大和扫描软件的处理后得到各点的信号值. 用GCOS软件进行数据分析处理.

1.2.4 引物设计及基因扩增: 按gp96基因序列(NM001012197), 于第1634-2037号核苷酸之间设计引物, 由上海生工生物技术有限公司合成. 外部引物为gp96-P1: 5'-ACACGGCTTGCTAACTTCT-3'(nt1634 -1653); gp96-P2: 5'-ACTA CAGTCTGCGGT CCAA-3'(nt2018-2037), 产物大小为404 bp. 内部引物: gp96-P3: 5'-GAATCTTCTCCGTTTGTTGA-3'(nt1772-1791); gp96-P4: 5'-TGCTCCCGACTTCTTTAC-3'(nt1935-1954), 扩增产物183 bp. 内参引物, GAPDH-P1: 5'-GGCTGCCATTTGCACTGGCAA-3'和5'-TGCCDTGAGTGGAGTCATACTG-3', 扩增产物为104 bp. 第1阶段PCR以外部引物和cDNA为模板, 扩增程序为: 94℃预变性5 min; 94℃, 30 s; 50℃, 30 s; 72℃, 1 min, 循环38次; 72℃总延伸10 min, 4℃保存. 扩增产物经20 g/L琼脂糖电泳和溴化乙锭染色, 在302 nm紫外光照射下判别扩增结果.

统计学处理 以Stata7.0统计软件进行分析和处理数据, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

2 结果

2.1 诱癌过程中肝病理组织变化特征 在2-FAA诱癌过程中, 大鼠肝细胞在形态学上发生明显变化. 病理组织学检查发现: 在诱癌早期, 肝外

研发前沿
近年发现HSPs与肿瘤发生、发展、生物学行为及其预后有较密切的关系, 与肿瘤增殖实验结果证实, 热休克蛋白与肿瘤增殖存在一定关系, 但在肝细胞性肝癌组织中的表达情况至今尚未见详细报道.

创新盘点

1 成功地制作肝癌动态研究模型, 以最先进的基因芯片技术发现在肝癌发生过程中鼠肝基因表达谱改变情况。

2 以自行设计的巢式RT-PCR法, 对大鼠肝组织中的gp96基因片段进行扩增, 方法检出的最低灵敏度是2 ng/L。

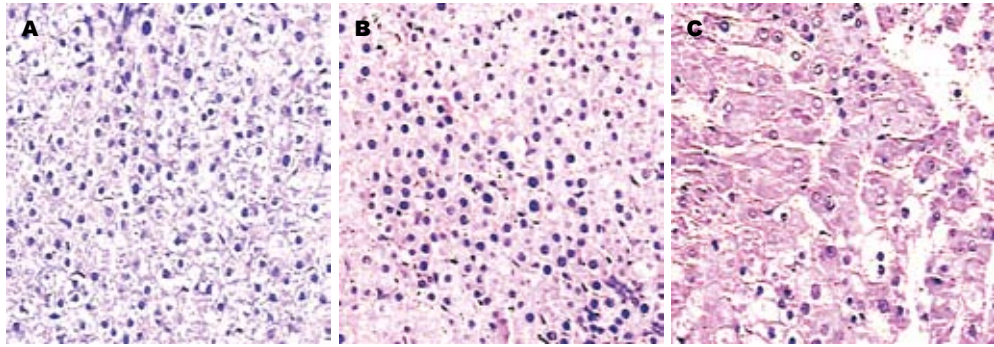


图1 诱癌过程中肝组织病理学变化. A: 早期; B: 中期; C: 后期.

表呈灰黄色, 表面增粗, 肝细胞胞质出现颗粒样变性, 偶见大的异型胞核; 中期阶段, 少数区域有结节形成趋势, 肝板细胞层次增多, 局灶细胞层次超过3层, 细胞核染色质增粗, 核浆比例增大; 在诱癌后期, 可见肝组织结构消失, 肝细胞排列成巢状、粗条索状, 细胞核中等大, 核染色质增粗, 核浆比例增大(图1).

2.2 肝癌形成过程中大鼠基因表达谱的变化 肝组织中制备的总RNA经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, 结果提示从肝癌模型鼠中制备的总RNA质量高, 无降解现象. 肝癌形成过程中大鼠基因表达谱的改变情况见表1, 在所分析的大鼠28 000个基因中, 与正常对照相比, 癌前组1179个基因上调(SR值: Signal Ratio)大于2倍, 268个大于8倍, 癌变组1371个上调大于2倍, 312个大于8倍. 癌变组与正常组比较: 明显改变的基因主要涉及细胞周期相关基因、与信号转导相关基因、肿瘤转移相关基因、凋亡抑制基因、抑癌基因及黏附分子等, 其中包括上调基因gp96, 与正常大鼠比较, 癌变大鼠gp96上调3倍(表1, 表2).

2.3 gp96基因扩增及检测灵敏度 以自行设计的巢式RT-PCR方法, 对大鼠肝癌组织中的gp96基因片段进行扩增. 扩增结果与原设计的基因片段大小一致, PCR终产物为183 bp. 在变性大鼠、癌前及癌变大鼠可检出图谱清晰的gp96基因扩增区带. 取癌变组肝组织总RNA(2 mg/L)分别作 10^2 - 10^7 倍稀释, 经巢式RT-PCR扩增后, 在总RNA为2 ng/L以上时均可见阳性区带(图2).

2.4 诱癌过程中大鼠肝gp96基因扩增 在2-FAA的诱癌过程中, 大鼠肝细胞在形态学上发生明显变化, 在正常对照、变性组、癌前组和癌变组的肝组织中, gp96基因片段的扩增结果明显不同, 其检出率: 变性组为90.9%(20/22), 癌前组和癌变组均为100%, 而正常对照大鼠仅为16.67%(1/6). 在肝细胞发生变性的肝组织中

表1 肝细胞癌变过程中大鼠全基因表达谱比较与分析

分组	基因上调(SR值)		基因下调(SR值)	
	≥8	≥2	≥8	≥2
胎肝与癌前组	292	1149	318	1546
胎肝与癌变组	559	1821	425	2072
胎肝与正常组	483	1439	234	1464
癌前与癌变组	132	1269	116	629
癌前组与正常	268	1179	57	767
癌变组与正常	312	1371	201	1355

gp96基因表达已明显高于正常对照组($P < 0.05$).

3 讨论

HSP是机体细胞在一些应激原诱导下激活HSP基因, 高效表达的具有高度保守性质的一组蛋白质, 与多种蛋白形成复合体, 陪伴蛋白分子在细胞内转运、跨膜, 参与蛋白的折叠与伸展、多聚合体的组装, 发挥其调节靶蛋白的作用, 但又不改变靶蛋白的结构, 故HSPs被称为“分子伴侣”(molecular chaperone)^[5].

肿瘤的发生发展是一个多因素多步骤的过程, 除与细胞增殖失控和细胞分化异常外, 另一重要原因是发生转化的细胞不能正常凋亡. 有文献报道HSP通过影响增殖必需的蛋白的构象而参与细胞周期调节, 这些蛋白包括C-fos、C-myc、src、p53和Rb等^[6]. 此外, HSP还通过抑制凋亡激活基因p53、Bax的表达以及抑制氧自由基的生成而抑制凋亡促进增殖, 参与肿瘤的发生发展过程. 研究发现HSP在某些肿瘤组织中的表达与在正常组织中的表达不同, 并且在某些肿瘤中会出现针对某些HSP的自身抗体. 通过肿瘤组织中HSP或其特异性抗体的测定可对肿瘤进行诊断和风险预报^[7].

基因芯片是指将许多特定的寡核苷酸片段

表 2 与正常组比较, 癌变组明显上调的基因

Accession numbers	protein	SLR(= log ₂ ^{cy5/cy3})
BI274917	Laminin, alpha5	5.9
NM031511	insulin - like growth factor 2	3.8
NM012912	activating transcription factor 3, ATF3	3.6
BG376410	tumor - associated calcium signal transducer 1	3.6
BI289940	hepatoma - derived growth factor related protein3, HDGFRP3	3.2
BG057543	tumor rejection gp96	3
AA963751	tumor necrosis factor receptor superfamily, member17	2.7
BM384099	N - myc downstream regulated gene1	2.2
BG375362	latent transforming growth factor beta binding protein4	2
NM012967	intercellular adhesion molecule1	2
NM013043	transforming growth factor beta1 induced transcript 4	1.7
BE099050	nuclear factor L/B	1.5
NM012493	alpha - fetoprotein	1.4

应用要点
探讨肝细胞癌变过程中基因表达谱的动态变化, 对癌变过程相关基因HSPgp96 mRNA表达状态进行分析, 建立新的既方便, 又易推广, 灵敏度高的肝癌标志物用于肝癌的早期诊断、肝癌发生高危人群的普查、术后肝癌复发或远处转移的监测。

或基因片段有序地高密度地排列固定于支持物上, 待测的样品核酸分子经过标记, 与固定在载体上的DNA阵列中的点按碱基配对原则同时进行杂交. 通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 检测杂交信号强度而获取样品分子的数量和序列信息, 用计算机软件进行数据的比较和分析, 从而对基因序列及功能进行大规模、高通量的研究. Chuma *et al*^[8]对7例早期病例、7例进展期病例及其对应的非肿瘤组织通过基因芯片作比较, 在分析的近12 600基因中, 有95个基因在早期HCC和癌前病变中不同, 有92个基因在早期HCC和进展期HCC中改变. 我们对肝细胞癌变过程中大鼠全基因表达谱尤其gp96基因用芯片技术进行比较分析, 发现在研究的28 000个基因中, 癌前组1179个基因上调大于2倍, 268个大于8倍, 癌变组共有3208个基因上调, 其中1371个上调大于2倍, 312个大于8倍, 涉及细胞周期相关基因、与信号转导相关基因、肿瘤转移相关基因、凋亡抑制基因、抑癌基因及黏附分子等, 其中包括上调基因gp96. 与正常大鼠比较, 癌变大鼠gp96上调3倍. Tanaka *et al*^[9]通过Northern blot分析表明, 与邻近正常肝组织或非HCC患者肝组织相比, HCC中gp96 mRNA上调. 我们通过自行设计的2对引物, 采用了巢式逆转录聚合酶链反应, 通过第一阶段PCR为第二阶段反应探索了条件, 同时也提高了产物的特异性. 结果表明, 正常大鼠gp96 mRNA检出率仅为1/6(16.67%), 变性组为20/22(90.91%), 癌前组该基因的检出率已达100%, 与正常鼠比较均有统计学意义($P < 0.05$). gp96以癌基因的角色参与HCC的发生发展^[10].

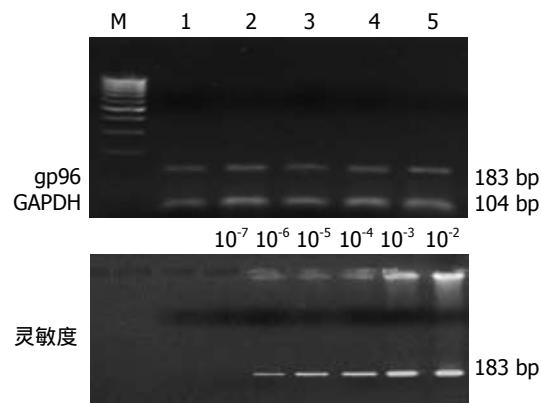


图 2 gp96扩增产物电泳图(上)及灵敏度比较(下).

本研究肝癌模型中, 随着肝细胞癌变的发生, gp96逐渐升高, 虽正常肝组织也有gp96表达, 但癌变肝组织明显过表达, 且在变性组gp96水平已明显上调, 提示gp96表达增高是肝细胞癌变过程中的早期事件.

化学诱癌是一个多阶段过程, 其根本原因在于致癌物诱导的原癌基因的激活和抑癌基因的失活, 可使调控发生异常改变^[11]. 正常细胞中HSP90是受细胞周期调控的, 但在肿瘤细胞中HSP90呈持续的高诱导表达不需要应激, 突变的或不正常的蛋白质的存在刺激HSP90的合成^[12]. gp96为HSP90家族成员, 推测由于致癌剂对肝细胞的毒性作用, 使某些基因发生突变引起的, 刺激gp96表达, 通过gp96的抑制凋亡作用保护细胞促进恶性转化. 肿瘤细胞是增殖旺盛的永生化细胞, 需要更多gp96充当分子伴侣来协助HCC发生发展中相关分子功能的执行. 因此gp96的升高可能是致癌物作用下gp96促进肿

同行评价
本文所有技术先进,方法成熟,有一定的科学性.

瘤发生的结果^[13]. 本文中变性组gp96开始上调,提示gp96可用于HCC的早期诊断^[14].

本文以肝癌模型从基因水平观察肝细胞癌变过程中gp96的动态改变,肝癌发生过程中变性组gp96 mRNA开始增高,癌变组中gp96过表达,提示gp96参与HCC的发生.对高危人群动态监测gp96的变化既有利于HCC的早期诊断,又可用于判断患者的病情变化指导临床用药和预后评估.

4 参考文献

- 1 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- 2 Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858
- 3 Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10: 86-103
- 4 Schueller G, Kettenbach J, Sedivy R, Stift A, Friedl J, Gnant M, Lammer J. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo. *Int J Oncol* 2004; 24: 609-613
- 5 Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1564-1572
- 6 Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 449-464
- 7 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
- 8 Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37: 198-207
- 9 Tanaka K, Kondoh N, Shuda M, Matsubara O, Imazeki N, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Yamamoto N, Yamamoto M. Enhanced expression of mRNAs of antisecretory factor-1, gp96, DAD1 and CDC34 in human hepatocellular carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536: 1-12
- 10 Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2003; 3: 213-217
- 11 Srivastava PK. Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. *Curr Oncol Rep* 2005; 7: 104-108
- 12 Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2072-2079
- 13 Zhu XD, Li CL, Lang ZW, Gao GF, Tien P. Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1141-1145
- 14 Yao DF, Wu XH, Su XQ, Yao M, Wu W, Qiu LW, Zou L, Meng XY. Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 381-386

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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.

Bad、Bax和Bid蛋白表达在非酒精性脂肪性肝炎中的作用

南月敏, 胡云龙, 付娜, 吴文娟

南月敏, 胡云龙, 付娜, 河北医科大学第三医院中西医结合肝病科 河北省石家庄市 050051
吴文娟, 河北医科大学第三医院放射科 河北省石家庄市 050051
河北省自然科学基金资助项目, No. C2006000842
通讯作者: 南月敏, 050051, 河北省石家庄市自强路139号, 河北医科大学第三医院中西肝病科. nanyuemin@163.com
电话: 0311-87027951-2353 传真: 0311-87027232
收稿日期: 2007-07-11 修回日期: 2007-11-24

Novel effect of the proapoptotic proteins Bad, Bax and Bid in non-alcoholic steatohepatitis

Yue-Min Nan, Yun-Long Hu, Na Fu, Wen-Juan Wu

Yue-Min Nan, Yun-Long Hu, Na Fu, Department of Combined Herbal Medicine and Western Medical Hepatology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Wen-Juan Wu, Department of Radiology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2006000842

Correspondence to: Yue-Min Nan, Department of Combined Herbal Medicine and Western Medical Hepatology, the Third Hospital of Hebei Medical University, 139 Ziqiang Road, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. nanyuemin@163.com

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

Abstract

AIM: To explore the effects of expression of the apoptosis-related proteins Bad, Bax and Bid on the progress of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice.

METHODS: Experimental NASH models were established by feeding mice with a high fat, methionine and choline deficient (MCD) diet (MCD group). Control animals were fed a choline-methionine supplemented diet (control group). Hepatic steatosis, inflammation and fibrosis were graded by routine H&E staining in liver sections. The levels of proapoptotic-related proteins, such as Bad, Bax and Bid, were determined by Western blot.

RESULTS: Mice fed the MCD diet exhibited

mild steatosis at day 10, moderate steatohepatitis at week 3 and severe steatohepatitis at week 8, as detected by H&E staining, in parallel with a rise in the levels of transaminases. Hepatic expression of Bad and Bax proteins was more pronounced from day 10, and continued to rise until week 3 and 8 in the MCD group compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Moreover, Bid was activated through hydrolyzation and up-regulated by day 10, week 3 and week 8 ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Combined expression of the proapoptotic proteins Bad, Bax and Bid may be involved in the progression of MCD-induced steatohepatitis.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Apoptosis; Bad; Bax; Bid

Nan YM, Hu YL, Fu N, Wu WJ. Novel effect of the proapoptotic proteins Bad, Bax and Bid in non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 81-85

摘要

目的: 探讨细胞凋亡相关蛋白Bad、Bax和Bid表达在小鼠非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)中的作用。

方法: 采用胆碱-蛋氨酸缺乏、高脂(high fat, methionine and choline deficient, MCD)饮食建立小鼠NASH模型(实验组), 以胆碱-蛋氨酸充足饮食设立对照组。HE染色观察肝脏脂肪变、炎症活动和纤维化程度; 采用Western blot检测Bad、Bax和Bid蛋白表达。

结果: MCD饮食喂养小鼠10 d可见轻度肝脂肪变, 3 wk形成中、重度肝脂肪变及明显的炎性细胞浸润, 8 wk肝脂肪变、肝细胞坏死、炎性细胞浸润加重, 或伴有轻度肝纤维化。血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平随肝损伤加重而进行性升高。10 d、3 wk和8 wk实验组小鼠肝组织Bad和Bax蛋白表达显著高于对照组($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$); 造模10 d实验组小鼠Bid蛋白活

背景资料
随着生活水平的提高, 非酒精性脂肪性肝炎的发病率逐年上升。有关NASH的发病机制的研究成为热点。细胞凋亡在各种肝病的发生中起重要作用, 亦可能为NASH发生及进展的关键因素。

研发前沿
本文建立小鼠NASH模型,着重研究细胞凋亡相关蛋白Bad、Bax和Bid的表达在非酒精性脂肪性肝炎中的作用机制,明确细胞凋亡为NASH发病的重要环节。

化, 10 d、3 wk和8 wk表达均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

结论: MCD饮食可导致小鼠NASH, 诱发细胞凋亡调节蛋白Bad、Bax和Bid表达上调。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 凋亡; Bad; Bax; Bid

南月敏, 胡云龙, 付娜, 吴文娟. Bad、Bax和Bid蛋白表达在非酒精性脂肪性肝炎中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 81-85

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/81.asp>

0 引言

细胞凋亡为急、慢性肝病的主要特征之一, 近年研究发现, 肝细胞凋亡是单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎进展“二次打击”机制中的重要肝损伤表现^[1-3], 与炎症程度和纤维化进展相关。细胞凋亡途径包括内源性和外源性两条途径, 均存在于非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)发生和发展过程中^[4-5]。细胞凋亡受多种凋亡基因调节, 如B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(B-cell lymphoma/leukemia -2 gene, Bcl-2)家族中Bcl-2、Bcl-x_L蛋白具有抗凋亡作用, 而Bad、Bax和Bid等具有促凋亡作用^[6]。目前, 关于Bad、Bax和Bid在NASH发病机制中的作用研究尚少。我们采用高脂、胆碱-蛋氨酸缺乏(high fat, methionine and choline deficient, MCD)饮食建立小鼠NASH模型, 以探讨上述促细胞凋亡基因表达与NASH进展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ C57BL6/J小鼠40只, 周龄7-8 wk, 体质量20-25 g, 购于中国医学科学院实验动物研究所。胆碱-蛋氨酸缺乏的高脂饲料和胆碱-蛋氨酸充足的饲料为ICN生物医学化学药品公司产品。兔抗鼠Bad、Bax和Bid mAb、鼠抗鼠β-actin mAb以及辣根过氧化物酶标记的抗兔、抗鼠多克隆抗体购于Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 造模和采集标本: 按文献报道[2]建立实验模型, 将实验所用40只小鼠随机分为4个实验组和4个对照组, 每组5只。分别采用MCD饲料和胆碱-蛋氨酸充足的饲料喂养2 d、10 d、3 wk和8 wk, 处死小鼠, 留取血清和肝组织标本。部分肝组织经40 g/L甲醛固定, 备做病理切片。其余肝组织采用液氮快速冷冻、-80℃保存, 以备蛋白提取。

表1 两组小鼠血清ALT水平(mean ± SD, n = 5)

分组	ALT(U/L)			
	2 d	10 d	3 wk	8 wk
对照组	29.8 ± 29.6	18.4 ± 6.0	34.8 ± 24.0	65.8 ± 50.0
	136.8 ± 108.2	328.0 ± 71.3	296.8 ± 171.3	470.6 ± 147.7
P	0.0600	<0.0001	0.0023	0.0013

1.2.2 测定ALT: 采用处死实验小鼠的当日血清, 以Olympus AU2700全自动生化分析仪速率法检测, 试剂为日本第一化学药品株式会社产品。

1.2.3 观察肝组织病理学: 石蜡包埋, 常规组织切片(5 μm), HE染色, 光镜下观察肝组织学变化, 参照《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[7]及2001年《病毒性肝炎防治方案》^[8], 肝脂肪变分为4度(F0-4), 炎症活动度分为3级(G0-3), 肝纤维化分为4期(S0-4)。

1.2.4 检测Bad、Bax和Bid蛋白表达和激活水平: 采用Western blot实验, 提取肝组织蛋白匀浆, 以紫外分光光度计(750 nm)测定蛋白浓度。取含60 μg蛋白肝组织匀浆, 变性处理后经120 g/L SDS-PAGE电泳分离, 4℃条件下经2-3 h将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 置膜于含50 g/L脱脂牛奶中(TBST缓冲液稀释)封闭1 h。分别加入特异性兔抗鼠Bad、Bax和Bid mAb(1:500稀释)、鼠抗鼠β-actin mAb及辣根过氧化物酶标记的抗兔、抗鼠多克隆抗体(1:5000稀释)进行免疫反应, 以增强化学发光显色系统显色, 超敏胶片曝光, 以β-actin为内参照。

统计学处理 实验数据以mean ± SD表示, 采用SPSS10.0统计软件进行检验, 数据比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ALT水平和肝组织学 对照组小鼠ALT正常, 肝组织学无异常变化(图1A)。实验组小鼠2 d ALT轻度增高, 肝组织学无明显异常; 造模10 d ALT明显增高, 形成大泡性轻度肝细胞脂肪变(F1, G0-1, S0)(图1B); 随造模时间延长, 至3 wk和8 wk肝脏功能严重受损, ALT显著异常, 肝组织学呈现中、重度肝细胞脂肪变, 分别伴有点状或灶状肝细胞坏死、炎性细胞浸润和不同程度肝纤维化(分别为F2-3, G1-2, S0-1和F3-4, G2-3, S1-2)(表1, 图1C)。

2.2 实验组小鼠Bad、Bax和Bid的表达 实验组小

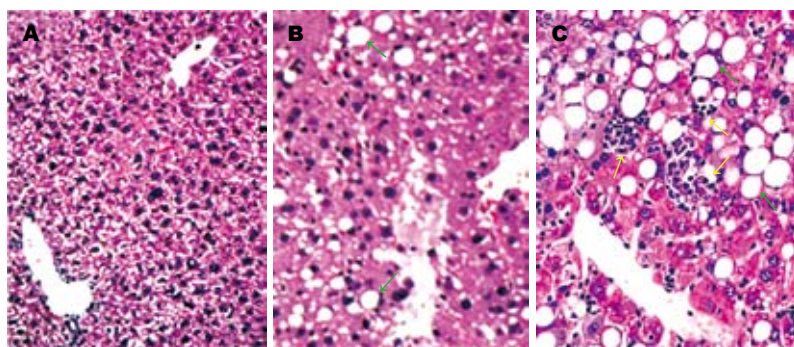


图 1 各组小鼠肝脏组织学改变 (HE200 ×)。A: 对照组; B: 实验组 10 d; C: 实验组 8 wk, 绿箭头示脂肪变肝细胞, 黄箭头示肝细胞坏死及炎性细胞浸润。

创新盘点
 本文所采用的 NASH 动物模型具有复制率高、模型建立迅速、具备人类 NASH 病理特征, 是目前国际公认的最理想的 NASH 动物模型, 可于较短时间内形成以大泡性为主的脂肪肝模型, 并随造模时间延长可进展为脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化等系列病变。

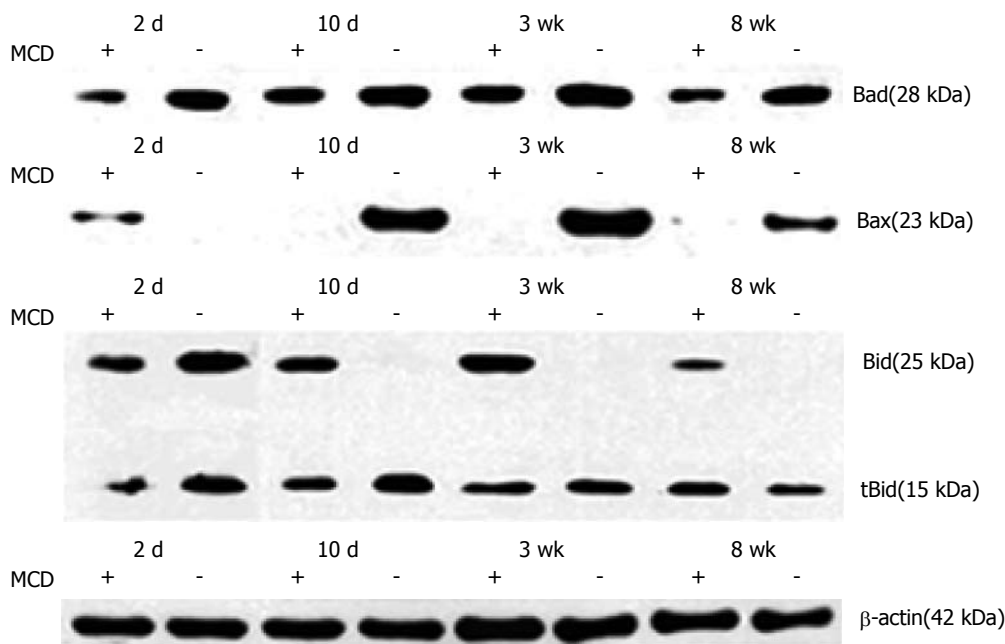


图 2 肝组织Bad、Bax和Bid蛋白表达情况. MCD+: 对照组; MCD-: 实验组。

鼠肝组织Bax和Bad蛋白表达水平于造模 10 d、3 wk 和 8 wk 均高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。实验组小鼠Bid蛋白 10 d、3 wk 和 8 wk 明显活化, tBid蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$), 对照组小鼠Bid蛋白活化不明显 ($P > 0.05$) (图 2-4)。

3 讨论

NASH 为单纯性脂肪肝向肝硬化发展的重要阶段^[9], 建立快速、复制率高的 NASH 模型, 探讨其发病的分子生物学机制, 对阻止单纯性脂肪肝发生脂肪性肝炎以及向肝硬化的进展具有重要意义。本实验采用 MCD 饮食成功诱导 NASH 小鼠模型, 表现为血清 ALT 升高、肝组织学上有肝细胞脂肪变、坏死、炎症细胞浸润或伴有肝纤维化, 且随造模时间的延长肝损伤呈进行性加重。

细胞凋亡是细胞基因调控、维持内环境稳定的一种自主性细胞死亡, 是维持人体正常生

理功能的必需过程, 其中存在由 Bcl-2 家族调节的线粒体凋亡途径^[1]和 Fas-L/Fas 介导的外在细胞凋亡途径^[3]。Bcl-2 家族成员通过形成不同形式同源或异源二聚体对细胞凋亡产生抑制或促进作用。其中 Bax-Bax 同源二聚体诱导细胞凋亡, Bcl-2 通过与 Bax 形成 Bcl-2-Bax 异源二聚体抑制细胞凋亡。因此, Bcl-2 与 Bax 的比例决定细胞凋亡是否发生。Bad 蛋白与 Bcl-x_L 结合作用强于与 Bcl-2 结合, 其功能为通过与 Bcl-x_L-Bax 二聚体中 Bcl-x_L 结合, 置换出游离 Bax, 进一步形成 Bax-Bax 同源二聚体而启动细胞凋亡^[10]。同时, Bid 蛋白经 caspase-8 水解形成活性分子 tBid, tBid 向线粒体转位, 一方面通过激活促凋亡蛋白 Bak 发生寡聚化, 另一方面与 Bax 相互作用使其构象改变而插入线粒体膜, 通过在线粒体外膜形成跨膜通道, 或开启线粒体通透性转换孔 (permeability transition pore, PTP) 引起线粒体跨膜电位下降和细胞色素 C 释放, 进一步激活下游 caspase 级联反

应用要点
本文通过研究细胞凋亡相关蛋白Bad、Bax和Bid表达与NASH进展的关系,明确细胞凋亡在NASH发病中的作用,为进一步探讨抗凋亡治疗延缓NASH发生及进展的作用奠定基础。

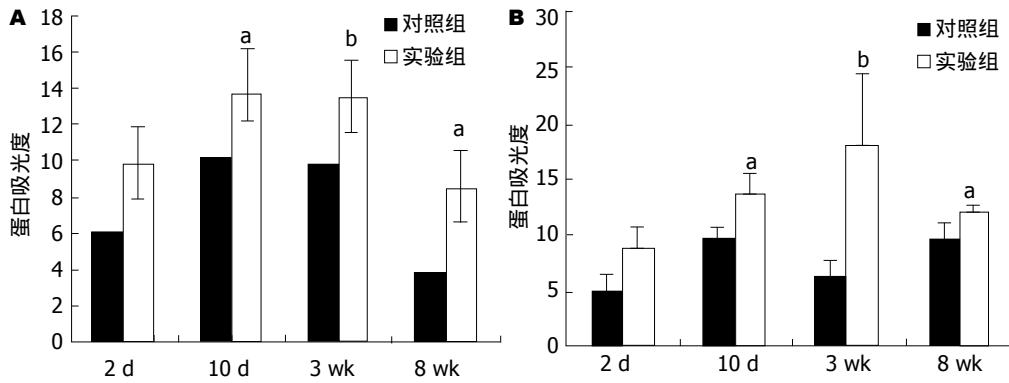


图3 各时间点肝组织Bad和Bax表达变化. A: Bad; B: Bax; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

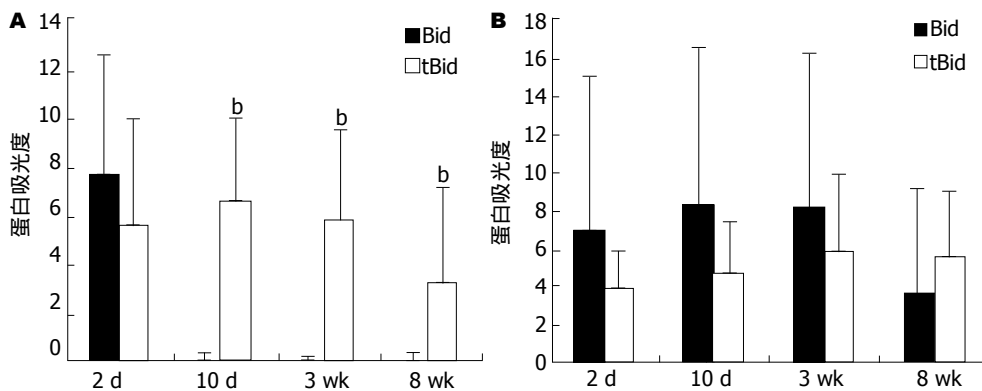


图4 小鼠肝组织Bid与tBid. A: 实验组; B: 对照组; ^b $P < 0.01$ vs Bid.

应导致细胞凋亡^[11-12].

本实验结果显示, MCD饮食喂养小鼠10 d-8 wk, 肝组织Bad和Bax蛋白表达持续增强, Bid蛋白裂解活化, 并随之出现中、重度脂肪肝变, 点、灶状肝细胞坏死和炎症细胞浸润或伴有肝纤维化, 表明Bad、Bax和Bid蛋白的表达上调或活化与肝组织损伤及其进展有关. 上述改变的可能机制为MCD饮食导致肝细胞脂肪变, 沉积的脂质产生过氧化物诱发氧化应激, 产生大量活性氧(reactive oxygen specimens, ROS), ROS的产生可激活Fas-L/Fas系统, 进一步导致Fas致死区结构蛋白募集下游的caspase家族成员, 引起caspase-8活化^[3,13-14]; 氧化应激和活性氧的产生亦可增加TNF- α 的释放, TNF- α 与其受体TNF-R1相互作用亦引起caspase-8活化, 后者水解胞质中的Bid形成活性分子tBid, tBid进入线粒体, 激活Bak及Bax蛋白引起线粒体跨膜电位下降及细胞色素C释放, 进一步激活下游caspase级联反应, 使凋亡信号扩大. 此外, TNF- α 的释放可阻止Bad蛋白的磷酸化, 促进其与Bcl-2、Bcl-x_L蛋白结合而减弱二者与Bax结合的抗凋亡作用, 增强Bax对线粒体的损伤, 加速细胞凋亡^[13,15]. 凋

亡的肝细胞可导致炎症细胞的聚集、枯否细胞吞噬凋亡小体而活化, 释放大量细胞因子, 进一步可激活肝星状细胞导致纤维组织增生.

研究表明, MCD饮食可导致肝细胞脂肪变和氧化应激, 诱发细胞凋亡调节蛋白Bad、Bax和Bid表达上调, 引起线粒体损伤和细胞色素C释放而激活下游caspase级联信号转导通路, 促进肝细胞凋亡, 并导致肝脏炎症和纤维化. 因此, 进一步探讨有效的抗氧化剂和基因调节治疗可能有助于阻止NASH发生及进展.

4 参考文献

- Baskin-Bey ES, Gores GJ. Death by association: BH3 domain-only proteins and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G987-G990
- 南月敏, 吴文娟, 姚希贤, 王蕾. 非酒精性脂肪性肝炎中细胞凋亡及相关基因表达的作用. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 41-46
- 南月敏, 乔梁, 于君, 吴文娟, 姚希贤. Fas及其配体诱导非酒精性脂肪性肝炎肝细胞凋亡. *中华消化杂志* 2006; 26: 848-850
- Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005; 10: 3093-3099
- Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent

- features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
- 6 Uren RT, Dewson G, Chen L, Coyne SC, Huang DC, Adams JM, Kluck RM. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol* 2007; 177: 277-287
- 7 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. *中华肝病杂志* 2003; 11: 72
- 8 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华内科杂志* 2001; 40: 62-68
- 9 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 10 Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. TNF-alpha-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G503-G516
- 11 Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. *J Biol Chem* 2001; 276: 27432-27440
- 12 Molpeceres V, Mauriz JL, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 687-695
- 13 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 1899-1911
- 14 Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-28
- 15 Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277: 14040-14047

同行评价
本文研究内容新颖, 课题设计简单明了, 结论可靠, 有一定的参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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)

pH值监测正常与异常的内镜阳性GERD患者的食管动力学比较

冯桂建, 赵丽莉, 刘玉兰

背景资料
GERD是常见疾病, 通过内镜检查可以分为内镜阳性GERD和内镜阴性GERD。前者包括RE和Barrett's食管, 后者即为NERD。很多研究对RE和NERD的动力学特点进行了比较。

冯桂建, 赵丽莉, 刘玉兰, 北京大学人民医院消化内科 北京市 100044
通讯作者: 冯桂建, 100044, 北京西直门南大街11号, 北京大学人民医院消化内科。fggods@126.com
电话: 010-88325388
收稿日期: 2007-08-10 修回日期: 2007-12-19

Comparison of esophageal motility between patients with endoscope-positive gastroesophageal reflux disease with normal pH and those with abnormal pH

Gui-Jian Feng, Li-Li Zhao, Yu-Lan Liu

Gui-Jian Feng, Li-Li Zhao, Yu-Lan Liu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China
Correspondence to: Gui-Jian Feng, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Peking University, 11 South Street, Xizhimen, Beijing 100044, China. fggods@126.com
Received: 2007-08-10 Revised: 2007-12-19

Abstract

AIM: To compare the esophageal motility between patients with normal pH endoscope-positive gastroesophageal reflux disease (GERD) and abnormal pH endoscope-positive GERD.

METHODS: There were 49 patients with endoscope-positive gastroesophageal reflux disease (GERD). Patients were distinguished into normal and abnormal pH groups, according to the DeMeester Score. Thirty-seven patients were in the abnormal pH group (27 male, 10 female, mean age 56 ± 15 yr), and the remainder were in the normal pH group (eight male, four female, mean age 51 ± 11 yr). Eight patients in the abnormal group suffered from hiatus hernia at the same time.

RESULTS: No significant difference between the two groups in age and sex rate. The mean lower esophageal sphincter pressure (LESP) and

the mean peristalsis amplitude in the middle-down esophagus body and anal lateral esophagus body in the normal pH group were higher than those in the abnormal group ($P = 0.036$, $P = 0.048$, $P = 0.017$). When we analyzed patients with hiatus hernia, the mean peristalsis amplitude of the anal lateral esophagus was higher in the normal pH group than that in the abnormal group ($P = 0.035$).

CONCLUSION: The mean LESP and peristalsis amplitude of middle-down esophagus body and anal lateral esophagus body in the normal pH group were higher than those in the abnormal group. Even when patients with hiatus hernia were not included, the results were close to the whole analysis. This shows why some patients with reflux esophagitis appear normal by esophageal pH monitoring. Stronger clearance ability of esophagus and barrier in the normal pH monitoring group may contribute to the phenomena.

Key Words: Esophageal pH monitoring; Gastroesophageal reflux; Esophageal Motility; Lower esophageal sphincter

Feng GJ, Zhao LL, Liu YL. Comparison of esophageal motility between patients with endoscope-positive gastroesophageal reflux disease with normal pH and those with abnormal pH. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 86-89

摘要

目的: 比较pH监测正常与异常内镜阳型胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)患者在食管动力学上的异同。

方法: 经内镜确诊反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)或Barrett's食管患者共49例, 依据动态pH监测DeMeester积分分为pH监测异常组和pH监测正常组。正常组12例, 异常组37例, 异常组有8名患者伴有裂孔疝, 比较两组患者食管动力的不同。

结果: 两组比较pH监测正常组下食管括约肌

静息压力(Lower esophageal sphincter Pressure, LESp)($P = 0.036$), 食管体部下中点($P = 0.048$)及肛侧收缩幅度($P = 0.017$)高于pH监测异常组. 剔除食管裂孔疝患者后, 食管体部肛侧的收缩幅度仍有明显差异($P = 0.035$).

结论: 监测正常组LESp以及食管体部下中点及肛侧收缩幅度高于监测异常组, 正常组由于其清除功能及屏障功能强于异常组导致反流甚难达到通常pH电极位置, 或达到后很快被清除.

关键词: 食管pH监测; 胃食管反流; 食管动力; 下食管括约肌

冯桂建, 赵丽莉, 刘玉兰. pH值监测正常与异常的内镜阳性GERD患者的食管动力学比较. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 86-89
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/86.asp

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)为常见病, 在西方近有50%的人1年中可以出现某种反流症状, 在我国29.8%的人1年中具有反流症状^[1]. 根据内镜结果, GERD一般分为三种类型, 即非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)、反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和Barrett's食管^[2-3]. NERD虽存在胃食管反流, 但常规内镜无黏膜破损表现, 诊断主要依靠食管pH值动态监测^[4], RE及Barrett's食管为内镜阳性GERD, 诊断依靠普通内镜, 但在RE患者中约有25%^[5]的患者pH值监测正常. 多数研究对RE和NERD进行了比较, 但很少有人根据pH监测结果的不同对内镜阳性GERD进行分类和动力学比较.

1 材料和方法

1.1 材料 北京大学人民医院消化科2005-02/2007-02因反酸烧心等症状就诊, 经胃镜检查确诊为RE或Barrett's食管, 同意进行食管测压及动态24 h pH监测并符合入选标准的患者49例, 男35例, 女14例, 平均年龄 55 ± 14 岁, 测压注水灌注泵, Mui Scientific Mississauga和Ontario由Canada公司生产, 6通道(E6-1-1-5-5-5)测压导管由MMS公司生产. 外置参考电极的重复应用pH铈电极由Synectics Medical公司生产, digitrapper MK III型记录仪及计算机组成由CTD Synectics Medical公司生产, 定标液(pH = 4.0和pH = 7.0), Mettler-Toledo和Urdorf由Switzerland公司生产.

表 1 pH监测正常与异常食管内镜表现

食管内镜表现	pH监测正常组	pH监测异常组
反流性食管炎		
A级	7	14
B级	3	10
C级	1	6
D级	0	3
Barrett's食管	1	4
合并裂孔疝	0	8

1.2 方法

1.2.1 分组: 由Polygram for Windows release 2.04计算患者DeMeester积分, 积分 ≥ 14.72 入pH监测异常组, 积分 < 14.72 者入pH监测正常组. pH监测正常患者共12例(男8例, 女4例, 平均年龄 51 ± 11 岁), pH监测异常患者37例(男27例, 女10例, 平均年龄 56 ± 15 岁). 各组疾病组成情况见表1(反流性食管炎分级参照洛杉矶标准进行分级).

1.2.2 测压及pH检测: 进行测压及pH监测前至少3 d未服用动力药物及抑酸药物, 食管pH监测时间不得少于22 h.

1.2.3 食管测压: 使用牵拉法确定下食管括约肌的位置. 测定下食管括约肌静息压力(lower esophageal sphincter Pressure, LESp)嘱患者吞咽测定松弛率; 向外牵拉测压导管, 以下食管括约肌上缘上3 cm作为食管体部肛侧, 依次相隔5 cm作为食管体部下中段(8 cm)、中上段(13 cm)、口侧(18 cm), 嘱患者作10次吞咽动作, 计算食管体部收缩幅度以及波峰传导速度和收缩波传导速度. 测定结果分析采用UPS2020分析软件.

1.2.4 pH监测: pH电极置于LES上缘上方5 cm, 进行动态pH监测. 患者记录进食、平卧时间以及反流症状时间.

统计学处理 应用SPSS for Windows 13.0完成. 根据数据的不同分别采用独立t检验、卡方检验以及非参数检验. $P < 0.05$ 表示差异具有显著性.

2 结果

两组患者年龄($P = 0.307$)及性别构成比($P = 0.674$)无显著性差异. 监测正常组及异常组平均体质量指数分别为 $24.21 \pm 3.47 \text{ kg/m}^2$ 和 $23.75 \pm 3.36 \text{ kg/m}^2$, 差异无显著性($P = 0.691$). 两组患者在RE及Barrett's食管的疾病构成比差异无显著性($P = 0.676$). 食管裂孔疝患者均出现在pH监测异常组, 但差异不具有显著性($P = 0.078$).

相关报道
国外有学者曾经发现RE患者可以出现pH监测阴性, 但缺乏相关的系统研究.

创新盘点

本文通过对pH监测结果不同的内镜阳性GERD的食管动力学比较,揭示了食管远端清除功能以及抗反流屏障功能的不同可能对pH监测结果造成影响。

表 2 pH监测正常与异常内镜阳性GERD食管动力比较(mean ± SD)

内镜阳性 GERD	LESP (mmHg)	LESR (%)	食管体部蠕动幅度与传导速度(cm/s)					
			肛侧	中下段	中上段	口侧	峰-峰速度	波-波速度
pH监测正常	12 ± 4	80 ± 11	60 ± 28	56 ± 27	38 ± 17	37 ± 24	2.97 ± 0.63	4.05 ± 2.01
pH监测异常 ¹	9 ± 4	84 ± 12	40 ± 27	41 ± 30	34 ± 25	32 ± 16	3.35 ± 8.62	4.06 ± 4.76
pH监测异常 ²	10 ± 4	81 ± 12	41 ± 26	44 ± 32	36 ± 27	34 ± 16	4.19 ± 8.84	4.73 ± 5.02

¹: 包括食管裂孔疝在内的全部pH监测异常者; ²: 不包含食管裂孔疝的pH监测异常者。

2.1 包含食管裂孔疝的两组比较 两组比较除LES松弛率及峰-峰传导速度、波-波传导速度正常组低于异常组外,LESP和食管体部蠕动幅度均正常组高于异常组,但仅有LESP($P = 0.036$)及食管体部中下段($P = 0.048$)和肛侧收缩幅度($P = 0.017$)的差异有统计学意义(表2)。

2.2 剔除食管裂孔疝的两组比较 在剔除食管裂孔疝的患者后,pH监测正常组患者无变化。pH监测异常组患者29例(男22例,女7例,平均年龄 54 ± 14 岁),两组患者年龄($P = 0.296$)及性别构成比($P = 0.545$)无显著性差异。监测异常组平均体重指数 $23.57 \pm 3.19 \text{ kg/cm}^2$,和监测正常组无显著性差异($P = 0.564$)。两组患者在RE及Barrett's食管的疾病构成比无显著性差异($P = 0.818$)。两组除LES松弛率及峰-峰传导速度,波-波传导速度正常组低于异常组外,其余各项均为正常组高于异常组,但食管体部肛侧收缩幅度($P = 0.035$)的差异有统计学意义(表2)。

3 讨论

GERD发病机制^[6]较多,其中RE的发病机制主要为屏障功能下降,NERD和RE相比,大多LESP正常,食管动力障碍多微不足道^[7],酸暴露时间并不占主要地位^[5],主要发病机制可能为内脏的高敏感性^[8]。也有报道NERD和RE患者动力方面并无差异^[9],甚至对RE和GERD的比较进入到超微结构^[10],但是对内镜下符合RE或Barrett's食管表现,而pH监测正常的GERD的研究并不多见。

本研究中共有RE患者44例,其中11例患者pH监测正常,与文献报道[5]的RE25%患者pH监测正常相符合。

LES和膈角被认为是食管下端的内括约肌和外括约肌,为食管的抗酸屏障,LESP的高低为食管屏障功能高低的表現之一,有研究证实,内镜阳性GERD的平均LESP要高于内镜阴性GERD。在本研究中pH监测正常组LESP高于pH

监测异常组,说明监测正常组患者屏障功能强于监测阳性组的患者。

食管体部的蠕动是食管清除功能的表现,特别是食管体部远端蠕动幅度和食管清除功能具有一定关系,较低的蠕动幅度预示食管体部清除功能的不足,我国人群中食管体部动力障碍为GERD的发病的主要因素^[11],也是RE患者复发的原因^[12]。本研究中pH监测正常组患者食管体部中下段及肛侧的蠕动幅度高于异常组,在体部其他部位蠕动幅度相同的情况下,食管体部清除功能强于pH监测异常组。食管的体部的清除功能除和蠕动幅度有关外,还和食管体部收缩传导方式有关,如传导性蠕动、同步性蠕动和脱索性蠕动等相关,这些可以通过患者收缩波的传导速度进行表示,无论是峰-峰传导速度抑或波-波传导速度,本研究中没有发现pH监测正常组和异常组的差异。

较强的屏障功能以及清除功能导致反流甚难达到通常pH电极位置,或达到后由于很快被清除,而不能被系统计算为一次反流事件。这可能是RE或Barrett's食管pH监测正常的可能原因。pH监测电极位置下调^[13]、缩短反流时间的定义或者延长监测时间^[14]可能会有帮助。

食管裂孔疝存在时,膈脚的屏障功能遭到破坏,提高了患者的酸暴露时间,和患者的症状相关^[15-16]。8例食管裂孔疝患者均在pH监测异常组,说明pH监测异常组食管屏障功能及食管体部清除功能低于pH监测正常组,可能与食管裂孔疝的存在有关,但剔除食管裂孔疝患者后,再次分析,pH监测正常组的患者其食管体部肛侧的收缩幅度仍高于监测异常组,说明裂孔疝的存在虽然对pH监测结果可能存在影响,但绝不是唯一的因素。两组患者裂孔疝的构成比不具有显著性差异,可能与研究的例数较少有关。

pH监测正常内镜阳性GERD患者其食管体部的清除功能及抗反流的屏障功能高与pH监测

应用要点

本文发现内镜阳性GERD由于食管动力的不同,可能导致pH监测结果的差异,有利于对pH监测结果的解释,更加符合患者临床所见。

异常组. 这可能是部分内镜阳性GERD患者pH监测正常的原因.

随着科学技术的进步及阻抗技术的应用, 对各种反流的监测均逐步实现, 联合阻抗及pH监测可发现更多的反流^[17]. 此外, 限于条件未能进行TLESRs的监测来进行比较是本研究的一个不足, 不过, 我国人群中GERD的发病的TLESRs的检出同正常健康对照并无区别^[9]. 这些缺点有待进一步的研究弥补.

4 参考文献

- 1 Wong WM, Lai KC, Lam KF, Hui WM, Hu WH, Lam CL, Xia HH, Huang JQ, Chan CK, Lam SK, Wong BC. Prevalence, clinical spectrum and health care utilization of gastro-oesophageal reflux disease in a Chinese population: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 595-604
- 2 Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1901-1909
- 3 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见. *胃肠病学* 2007; 12: 233-239
- 4 DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200
- 5 Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 537-545
- 6 Moayyedi P, Talley NJ. Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 2006; 367: 2086-2100
- 7 Fass R. Erosive esophagitis and nonerosive reflux disease (NERD): comparison of epidemiologic, physiologic, and therapeutic characteristics. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 131-137
- 8 Nagahara A, Miwa H, Minoo T, Hojo M, Kawabe M, Osada T, Kurosawa A, Asaoka D, Terai T, Ohkusa T, Sato N. Increased esophageal sensitivity to acid and saline in patients with nonerosive gastro-oesophageal reflux disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 891-895
- 9 梁学亚, 蓝宇, 贾绮宾, 李笠, 范斌, 王启, 陈海翎. 反流性食管炎和非糜烂性反流病患者酸暴露与食管压力监测结果分析. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 11-14
- 10 张黎明, 刘玉兰, 谢大赫, 倪鹏燕. 反流性食管炎与非糜烂性胃食管反流病超微结构比较. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 344-346
- 11 Wong WM, Lai KC, Hui WM, Hu WH, Huang JQ, Wong NY, Xia HH, Chan OO, Lam SK, Wong BC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux diseases in Chinese--role of transient lower esophageal sphincter relaxation and esophageal motor dysfunction. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2088-2093
- 12 许军英, 谢小平, 侯晓华. 食管运动功能在重度反流性食管炎中的地位. *中华内科杂志* 2005; 44: 353-355
- 13 Pandolfino JE, Lee TJ, Schreiner MA, Zhang Q, Roth MP, Kahrilas PJ. Comparison of esophageal acid exposure at 1 cm and 6 cm above the squamocolumnar junction using the Bravo pH monitoring system. *Dis Esophagus* 2006; 19: 177-182
- 14 Tseng D, Rizvi AZ, Fennerty MB, Jobe BA, Diggs BS, Sheppard BC, Gross SC, Swanstrom LL, White NB, Aye RW, Hunter JG. Forty-eight-hour pH monitoring increases sensitivity in detecting abnormal esophageal acid exposure. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1043-1051; discussion 1051-1052
- 15 van Herwaarden MA, Samsom M, Smout AJ. The role of hiatus hernia in gastro-oesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 831-835
- 16 Abrahão LJ Jr, Lemme EM, Carvalho BB, Alvariz A, Aguero GC, Schechter RB. Relationship between the size of hiatal hernia and esophageal acid exposure time in erosive and non-erosive reflux disease. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 37-40
- 17 Bredenoord AJ, Tutuian R, Smout AJ, Castell DO. Technology review: Esophageal impedance monitoring. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 187-194

同行评价
本文立意新颖, 设计严谨, 实验方法规范, 统计恰当, 结果可靠, 讨论重点突出, 观点明确, 具有较强的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血200例

李坪, 成军, 毛羽, 胡居龙, 蒋煜

背景资料
食管胃底静脉曲张出血, 是肝硬化患者高死亡原因。30年前, 使用内镜下硬化治疗, 鱼肝油酸钠或无水酒精, 取得一定效果。但由于食管溃疡、穿孔等严重并发症, 使其无法广泛推广。随着高清晰的电子内镜诞生, 内镜下治疗食管胃底静脉曲张开始在中国和世界盛行, 但是, 能开展食管胃底静脉曲张活动出血内镜治疗的医院还很少。

李坪, 成军, 毛羽, 胡居龙, 蒋煜, 北京地坛医院内镜室 北京市 100011
通讯作者: 李坪, 100011, 北京市, 北京地坛医院内镜室.
endolp@126.com
电话: 010-64211031-2224
收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-12-20

Endoscopic therapy of 200 patients with acute gastro-esophageal variceal bleeding

Ping Li, Jun Cheng, Yu Mao, Ju-Long Hu, Yu Jiang

Ping Li, Jun Cheng, Yu Mao, Ju-Long Hu, Yu Jiang, Department of Endoscopy, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Correspondence to: Ping Li, Department of Endoscopy, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. endolp@126.com
Received: 2007-07-24 Revised: 2007-12-20

Abstract

AIM: To study endoscopic therapy of acute gastro-esophageal variceal bleeding in 200 patients.

METHODS: We used ligation, sclerosis and embolism under endoscopy to control acute gastro-esophageal varices bleeding in 200 patients.

RESULTS: Four patients died during endoscopic therapy. The hemostasis success rate was 98%. Thirty-two patients died within 2 wk. The total death rate was 16%.

CONCLUSION: The ligation used for esophageal variceal bleeding is better. Embolism was the first choice to treat gastro-esophageal variceal bleeding.

Key Words: Gastro-esophageal varices; Acute bleeding; Endoscopic therapy

Li P, Cheng J, Mao Y, Hu JL, Yu J. Endoscopic therapy of 200 patients with acute gastro-esophageal variceal bleeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 90-93

摘要

目的: 探讨急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉

曲张活动出血的疗效。

方法: 内镜下套扎、硬化和栓塞等治疗手段治疗200例食管贲门胃底静脉曲张活动出血。

结果: 200例食管贲门胃底静脉曲张活动出血患者, 经急诊内镜治疗仅4例术中死亡, 止血成功率98%。术后2 wk内因为各种原因死亡32例, 病死率16%。

结论: 食管静脉破裂出血, 贲门静脉曲张破裂出血, 套扎效果好。胃底静脉曲张出血应首选注射人体组织胶栓塞。

关键词: 食管贲门胃底静脉曲张; 出血; 内镜治疗

李坪, 成军, 毛羽, 胡居龙, 蒋煜. 急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血200例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 90-93
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/90.asp>

0 引言

从人类有门脉高压性疾病(肝炎后和酒精性等)以来, 许多患者因为食管贲门胃底静脉曲张出血而死亡。随着西方现代医学的发展, 诞生了降门脉压力药物(垂体后叶素和生长抑素等)^[1-4]、断流与分流手术^[5]、胃管状静脉栓塞术^[6-7]、经颈静脉肝静脉门静脉支架(TIPS)^[8-10]和三腔二囊压迫^[11]等医疗手段, 食管贲门胃底静脉曲张出血患者得到了较好的治疗。但是, 还是有一部分患者因为各种原因治疗效果不佳, 而且因为不知道出血的具体部位, 误诊误治就不可避免。虽然在70年前发明了纤维内镜, 但是在无内镜下治疗食管贲门胃底静脉曲张出血时, 急诊内镜检查无法实施。近20年随着内镜下套扎、硬化和栓塞等治疗手段的成熟^[12-14], 食管贲门胃底静脉曲张出血急诊内镜医疗干预成为可行。但是, 中国绝大部分医院仍然在患者出血停止后48 h后或更长时间后才进行内镜干预, 许多患者仍然出血不止而死去。北京地坛医院10年前食管贲门胃底静脉曲张出血患者病死率超过30%, 在应用急诊内镜干预和成熟的肝胆外科后, 食管贲

门胃底静脉曲张出血患者病死率降致5%以内。10年内共内镜检查出5000余例不同程度食管贲门胃底静脉曲张患者, 进行内镜治疗的患者超过1000例, 现将其中食管贲门胃底静脉曲张活动出血急诊内镜治疗的200例(1997-10/2007-02)疗效分析如下:

1 材料和方法

1.1 材料 200例患者均来自北京地坛医院1997-10/2007-02门诊及住院患者, 男167例, 女33例。平均年龄46岁。CHILD分级A级30例, B级78例, C级92例。血小板计数(PLT) $<3 \times 10^9/L$ 27例, $<3 \times 10^9/L-10 \times 10^9/L$ 152例, $>10 \times 10^9/L$ 21例, 凝血酶原活动度(PTA) $<20\%$ 19例, 20%-40% 160例, $>41\%$ 21例。食管上段, 中段, 下段出血部位分别为4例, 28例, 59例, 贲门, 胃底前壁和后壁出血分别为42例, 38例, 29例。其中, 82%为乙型肝炎肝硬化患者, 12%为酒精性肝硬化患者, 6%为其他原因性肝硬化患者。16例患者经气管插管在手术室治疗, 9例患者处于昏迷状态, 其余患者在清醒状态下治疗。所用内镜为Olympus XQ10, Olympus Q240标准胃镜(活检通道2.8 cm)、2T胃镜和斜视镜, 注射针为23-25G一次性硬化针, 6-7-10连发套扎器, 纤维蛋白封闭剂, 50 mL/L鱼肝油酸钠、1 mL/L乙氧硬化醇、950 mL/L酒精、德国人体组织胶、法国碘化油、国产人体组织胶。

1.2 方法 内镜检查时, 胃内积血较多, 可先用2T胃镜, 便于清理积血, 保持视野。摇高患者床头侧将患者处于半坐位或坐位暴露食管内视野, 一旦发现食管静脉破口, 果断进行套扎、硬化或栓塞治疗。套扎治疗是对破口或破口起始端血管进行吸引, 将血管及其所在食管黏膜吸引到容积为1 cm³的透明帽内, 用天然橡胶圈结扎透明帽内组织。硬化是对破口或破口起始端血管, 进行血管内注射(950 mL/L酒精2-4 mL或50 mL/L鱼肝油酸钠4-8 mL或由10 mL/L乙氧硬化醇5-10 mL)。栓塞是对破口或破口起始端血管进行血管内注射人体组织胶止血(德国人体组织胶0.5 mL+法国碘化油0.4 mL或国产人体组织胶1-2 mL)。部分治疗后静脉有少许渗血, 表面纤维蛋白封闭剂或无水酒精喷洒。部分患者是用2种方法联合治疗才止血的, 以后者定为有效治疗方法。术后禁食24 h, 再进流食1-2 d, 再进半流食10 d, 复查内镜。

统计学处理 分析采用SPSS12统计分析软件

进行统计学处理。

2 结果

200例食管贲门胃底静脉曲张活动出血患者, 如表1所示的一般情况, 从出血部位来看, 以食管静脉为主, 几乎占50%, 食管静脉出血又以食管下段为主, 为食管中段的2倍, 之间存在统计学差异($P<0.05$), 食管上段少见。胃底静脉曲张破裂出血, 占30%左右, 以胃前壁为主。此200例食管胃底静脉曲张出血患者, 经急诊内镜治疗仅3例术中失血性休克死亡和1例误吸后窒息死亡, 止血成功率98%。根据有效止血方法, 总结不同部位止血方法差别(表1)。术后2 wk内在出血率为5%, 因各种原因死亡32例(表2), 病死率为16%。患者术中出血量最多为4000 mL, 手术最长时间为79 min。患者术前最低血色素为2.6 g/L。具体情况如图1。

3 讨论

从200例食管贲门胃底静脉曲张活动出血部位来看, 以食管静脉出血以食管下段为主, 食管上段少见。胃底静脉曲张破裂出血, 占30%左右, 以胃前壁为主。那么, 在没有太多治疗手段的医院, 进行三腔二囊压迫, 理论上止血有效率70%-80%。

食管静脉破裂出血, 套扎治疗占86%, 硬化和栓塞共占14%。首选套扎治疗原因是其方便, 准确, 可有效减小术中出血量。选择硬化和栓塞治疗的原因, 是因为患者既往食管静脉曲张曾硬化治疗, 食管壁僵硬, 不能套扎治疗, 或者患者有门脉血栓或癌栓, 硬化和栓塞治疗术后不易出血。但是, 在门脉血栓或癌栓的情况下, 若只有套扎有效, 那么仅仅处理出血血管, 通常套扎3-4点。术后2 wk内因再出血而失血性休克的患者, 均为术前不明确有门脉血栓或癌栓, 或者肝脏巨大占位存在的患者。因此, 临床上考虑为食管胃底静脉曲张出血的患者, 在进行内镜治疗前, 一定要超声或CT检查, 明确门静脉通畅与否和有无肝脏巨大占位存在, 避免患者术后大出血死亡。

贲门静脉曲张破裂出血, 套扎效果非常好, 人体组织胶栓塞效果也很好。套扎治疗时, 破口在吸引时会增大, 要把握好套扎时机。即使出现套扎失败, 仍要迅速对出血部位再次套扎。

胃底静脉曲张破裂出血, 内科治疗和三腔二囊压迫效果不佳, 患者死亡风险很大。尤其是

应用要点
本文总结内镜技术治疗食管胃底静脉曲张活动性出血, 有助于临床医生进一步治疗该种疾病。

同行评价
本文资料来源可信, 图片真实清晰, 数据可靠, 值得临床医生推广。

表 1 食管贲门胃底静脉曲张活动出血患者各出血部位不同的止血方法(n)

出血部位	n	套扎	栓塞	硬化	止血成功率(%)
食管上段	4	2	1	1	100
食管中段	28	22	3	3	100
食管下段	59	55	3	1	98.3
贲门	42	42	0	0	100
胃底前壁	38	3	33	2	100
胃底后壁	29	3	24	2	96.6

表 2 急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张出血患者的病死原因(n)

	术中死亡	术后2 wk内死亡
失血休克	3	5
误吸	1	4
肝衰竭	0	8
肾衰竭	0	9
肺部感染	0	4
其他	0	2

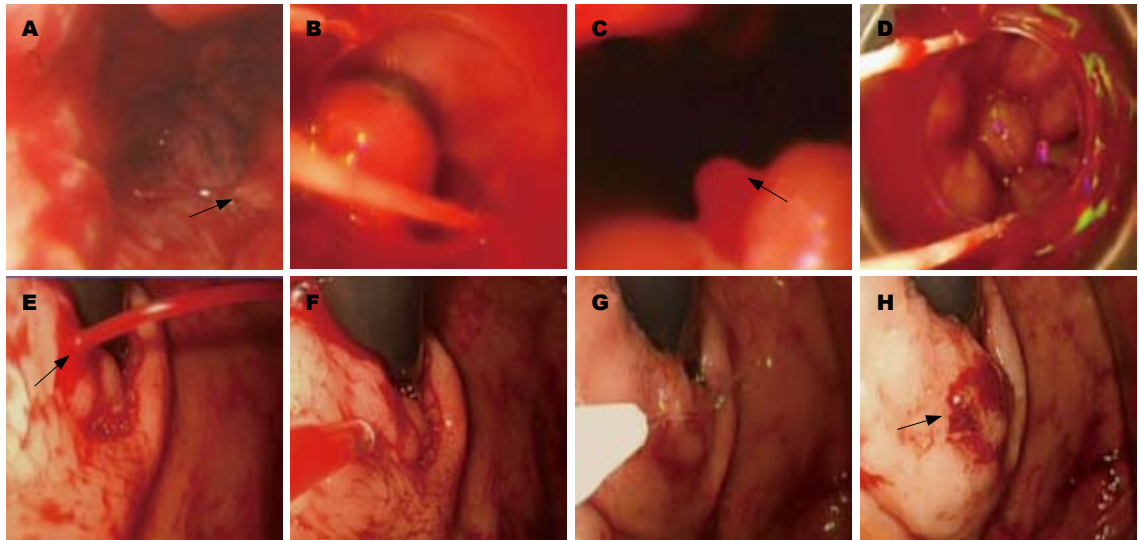


图 1 食管贲门胃底静脉曲张出血内镜/图片: A: 食管静脉出血; B: 套扎后食管静脉止血; C: 贲门静脉出血; D: 贲门静脉停止出血; E: 胃底静脉出血; F: 胃底静脉内注射1.0 mL组织胶; G: 胃底静脉注射点表面950 mL/L酒精2 mL凝固; H: 胃底静脉停止出血。

腹腔内存在大量血凝块时, 内镜视野有限, 需要内镜医师技术十分熟练. 在该67例胃底出血患者中, 以前壁居多, 表明胃底静脉曲张首先从胃底前壁发生. 如果静脉曲张的直径大于8 mm, 套扎治疗后再出血风险很大. 如果进行了套扎治疗, 应在术后24-48 h内进行介入或外科手术. 胃底静脉曲张出血首先注射人体组织胶栓塞, 组织胶量原则是宁多勿少, 一般单点1.0 mL. 有时同一血管分3点注射, 才能取得止血效果. 组织胶最大风险是堵内镜钳道和遮挡视野, 一定要备2条内镜进行操作. 斜视镜用于胃底注射有一定优势, 但是出针后, 视野有一点被阻挡. 如果出血的血管隆起不明显, 注射组织胶不易准确注射于血管内, 难以止血. 术中1例失血性休克死亡的患者为该原因.

术中失血性休克死亡的另1例患者, 是因为食管下段有憩室, 三腔二囊治疗失败, 内镜进入食管内没有视野, 无法进行内镜止血, 导致迅速休克死亡. 另外2例术中失血性休克死亡的患者,

考虑为心跳骤停. 抢救此类患者时输血输液的速度很重要, 静脉曲张出血速度在100 mL/min, 补液速度应与之相当.

在早期急诊内镜治疗的患者误吸率较高, 术中窒息死亡1例, 术后造成严重肺部感染而死亡4例. 后期经气管插管麻醉后进行内镜操作, 不仅减少了误吸, 而且内镜操作时患者胃肠蠕动明显减弱, 增加了手术成功率, 减少手术时间. 由于大量失血, 部分患者术后内科治疗输血不够, 导致肝肾功能衰竭死亡的患者占8.5%. 其他死于肺部或腹腔严重感染的患者也占3%. 术后2 wk内在出血率为5%, 其中一半失血性休克死亡, 表明术后要积极采取进一步预防出血的措施. 比如, TIPS和胃冠状静脉栓塞也是止血的好方法, 而且内镜治疗后再做介入治疗, 其疗效甚至可超过断流手术的效果.

食管胃底静脉曲张内镜治疗术中, 每一分钟患者均有100-120 mL的失血可能, 所以争取时间非常关键, 最好有2-3名熟练的护士. 止血成功

后, 适当清理胃内积血, 为术后判断有无再出血做好基础。

内镜下治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血, 风险大, 但是通过内镜医师的努力, 更多患者可康复。

4 参考文献

- 1 李迎春, 王萍, 周红, 李爽. 两种剂量生长抑素序贯治疗静脉曲张破裂反复大出血. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1632-1634
- 2 Vlachogiannakos J, Kougioumtzian A, Triantos C, Viazis N, Sgouros S, Manolakopoulos S, Saveriadis A, Markoglou C, Economopoulos T, Karamanolis DG. Clinical trial: The effect of somatostatin vs. octreotide in preventing post-endoscopic increase in hepatic venous pressure gradient in cirrhotics with bleeding varices. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1479-1487
- 3 Prelipcean CC, Sporea I, Mihai C, Gogălniceanu P, Drug VL. Variceal upper digestive bleeding--an ever new complication in liver cirrhosis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2007; 111: 19-26
- 4 Wechowski J, Connolly M, Woehl A, Tetlow A, McEwan P, Burroughs A, Currie CJ, Bhatt A. An economic evaluation of vasoactive agents used in the United Kingdom for acute bleeding oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Curr Med Res Opin* 2007; 23: 1481-1491
- 5 Habib A, Sanyal AJ. Acute variceal hemorrhage. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2007; 17: 223-252
- 6 Hiraga N, Aikata H, Takaki S, Kodama H, Shirakawa H, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Tanaka S, Kitamoto M, Chayama K. The long-term outcome of patients with bleeding gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol* 2007; 42: 663-672
- 7 Lo GH, Liang HL, Chen WC, Chen MH, Lai KH, Hsu PI, Lin CK, Chan HH, Pan HB. A prospective, randomized controlled trial of transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus cyanoacrylate injection in the prevention of gastric variceal rebleeding. *Endoscopy* 2007; 39: 679-685
- 8 Li CQ, Xu DH, Xu DZ, Li HL, Chu JG, Li XM, Ma Y, Jing QH. Use of direct portal vein puncture portography with modified TIPS treatment in patients with portal hypertension and gastroesophageal varices bleeding. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 403-406
- 9 Plevris JN, Hayes PC. Treating bleeding oesophageal varices with vasoactive agents: good value for money? *Curr Med Res Opin* 2007; 23: 1745-1747
- 10 秦建平, 蒋明德, 曾维政, 邓旦, 徐辉, 吴晓玲, 汪庆华, 顾明. 经颈内静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门脉高压症56例. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1420-1424
- 11 Krag AA, MÅller S, Bendtsen F. Treatment of bleeding from oesophageal varices in patients with cirrhosis. *Ugeskr Laeger* 2007; 169: 2753-2758
- 12 Palmer K. Acute upper gastrointestinal haemorrhage. *Br Med Bull* 2007; 83: 307-324
- 13 Pavlović AR, Krstić M, Djuranović S, Popović D, Jovanović I, Culafić Dj, Mijalković N, Krstić S, Milosavljević T, Pesko P. Bleeding oesophageal varices--therapeutic options. *Acta Chir Jugosl* 2007; 54: 139-144
- 14 Thabut D, Bernard-Chabert B. Management of acute bleeding from portal hypertension. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 19-29

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2008-01-08)

胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性的变化

李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉

背景资料
MSI是肿瘤常见的遗传学改变之一, 在肿瘤的形成中起重要作用, 目前研究表明, MSI与肿瘤的早期诊断, 浸润, 分期, 转移, 病理类型和预后等有关。

李异玲, 付宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
周立平, 中国医科大学附属第一医院检验科 辽宁省沈阳市 110001
王轶淳, 中国医科大学附属第一医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110001
辽宁省自然科学基金资助项目, No. 2006225007-4
通讯作者: 李异玲, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科. lyl-72@163.com
收稿日期: 2007-08-28 修回日期: 2007-12-17

Changes in microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions

Yi-Ling Li, Li-Ping Zhou, Yi-Chun Wang, Bao-Yu Fu

Yi-Ling Li, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li-Ping Zhou, Department of Laboratory, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yi-Chun Wang, Department of Endoscopy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of Liaoning, No. 2006225007-4

Correspondence to: Dr. Yi-Ling Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lyl-72@163.com

Received: 2007-08-28 Revised: 2007-12-17

Abstract

AIM: To investigate changes in microsatellite instability (MSI) in gastric cancer and precancerous lesions.

METHODS: DNA was extracted by the method of saturated sodium chloride. MSI was detected by PCR-SSCP denaturing PAGE and silver staining, microsatellite stability (MSS), low-frequency MSI (MSI-L) and high-frequency MSI (MSI-H) were evaluated via the international MSI workshop-recommended standard.

RESULTS: According to the international MSI workshop recommended standard, the total positive rate of MSI was 13.3% in atrophic gastritis, 16.7% in intestinal metaplasia, 23.3% in atypical hyperplasia, 30% in early stage gastric cancer,

and 40% in advanced stage gastric cancer. There were differences between three kinds of precancerous lesions and gastric cancer (χ^2 was 4.364, 2.522 and 3.089, respectively, $P < 0.05$). There was no difference between early and advanced stage gastric cancer (χ^2 was 0.071). The positive rate of MSI in well-differentiated adenocarcinoma was higher than that in poorly differentiated adenocarcinoma (χ^2 was 4.022, $P < 0.05$).

CONCLUSION: MSI is an early molecular marker in the pathogenesis of gastric cancer. The malignant degree of MSI positive gastric cancer may be low.

Key Words: Gastric cancer; Microsatellite instability; Method of saturated sodium chloride

Li YL, Zhou LP, Wang YC, Fu BY. Changes in microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 94-97

摘要

目的: 探讨胃癌及癌前病变中微卫星不稳定(MSI)的变化。

方法: 饱和氯化钠法提取组织DNA, PCR-SSCP变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测MSI, 根据规定标准来判定microsatellite stable(MSS), low frequency MSI(MSI-L)和high-frequency MSI(MSI-H), 计算总MSI率。

结果: MSI在萎缩性胃炎, 肠上皮化生, 不典型增生, 早期胃癌和进展期胃癌中检出率分别为13.3%、16.7%、23.3%、30%和40%, 三种癌前期病变和早期胃癌之间有显著差异(χ^2 值分别为4.364、2.522、3.089, $P < 0.05$), 早期胃癌与进展期胃癌没有显著差异(χ^2 值为0.071 $P > 0.05$), 高分化腺癌中MSI的阳性率明显高于低分化腺癌(χ^2 值为4.022, $P < 0.05$)。

结论: MSI是胃癌发生中的早期分子标志, 其阳性的胃癌恶性程度相对较低。

关键词: 胃癌; 微卫星不稳定; 饱和氯化钠法

李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉. 胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性的变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 94-97
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/94.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 居我国消化道恶性肿瘤之首, 其发病率男性为39.2-62.0/10万, 女性为19.1-24.8/10万, 死亡率为17.3/10万, 因此研究其发病机制, 提供有效的早期诊断和治疗策略具有重大意义. 在胃癌的发生中, 从正常胃黏膜上皮转化成癌是一个多步骤的过程, 他涉及到多种癌基因、抑癌基因、端粒及端粒酶、细胞黏附因子和DNA错配修复基因等的异常和积累, 其中错配修复基因功能的失活会导致微卫星小体(MS)重复序列的不稳定, 即微卫星不稳定(MSI). 本研究旨在探讨胃癌及癌前期病变中微卫星不稳定性的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学2006-2007年胃镜中心活检标本, 萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及对应的正常胃黏膜各30例, 年龄范围38-72(平均年龄58)岁, 男女比例2.21:1(62/28). 收集同期肿瘤外科术后大体标本, 早期胃癌及进展期胃癌各30例, 所有患者术前均未进行化疗或放疗, 年龄范围36-68(平均年龄54)岁, 男女比例2.33:1(63/27). 上述标本均经OCT包埋固定, 立即置于液氮罐中, 并置于-70℃冰箱中永久保存.

1.2 方法

1.2.1 饱和氯化钠法提取组织DNA: 取标本组织10 g捣碎, 加入100 mL/L的SDS 50 μ L, 20 g/L蛋白酶K 5 μ L, TE液(pH8.0)定容至500 μ L, 37℃水浴过夜后, 加入1/3体积饱和氯化钠, 4℃静置10 min, 10 000 g离心10 min, 抽取上清液, 加入等体积氯仿混匀抽提, 10 000 g离心10 min, 取上清液, 加入100 mL醋酸钠(3 mol, pH5.6), 70 μ L异丙醇沉淀, 弃上清, 保留沉淀出的DNA, 用700 mL/L乙醇洗脱两次, 37℃烤箱中干燥10 min根据沉淀的量, 加入TE液100-200 μ L溶解, 置于-20℃冰箱中保存备用.

1.2.2 PCR-SSCP方法检测MSI: 我们选择BAT26, D2S123, D5S346, D17S799和D18S34作为微卫星标志点, 上述引物由北京奥科公司合成, 引物序列见表1. 反应体积为20 μ L, 含引物2 μ mol, 10 \times buffer 2 μ L(含Mg²⁺ 1.5 mmol/L), dNTP 200 mmol/L, Taq DNA聚合酶2单位, 基因组DNA

100 ng. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 40 s, 72℃ 30 s, 进行32个循环, 72℃延伸10 min. PCR产物按1:5与变性缓冲液混合(950 mL/L甲酰胺、20 mmol/L EDTA, 2.5 g/L溴酚兰), 97℃变性10 min后立即置于冰水中, 160 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳4 h(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺 29:1, 含7 mol/L尿素), 电泳后的凝胶置于100 mL/L乙醇中内固定10 min以上, 0.018 mmol/L HNO₃处理20 min, 水洗3次, 每次1 min, 12 mmol/L AgNO₃染色2次, 每次10 min, 水洗2次, 每次1 min, 2.83 mmol/L Na₂CO₃, 0.06 g/L甲醛显影液显影10 min, 100 mL/L乙酸固定10 min以上, 水洗3次, 每次5 min, 玻璃纸封胶, 固定, 干燥.

统计学处理 应用SPSS软件对实验数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有显著差异.

2 结果

与正常组织相比, 胃癌及癌前期病变组织有额外的DNA等位片段或出现等位片段泳动, 即可判断为MSI. 其中1个位点发生MSI为MSI-L, 2个或2个以上位点发生MSI为MSI-H, 没有MSI发生为MSS. 胃癌及癌前期病变中MSI的检出结果见表2, 若将5个位点综合分析, 其MSI阳性率见表3.

3 讨论

MS是一种散布于人类全基因组中的简单串联的核苷酸重复序列, 多存在于非编码区内, 通常为1-6个碱基对的15-30个重复单位. 微卫星小体有1, 2, 3和4个重复核苷酸序列等多种形式, 常见的有(A)_n和(CA)_n重复. MS约占真核基因组的5%, 人类基因组大约有50 000-100 000个CA/GT重复序列, 发生突变的频率为10⁻³-10⁻⁵.

MSI是肿瘤常见的遗传改变之一, 在肿瘤的形成中起重要作用, 是肿瘤形成的一个机制. 从基因水平看, MS做为基因变异和重排的来源, 可能在肿瘤-基因调控中起重要作用^[1-3]. 目前研究结果表明, MSI与肿瘤的早期诊断、浸润、分期、转移、病理类型和预后等有关. MSI阳性表达见于肺癌, 乳腺癌, 胃癌, 结肠癌, 泌尿系统肿瘤, 白血病, 子宫内膜癌, 卵巢癌和胶质瘤等多种肿瘤中^[4-7]. 由于应用PCR-SSCP技术检测MSI的方法简单, 结果可靠, MSI目前已经成为基因领域预测肿瘤发生, 早期诊断, 判定分期及预后的有效手段. 但由于不同研究选择标志物的数量及位点的不同, MSI-H和MSI-L判定标准的不同, 使得研究结果有很大的差异. 目前国际MSI

创新盘点

本文应用PCR-SSCP方法, 选用同样的微卫星标志物, 同样的判定标准, 探讨胃黏膜癌变过程中MSI的动态变化, 结果表明MSI是胃癌发生中的早期分子标志, 其阳性的胃癌恶性程度相对较低.

应用要点
通过检测MSI, 可以早期诊断胃癌, 判断预后.

表 1 微卫星位点及引物序列

位点	位置	引物序列
BAT26	2p ¹⁶ - 2p ¹⁶	p ₁ TGACTACTTTTGACTTCAGCC p ₂ AACCATTC AACATTTTAAACCC
D2S123	2p ²¹ - 2p ¹⁶	p ₁ AACAGGATGCCTGCCTTTA p ₂ GGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	5q ²¹ - 5q ²²	p ₁ ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG p ₂ CAGATAAGACAGTATTACTAGTT
D17S799	17p ^{ter} - 17p ^{ter}	p ₁ ATTGCCAGCCGTCAGTT p ₂ GACCAGCATATCATTATAGACAA
D18S34	18q ^{12.2} - 18q ^{12.3}	p ₁ CAGAAAATTCTCTCTGGCTA p ₂ CTCATGTTCTGGCAAGAAT

表 2 胃癌及癌前期病变中MSI的检出(n = 30)

病变	BAT26	D2S123	D5S346	D17S799	D18S34
萎缩性胃炎	1	1	0	1	2
肠上皮化生	2	0	1	1	2
不典型增生	3	2	1	2	1
早期胃癌	7	6	6	8	7
进展期胃癌	6	8	4	7	9

表 3 胃癌及癌前期病变中MSI的表达(%)

病例	n	MSS	MSI-L	MSI-H	总MSI率
萎缩性胃炎	30	26	10(3/30)	3.3(1/30)	13.3
肠上皮化生	30	25	13.3(4/30)	3.3(1/30)	16.7
不典型增生	30	23	13.3(4/30)	10(3/30)	23.3
早期胃癌	30	19	10(3/30)	26(8/30)	30
进展期胃癌	30	18	10(3/30)	30(9/30)	40
高分化腺癌	32	15	15.6(5/32)	37.5(12/32)	53.1
低分化腺癌	12	8	16.6(2/12)	16.6(2/12)	33.3

工作站推荐一组检测微卫星标志物至少应为5个, 其中有 ≥ 2 个标志物发生MSI时为MSI-H, 1个标志物发生MSI时为MSI-L, 没有MSI发生为MSS^[8]. 随着对不同肿瘤标志物选择及判定标准的统一, MSI与肿瘤发生的关系也将进一步明确. 目前研究表明, MSI阳性与MSI阴性的肿瘤可能存在不同的机制, 其中胃癌发生MSI变异频率是最高的, 高于其他任何一种散发性癌, 具体原因不清^[9]. 关于MSI与胃癌的关系国内外研究的较多, 结果也很不一致. Vauhkonen *et al*^[10]研究认为MSI阳性的胃癌具有低浸润、预后好的特点, 并且在肠型胃癌的阳性率高于弥漫型胃癌. Hasuo *et al*^[11]研究发现早期胃癌行内镜下切除术后, MSI的检测可作为评判肿瘤复发的标志. 关于MSI与癌前病变的关系, 国内外相关研究较少. Hamamoto *et al*^[12]通过9个微卫星位点的研究, 结果表明, 胃癌组织中MSI阳性率为46.7%, 癌旁肠化组织MSI阳性率为26.7%. Roa *et al*^[13]研究表明在慢性胃炎无癌变的肠化组织中MSI的表达率为59%, 我们根据国际MSI工作站的推荐选择5个MSI标志物, 根据上述的标准进行判定, 其结果表明, 萎缩性胃炎MSI总的阳性率为13.3%, 其中10%为MSI-L; 肠上皮化生中MSI阳性率为16.7%, 13.3%为MSI-L; 不典型增生组MSI总的

检出率为23.3%, 其中13.3%为MSI-L; 在胃癌患者中, MSI总的阳性率为40%, 10%为MSI-L, 30%为MSI-H. 上述研究结果表明: MSI在萎缩性胃炎及肠上皮化生等癌前期病变阶段就开始出现, 并且其在癌前期病变的表达阳性率与胃癌比有显著差异($P < 0.05$), 说明MSI是胃癌发生的早期事件之一. 关于MSI与胃癌分化的关系, 文献报道不尽一致, Tajima *et al*^[14]研究发现MSI的表达与HGM, MUC6相一致, 在高分化腺癌中的阳性率显著高于低分化腺癌. Mizoshita *et al*^[15]发现低分化腺癌MSI发生率高于高分化腺癌, MSI与胃癌的浸润转移关系密切. 本研究结果表明, 高分化腺癌中MSI的阳性率明显高于低分化腺癌($P < 0.05$), 提示MSI阳性胃癌恶性程度可能相对较低.

本研究结果提示MSI是胃癌发生过程中常见的改变, 因此检测MSI有可能成为胃癌早期诊断以及判断预后的有效手段.

4 参考文献

- 1 Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient

- tumors. *Cancer Biomark* 2006; 2: 69-86
- 2 Cervantes A, Rodriguez Braun E, Perez Fidalgo A, Chirivella Gonzalez I. Molecular biology of gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 208-215
 - 3 Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 729-737
 - 4 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
 - 5 Rosen DG, Cai KQ, Luthra R, Liu J. Immunohistochemical staining of hMLH1 and hMSH2 reflects microsatellite instability status in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 1414-1420
 - 6 Sawhney MS, Farrar WD, Gudiseva S, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Microsatellite instability in interval colon cancers. *Gastroenterology* 2006; 131: 1700-1705
 - 7 Pizzi C, Di Maio M, Daniele S, Mastranzo P, Spagnoletti I, Limite G, Pettinato G, Monticelli A, Cocozza S, Contegiacomo A. Triplet repeat instability correlates with dinucleotide instability in primary breast cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 193-199
 - 8 Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, Iacosozi-Dononue C, Carethers JM, Goel A, Boland CR, Giardiello FM. Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer* 2005; 116: 914-919
 - 9 Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, Spencer S, Wegrynowski T, Mitchell K, Hay K, Redston M, Holowaty E, Huntsman D, Pollett A, Riddell R, Gallinger S. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. *J Mol Diagn* 2005; 7: 465-477
 - 10 Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 651-674
 - 11 Hasuo T, Semba S, Li D, Omori Y, Shirasaka D, Aoyama N, Yokozaki H. Assessment of microsatellite instability status for the prediction of metachronous recurrence after initial endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 89-94
 - 12 Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, Tahara E. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 1997; 50: 841-846
 - 13 Roa JC, Villaseca MA, Roa I, Araya JC. Genetic changes in chronic gastritis: study of microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Rev Med Chil* 2003; 131: 1365-1374
 - 14 Tajima Y, Yamazaki K, Makino R, Nishino N, Aoki S, Kato M, Morohara K, Kaetsu T, Kusano M. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6469-6479
 - 15 Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E, Nakamura S, Nakamura T, Yamamura Y, Tatematsu M. Microsatellite instability is linked to loss of hMLH1 expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer* 2005; 8: 164-172

同行评价
本文应用方法先进, 科学性强, 结论明确, 对临床工作具有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 12 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 2007年1-12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1-12月份共收稿2628篇, 其中国内稿件980篇, 占37%; 国外稿件1648篇, 占63%; 退稿1052篇, 退稿率为40%。(常务副主任: 刘晔 2007-01-08)

内镜下射频消融联合药物治疗幽门螺杆菌阴性的成熟型疣状胃炎56例

王志红, 石振旺, 姚莉

背景资料
疣状胃炎病因尚未明确, 研究认为, 疣状胃炎有较高的基因P21^{ras}和CEA的表达水平, 是一种具有一定转化趋势的胃黏膜慢性增生性病变, 与胃癌有相关性。在临床实践中, 研究者发现成熟型疣状胃炎治愈难, 尤其是H pylori阴性的成熟型疣状胃炎用抑制胃酸分泌和胃黏膜保护剂只能缓解患者的临床症状, 难以治愈胃黏膜隆起病变, 故希望能探索一种内镜下热疗联合药物治疗的方法从组织病理学层面彻底治愈H pylori阴性的成熟型疣状胃炎。

王志红, 石振旺, 姚莉, 合肥市第二人民医院消化内科 安徽省合肥市 230011
通讯作者: 王志红, 230011, 安徽省合肥市和平路246号, 合肥市第二人民医院消化内科. wangzhihong1956@126.com
电话: 0551-2203729
收稿日期: 2007-10-13 修回日期: 2007-12-17

Radio-frequency ablation combined with drug therapy for mature verrucosa gastritis without *Helicobacter pylori* infection: an analysis of 56 cases

Zhi-Hong Wang, Zhen-Wang Shi, Li Yao

Zhi-Hong Wang, Zhen-Wang Shi, Li Yao, Department of Gastroenterology, Hefei Second People's Hospital, Hefei 230011, Anhui Province, China
Correspondence to: Zhi-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Hefei Second People's Hospital, 246 Heping Road, Hefei 230011, Anhui Province, China. wangzhihong1956@126.com
Received: 2007-10-13 Revised: 2007-12-17

Abstract

AIM: To discuss the clinical value of radio-frequency ablation (RFA) combined with cimetidine and Weifuchun for mature verrucosa gastritis without *Helicobacter pylori* infection.

METHODS: A total of 112 patients with mature verrucosa gastritis without *H pylori* infection were randomly divided into a treatment and a control group. The treatment group received RFA followed by cimetidine (800 mg, *quaque nocte*) for 30 d and Weifuchun (four pieces, three times daily, *ante cibum*) for 90 d. The control group were only administered the same drugs without RFA. All patients were checked by gastroscopy immediately and 1 year after treatment, to observe the recovery, total effectiveness and relapse rate.

RESULTS: The recovery and total effectiveness of the treatment group were significantly higher than those of the control group (77.8% vs 45.5%,

$P < 0.01$; 98.1% vs 83.7%, $P < 0.05$). The relapse rate after 1 year in the treatment group was significantly lower than that in the control group (2.4% vs 48.0%, $P < 0.01$). There was a significant difference between the two groups.

CONCLUSION: RFA combined with cimetidine and Weifuchun is safe and effective for the treatment of mature verrucosa gastritis without *H pylori* infection.

Key Words: Mature verrucosa gastritis; Radiofrequency ablation; Cimetidine; Weifuchun

Wang ZH, Shi ZW, Yao L. Radio-frequency ablation combined with drug therapy for mature verrucosa gastritis without *Helicobacter pylori* infection: an analysis of 56 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 98-100

摘要

目的: 探讨内镜下射频消融联合西咪替丁和胃复春治疗幽门螺杆菌(*H pylori*)阴性的成熟型疣状胃炎的临床应用价值。

方法: 对符合标准确诊为H pylori阴性的成熟型疣状胃炎患者112例随机分为治疗组和对照组, 治疗组先采取胃镜下射频消融治疗, 将隆起病变灼平, 然后服用西咪替丁800 mg/次, 1次/d, 晚上睡前服, 连服30 d, 胃复春4片, 3次/d, 饭前服, 连服90 d, 对照组不予射频消融治疗, 用药同治疗组, 两组均于疗程结束及随访1年后分别复查胃镜以观察治愈率, 总有效率和复发率。

结果: 治疗组的治愈率, 总有效率明显高于对照组(77.8% vs 45.5%, $P < 0.01$; 98.1% vs 83.7%, $P < 0.05$); 治疗组的1年复发率明显低于对照组(2.4% vs 48.0%, $P < 0.01$), 两组间有显著性差异。

结论: 内镜下射频消融联合西咪替丁和胃复春治疗H pylori阴性的成熟型疣状胃炎是一种有效, 安全的方法。

关键词: 成熟型疣状胃炎; 射频消融; 西咪替丁; 胃复春

王志红, 石振旺, 姚莉. 内镜下射频消融联合药物治疗幽门螺杆菌阴性的成熟型疣状胃炎56例. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 98-100
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/98.asp

0 引言

疣状胃炎又称痘疹样胃炎, 1990年悉尼会议又将其定义为隆起糜烂性胃炎, 临床上依据其内镜下表现和病变, 经过药物治疗是否易于消失分为未成熟型(消失型)和成熟型(持续型)^[1]. 对成熟型疣状胃炎药物治疗疗效差, 尤其幽门螺杆菌(*H pylori*)阴性的病例药物治疗只能改善临床症状, 难以消除胃黏膜疣状隆起病变. 2004-06/2007-06我们采取内镜下射频联合药物治疗*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎, 现将治疗和随访结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-06/2007-06来本院就诊的住院和门诊*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎患者112例, 年龄26-70(平均52±9)岁, 男67例, 女45例, 病变限于胃窦者96例, 胃窦和胃体下部均有病变者16例, 疣状隆起4-20个不等, 平均6.5个, 单纯胃黏膜慢性炎性病变者64例, 有轻、中度不典型增生和局灶性肠化或萎缩者32例, 无不典型增生而有灶性黏膜肠化和/或腺体萎缩16例, 采用OLYMPUS V70型电子胃镜, 绵阳立德射频治疗仪和柱状射频头导管, 西咪替丁片(泰胃美)为中美天津史克制药有限公司产品, 胃复春片为杭州胡庆余堂药业有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 病例入选标准和分组: 年龄18-70岁, 1 wk内经电子胃镜检查(见胃窦和/或胃体有多发直径5-10 mm, 高2-3 mm圆形黏膜隆起, 隆起中央凹陷糜烂)、组织病理学检查、快速尿素酶法和血清*H pylori*抗体(CagA、Hsp60和UreC)检测确诊为*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎, 且30 d内未使用过抗生素、铋剂和抑酸药的患者入选. 对治疗药物有过敏史、合并有胃或十二指肠溃疡、病理组织学检查疑有早胃癌或患有其他恶性肿瘤、正在服用非甾体抗炎药及皮质类固醇药物、任何一项检查有*H pylori*感染和有明显肝、肾、心功能不全的患者排除. 将入选的112例患者随机分为治疗组(射频消融+西咪替

丁、胃复春)和对照组(西咪替丁+胃复春), 每组56人.

1.2.2 射频消融: 胃镜进入胃腔后发现病灶, 经活检钳道插入射频导管, 选择射频功率25 W、脚踏控制, 柱状射频头端对准疣状隆起病灶顶部持续点灼1-3 s, 至隆起变平发白或疣状爆开发白为止.

1.2.3 药物治疗方法: 西咪替丁, 800 mg/次, 1次/d, 睡前30 min *po*, 连服30 d; 胃复春片, 4片/次, 3次/d, 饭前30 min *po*, 连服90 d.

1.2.4 疗效判断标准: 两组均于疗程结束后复查胃镜判断疗效. 疣状样黏膜隆起消失, 无不典型增生和肠化、萎缩为治愈; 疣状样黏膜隆起消失2/3以上, 不典型增生和/或肠化萎缩减轻为显效; 疣状样黏膜隆起减少1/2以上, 不典型增生和/或肠化萎缩无变化为有效; 疣状样黏膜隆起消失<1/2, 不典型增生和/或肠化萎缩无变化为无效.

1.2.5 随访: 对治愈和治疗前有不典型增生伴肠化或萎缩的病例1年后复查胃镜, 以观察远期疗效和病理组织变化.

统计学处理 对资料进行方差分析、*t*检验、卡方检验分析, $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

治疗组失访2例, 治愈77.8%(42/54), 显效12.9%(7/54), 有效9.3%(4/54), 无效1.9%(1/54), 治愈显效为90.7%(49/54), 总有效率达98.1%(53/54). 对照组失访1例, 治愈45.5%(25/55), 显效20.0%(11/55), 有效18.2%(10/55), 无效16.4%(9/55), 治愈显效65.5%(36/55)总有效率为83.7%(47/55)两组治愈病例随访1年, 治疗组有1例复发, 1年复发率2.4%(1/42); 对照组有12例复发, 1年复发率48.0%(12/25); 对有不典型增生病理改变的32例患者随访至今, 未发现有不典型增生加重和癌变. 统计分析显示: 两组治愈率($P<0.01$)、治愈显效率($P<0.01$)、总有效率($P<0.05$)和1年复发率($P<0.01$)有显著性差异, 治疗组明显优于对照组.

3 讨论

疣状胃炎是日本学者Kawai在1974年经细致的病理组织学研究而命名的一种具有特殊病变类型的胃炎, 并根据病灶是否易于消退将疣状胃炎分为未成熟型和成熟型, 这种分型被各国学者一直认可并应用. 疣状胃炎的病因尚未

创新盘点

本文与其他相关文章的不同点在于: (1)所选的病例特定为*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎患者. (2)采取内镜下射频治疗+中西药联合治疗, 不仅应用抑酸作用适中、每日服用一次的西咪替丁修复损伤的胃黏膜, 还选用胃复春改善临床症状、逆转胃黏膜不典型增生和肠化. (3)治疗后1年随访, 并继续观察随访有不典型增生和肠化者.

同行评价
本文使用方法较
好,操作方便,安
全,值得基层医院
推广应用。

完全清楚,研究认为可能与*H pylori*感染^[2]、胃酸增高^[3]、变态反应^[4]、免疫因素^[5]和胃液中表皮生长因子表达降低^[6]等有关。我们也观察到*H pylori*阳性的未成熟型疣状胃炎经过根除*H pylori*后临床症状和胃黏膜病变均可消失,但成熟型疣状胃炎*H pylori*根除后临床症状改善而胃黏膜疣状隆起仍然存在,表明*H pylori*感染只是疣状胃炎的病因之一。

疣状胃炎的治疗除药物治疗外,国内已有采取内镜下微波^[7]、氩离子凝固^[8]、高频电^[9]、热极^[10]和射频消融^[11]治疗的报道,且多为*H pylori*阳性病例。针对*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎的治疗观察未见报道。我们选用内镜下射频消融联合西咪替丁和中成药胃复春治疗*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎是基于:(1)内镜下射频消融治疗与微波、高频电和氩离子凝固治疗相比有不粘连组织、穿透组织均匀、不产生烟雾镜下视野清晰、导线不发热不损伤内镜和仪器成本低的优点,尤其是选用柱状射频头导管和脚踏控制,能准确的控制治疗面积和灼凝至胃黏膜下肌层达到最佳的治疗深度。(2)西咪替丁是组胺H₂-受体阻滞剂,抑制胃酸分泌适中,不会反馈性引起高胃泌素血症,能有效地修复损伤的胃黏膜。(3)胃复春片由香茶菜、枳壳等中药组成,具有健脾益气、活血化瘀等作用,能改善患者的临床症状,并有一定的逆转胃黏膜肠化、萎缩和不典型增生的作用^[12]。疗效观察结果也表明:治疗组的治愈率、总有效率和一年复发率明显优于对照组,射频消融治疗后无局部渗血和穿孔等并发症。

治疗组和对照组的治愈病例随访1年,分别有1例和12例复发,其中治疗组的1例和对照组3例经检查有*H pylori*感染的证据,经根除*H pylori*治疗后再随访病灶消失。但对照组其他9例复发原因不明,有待进一步观察分析。

朱明华 *et al*^[13]报道显示疣状胃炎的组织病理检查肠化和不典型增生发生率为13.3%和29.4%,我院112例病例中不典型增生发生率达28.6%,与该报道一致。陈淑萍^[14]研究发现疣状胃炎伴肠化组胃液中CEA和β₂-MG浓度明显高于无肠化组,认为与疣状胃炎癌前疾病有一定

关系。姚忆蓉 *et al*^[15]对疣状胃炎患者73例进行5年随访,发现4例癌变,占5.48%,癌变时间为1-3年,平均21 mo,均为原病灶的黏膜内癌,病理检查显示由不典型增生向癌逐渐过渡。本研究两组共48例有胃黏膜轻、中度不典型增生和/或灶性肠化、萎缩,随访12-36 mo,未发现有癌变,仍需长期随访。

总之,疣状胃炎是一种有特殊病理组织类型的慢性胃黏膜疾病,其病因尚不明确,且有一定的癌变率,需要积极治疗和长期随访。我们的临床研究结果表明,内镜下射频消融联合西咪替丁和胃复春治疗*H pylori*阴性的成熟型疣状胃炎,疗效确切、安全、治疗成本低,值得临床推广应用。

4 参考文献

- 1 夏玉亭,于中麟. 胃炎临床研究进展. 第1版. 上海:上海科学技术出版社,2003:374-376
- 2 付峻林,吴云林. 疣状胃炎的历史、现状与思考. 国外医学·消化系疾病分册 2005; 25: 155-157
- 3 陈晓娟,黄梅芳,邓长生. 疣状胃炎539例临床分析. 山东医药 2004; 44: 30-31
- 4 高晓红,杨海鹰,李英华,李智力,李小雨. 幽门螺杆菌感染与疣状胃炎伴或不伴糜烂及慢性浅表性胃炎相关性的研究. 中华消化内镜杂志 2001; 18: 228-229
- 5 丁西平,王巧民,郑帮海,任学雷,殷保书,杨仁松. 疣状胃炎外周血T淋巴细胞亚群检测及其临床意义. 临床消化病杂志 2003; 15: 111-112
- 6 王永华,郭荣斌,汪鸿志. 疣状胃炎与幽门螺杆菌、胃泌素和表皮生长因子等相关的研究. 中华消化杂志 1997; 17: 300
- 7 曹彬. 微波联合奥美拉唑治疗疣状胃炎的疗效分析. 中国内镜杂志 2006; 12: 862-863
- 8 应力,姜春萌,王朝晖. 内镜下氩离子凝固术治疗成熟型疣状胃炎35例临床分析. 中国内镜杂志 2006; 12: 125-126
- 9 李宝柱. 胃镜电凝术中中药治疗成熟型疣状胃炎40例. 辽宁中医杂志 2006; 33: 202-203
- 10 盛剑秋,李爱琴,张英辉,闫伟,余东亮,田素丽,晨智敏,李瑛. 热极治疗疣状胃炎的临床疗效观察. 胃肠病和肝病杂志 2006; 15: 303-304
- 11 胡仕林,贺降福,余蓉,刘荣,黄爱霞. 内镜下射频消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型的临床观察. 世界华人消化杂志 2006; 14: 920-922
- 12 厉兰娜,王翠莲,张义平,陈炜,戴蕾,朱惠芳. 胃复春片治疗慢性浅表性胃炎的临床研究. 中国实验方剂学杂志 2007; 13: 55-56
- 13 朱明华,戴文森,丁华野,王文亮,余宁,马福成. 疣状胃炎的病理学和单克隆抗体MG7免疫组化检查. 第四军医大学学报 1990; 11: 273-274
- 14 陈淑萍. 胃液CEA、β₂-MG测定与疣状胃炎关系的初步研究. 浙江医学 2006; 28: 244-245
- 15 姚忆蓉,周中源,徐诗光,李咪凤,王瑞年. 疣状胃炎82例胃镜随访观察. 河南医科大学学报 1995; 30: 425

编辑 李军亮 电编 何基才

心理干预对国内慢性乙型肝炎患者焦虑抑郁情绪影响的荟萃分析

张耀, 周吉军, 王宇明

张耀, 周吉军, 王宇明, 第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
国家“973”重点基础研究发展计划资助项目, No. 2007CB512900
国家自然科学基金资助项目, No. 30471551
通讯者: 王宇明, 400038, 重庆市, 第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所. wym417@yahoo.com.cn
电话: 023-68754141
收稿日期: 2007-08-19 修回日期: 2007-12-20

Effects of psychotherapy on depression and anxiety of patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis

Yao Zhang, Ji-Jun Zhou, Yu-Ming Wang

Yao Zhang, Ji-Jun Zhou, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512900 and National Natural Science Foundation of China, No. 30271667
Correspondence to: Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wym417@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-19 Revised: 2007-12-20

Abstract

AIM: To discuss the possibility and necessity of mental intervention for chronic hepatitis B (CHB) patients by a meta-analysis.

METHODS: We evaluated by meta-analysis the efficacy of mental intervention combined with routine medical treatment vs. routine medical treatment alone in hepatitis B patients. Weighted mean differences (WMD) were applied to evaluate the SCL-90 (anxiety score) and SCL-90 (depression score), self-rating anxiety scale (SAS) and self-rating depression scale (SDS) between the intervention and control groups.

RESULTS: Above-mentioned index effective index and 95% confidence interval (95% CI) were -0.52 (95% CI: -0.56, -0.47), -0.79 (95% CI: -0.83, -

0.75), -1.08 (95% CI: -1.45, -0.71) and -0.79 (95% CI: -0.83, -0.75), respectively.

CONCLUSION: Our meta-analysis shows mental intervention is more effective than monotherapy, and patient compliance was good.

Key Words: Chronic hepatitis B; Mental intervention; Meta-analysis

Zhang Y, Zhou JJ, Wang YM. Effects of psychotherapy on depression and anxiety of patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 101-104

摘要

目的: 从循证医学角度探讨慢性乙型肝炎患者心理干预的可能性及必要性。

方法: 应用Meta分析的方法比较心理干预组和非干预分组在SCL-90(焦虑评分)、SCL-90(抑郁评分)、Zung焦虑自评量表(SAS)评分及Zung抑郁自评量表(SDS)评分方面的差异, 以加权平均数(WMD)为效应量进行合并分析。

结果: 上述研究指标纳入研究文献合并效应量及95%可信限(95%CI)分别为-0.52(95% CI: -0.56, -0.47)、-0.79(95% CI: -0.83, -0.75)、-1.08(95% CI: -1.45, -0.71)和-0.79(95% CI: -0.83, -0.75)。

结论: 心理干预可以显著改善慢性乙型肝炎患者焦虑抑郁情绪, 增加治疗的依从性。

关键词: 慢性乙型肝炎; 心理干预; Meta分析

张耀, 周吉军, 王宇明. 心理干预对国内慢性乙型肝炎患者焦虑抑郁情绪影响的荟萃分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16(1): 101-104
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/101.asp>

0 引言

当前, 医学的发展已经由单一的“生物医学模

背景资料
随着生物医学模式的转变, 心理因素在感染性疾病的预后中可能起着重要作用, 而目前有关慢性乙型肝炎心理干预的文章较少, 且各研究之间的结论不一致。

研发前沿
循证医学的核心内容是寻找证据、分析证据和运用证据,以做出科学合理的临床决策。荟萃分析是为临床上提供决策依据的主要分析方法,其结果为临床上判别某种治疗方法的有效性提供最可靠的证据。本文应用此方法分析心理干预在改善慢性乙型肝炎患者焦虑抑郁情绪中的作用。

式”向“生物-心理-社会模式”转变,心理因素对疾病的影响越来越受到众多学者的关注。乙型病毒性肝炎作为正在我国广泛流行的传染性疾病,影响其预后的因素复杂,除了与病原体和机体免疫状态有关外,心理社会因素也可能起重要作用。国内研究慢性乙型肝炎患者(chronic hepatitis B, CHB)心理干预的文章较少,且各研究之间的结论存在较大的差异。为了减少研究偏倚,我们在全面检索文献的基础上对上述文献进行定量综合分析,旨在从心理学的角度为该病的临床决策分析提供客观证据。

1 材料和方法

1.1 材料 以“viral hepatitis B”、“hepatitis B virus”、“HBV”和“mental intervention”为检索词,检索1990-01/2007-07在Medline、Elesiver、PubMed、BIOSIS Previews和HMIC等数据库公开发表的文献,检索语种为英语;以“乙型病毒性肝炎”、“乙型肝炎”、“心理干预”为检索词,检索1989-01/2007-07在CNKI全文数据库、万方数据库、中文科技期刊数据库和中文生物医学文献数据库等公开发表的文献,检索语种为汉语。并辅以文献追述的方法,对相关的参考文献也纳入研究范围。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入与剔除标准: 文献纳入标准: (1)国内外公开发表的文献且均为全文; (2)研究类型为随机对照试验(RCT)或临床对照试验(CCT); (3)关于慢性乙型肝炎心理状态或心理干预的研究; (4)干预措施为内科常规治疗的基础上加上心理支持治疗和认知干预,对照组为常规内科治疗; (5)有国际公认的一项或多项评价心理健康的指标,并以mean±SD的形式表达; (6)干预组与对照组在年龄、性别和病情等方面具有均衡可比性,且干预前两组在所观察的指标上无显著差异; (7)对多篇文献报道同一样本人群的情况,选择最为详细报道的文献作为研究对象; (8)纳入病例均符合我国2000年《病毒性肝炎防治方案》诊断标准。文献剔除标准: (1)研究样本数<20例; (2)伴随患有恶性肿瘤、严重免疫系统疾病、血液系统疾病或明显精神病史的患者; (3)统计学数据在分析时无法转化或应用。

1.2.2 疗效判定指标: 研究以两组间症状自评量表(SCL-90)焦虑与抑郁评分、Zung焦虑自评量表(SAS)评分和Zung抑郁自评量表(SDS)评分作为心理干预疗效的评价指标。

1.2.3 质量控制: 统一培训两名研究者进行文献

检索,检索结果进行对比,以防止漏查文献。按Jadad制定的量表对纳入文献进行质量评分,1-2分为低质量文献,3-5分为高质量文献。

统计学处理 采用STATA 9.0软件的Meta分析模块进行分析。纳入指标均为计量资料,采用加权平均数(weighted mean difference, WMD)及其95%可信区间(95% CI)作为系统评价的指标。异质性分析采用齐性检验,当 $P>0.05$ 时视为研究间无统计学异质性,当异质性检验结果提示各项研究之间具有同质性时,采用固定效应模型(Mantel-Haenszel)进行Meta分析,反之则采用随机效应模型(Dersimonian-Laird)。采用倒漏斗图检验文献是否有发表偏倚,当倒漏斗图显示不对称则提示存在发表偏倚。

2 结果

2.1 纳入文献描述及基本特征 共检索到有关乙型病毒性肝炎心理干预的文献91篇。经逐一仔细阅读全文并按照纳入和剔除标准,其中79篇文献予以排除,经核对后纳入研究的文献共计12篇。所有纳入文献均以内科常规治疗结合心理支持治疗和单纯常规内科治疗进行分组,干预时间超过4 wk。两组在年龄和性别等混杂因素上具有均衡可比性。英文数据库未检索到中国人发表的相关文献,所纳入的文献均为中文全文文献(表1)。

2.2 SCL-90评价心理干预的效果 以SCL-90作为评价指标,两组共计纳入病例1024人,其中干预组556例,对照组468例。由于SCL-90包含的项目太多,且绝大多数文献未列出SCL-90的总分值,因此研究只比较SCL-90中最为敏感的两项(焦虑和抑郁)。SCL-90焦虑项目比较显示,各项研究之间的异质性检验 $Q = 115.79, P = 0.00$; SCL-90抑郁项目比较显示,各项研究之间的异质性检验 $Q = 159.86, P = 0.00$ 。上述异质性检验结果认为各研究之间具有异质性,采用随机效应模型进行分析。Meta分析结果显示(图1A-B): SCL-90焦虑项目合并WMD为-0.52(95% CI: -0.56, -0.47),差异具有统计学意义($Z = 2.43, P = 0.015$); SCL-90抑郁项目合并WMD为-0.79(95% CI: -0.83, -0.75),差异具有统计学意义($Z = 2.78, P = 0.005$)。结果提示心理干预可显著改善慢性乙型肝炎患者的SCL-90的焦虑和抑郁两项指标。

2.3 SAS和SDS评价心理干预的效果: 以SAS和SDS作为评价指标,两组共计纳入病例421人,其中干预组211例,对照组210例。SAS项目比较显示,各项研究之间的异质性检验 $Q = 7.53, P = 0.076$; SDS项目比较显示,各项研究之间的异质

创新盘点
 为了减少各研究之间的偏倚, 本文在全面检索文献的基础上对文献进行定量综合分析, 旨在从心理学的角度为该病的临床决策分析提供客观依据。

表 1 纳入文献基本特征

文献来源	方法	干预组/对照组样本量(n)	干预方法与时间	评价指标	Jadad评分
张姝娜 ^[1] 2005	CCT	38/38	互动交流、集体讲座 历时1 mo	SCL-90	2
沈翠珍 ^[2] 2004	RCT	30/30	互动交流、认知干预 历时1 mo	SCL-90, SAS, SDS	4
宋仕玲 ^[3] 2005	RCT	26/26	情感关怀、认知干预 历时1 mo	SCL-90	3
周小茜 ^[4] 1999	RCT	54/52	知识讲座、家庭关怀 历时3 mo	SCL-90	2
李桂香 ^[5] 2005	RCT	28/26	知识讲座、互动交流 历时6 mo	SCL-90	3
张洪美 ^[6] 2005	RCT	74/70	互动交流、知识讲座 历时3 mo	SCL-90	2
张学海 ^[7] 2003	RCT	60/60	资料发放、知识讲座 历时1 mo	SCL-90	3
施巧珍 ^[8] 2005	RCT	197/166	互动交流、情感关怀 历时1 mo	SCL-90	4
马明芳 ^[9] 2005	CCT	49/51	资料发放、知识讲座 历时3 mo	SCL-90	2
周荣 ^[10] 2005	RCT	100/100	互动交流、集体讲座 历时2 mo	SAS、SDS	3
李秀荣 ^[11] 2002	RCT	31/30	互动交流、认知干预 历时1 mo	SAS、SDS	3
何艳 ^[12] 2005	CCT	50/50	互动交流、情感关怀 历时1 mo	SAS、SDS	2

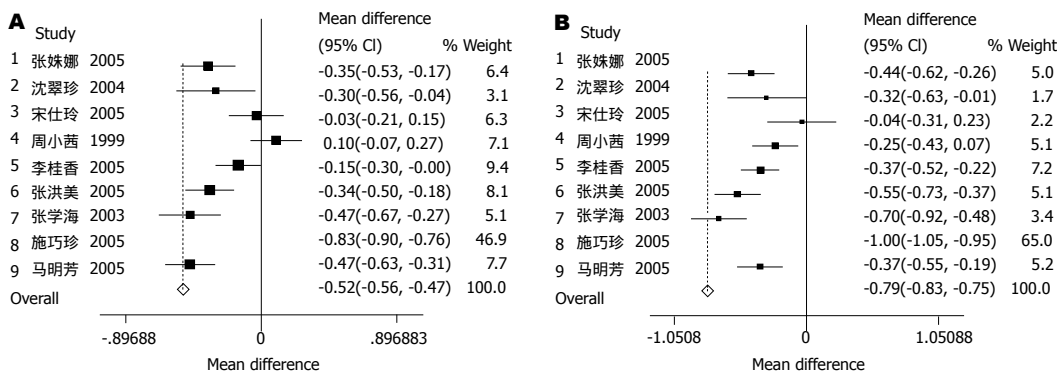


图 1 心理干预对患者SCL-90的影响。A: 焦虑; B: 抑郁。

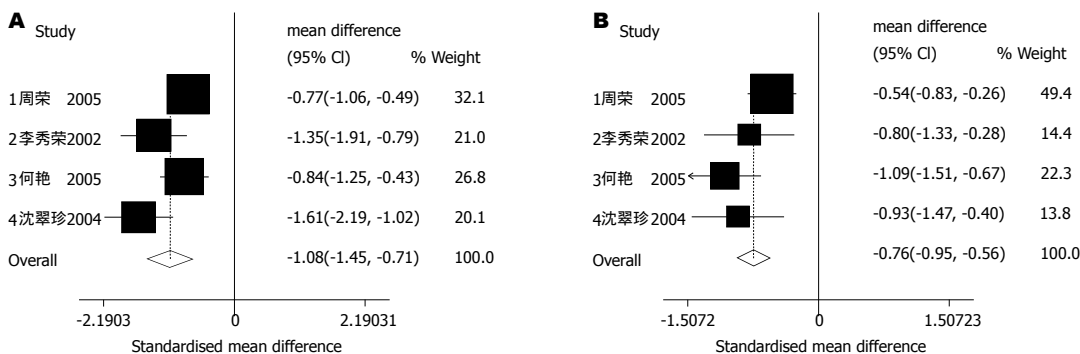


图 2 心理干预对患者SAS和SDS评分的影响。A: SAS评分; B: SDS评分。

性检验 $Q = 5.02, P = 0.171$ 。上述异质性检验结果认为各研究之间具有同质性, 采用固定效应模型进行分析。Meta分析结果显示(图2A-B): SAS项目合并WMD为-1.08(95% CI: -1.45, -0.71), 差异具有统计学意义($Z = 9.32, P = 0.00$); SDS项目合并WMD为-0.76(95% CI: -0.95, -0.65), 差异具有统计学意义($Z = 5.75, P = 0.00$)。结果提示心理干预可显著改善慢性乙型肝炎患者SAS和SDS水平。

2.4 文献发表偏倚及敏感性分析 为考察纳入文献的发表偏倚, 采用倒漏斗图进行分析, 纳入的

研究点以真值为中心呈对称分布, 提示纳入文献的发表偏倚较小。为考察研究结果的可靠性, 对研究结果进行敏感性分析, 分别采用随机效应模型和固定效应模型进行分析, 前后两次结果无明显差异; 对明显偏离真值的研究点予以剔除后再次进行Meta分析, 结果与上述结论一致, 提示Meta分析的结果可信。

3 讨论

目前, 我国是世界上乙型病毒性肝炎高度流行

应用要点
荟萃分析的结果为临床上慢性乙型肝炎患者的治疗提供一种新思路,提示在注重对患者进行药物治疗的同时,加强心理干预是非常重要的。

地区,病毒携带者高达1.2亿人。目前针对慢性病毒性肝炎的研究大多集中在病毒学、免疫学、药理学等方面,而极少关注CHB患者的主观因素对病情进展的影响。由于该病存在治愈难、疗程较长、治疗费用较高、易发生肝硬化甚至癌变等原因,致使该类型患者精神压力较大。Beutels *et al*^[13]的研究显示,CHB患者容易发生身心疾病,促使病情恶化。Kraus *et al*^[14]的研究认为,心理干预能减轻患者的心理负担,有利于病情的恢复;国内学者的研究同样表明,CHB患者存在焦虑、抑郁、恐惧等负面情绪。但上述研究之间存在方法学质量不统一、评价指标不一致、基线资料有差异等缺点。因此,通过系统评价的方法对文献进行汇总将更为客观真实地反映已经存在的的结果。

Meta分析结果表明,通过情感关怀、互动交流、集体讲座及认知干预等方式,干预组的SCL-90焦虑和抑郁评分低于对照组,差异具有统计学意义($Z = 2.43, P = 0.015; Z = 2.78, P = 0.005$);干预组SAS和SDS评分也低于对照组,差异具有统计学意义($Z = 9.32, P = 0.00; Z = 5.75, P = 0.00$)。上述结果提示,通过心理干预,可以改善患者的心理健康水平,提高治疗的依从性。由于部分阴性结果可能未进行报道,这在一定程度上限制了资料的全面性。研究解决的方法是通过计算机检索结合文献追述的方法,尽可能的扩大文献来源,但仍有可能有部分文献未检索到。为进一步考察Meta分析结果的真实性和可靠性,研究对两组间年龄、性别、样本量等混杂因素进行了均衡性检验,结果提示两组间均衡可比。通过运用随机效应模型和固定效应模型对纳入文献进行敏感性分析,结果表明两种分析结论一致,进一步加强了原结论的可信

同行评价
本文表述正确,文笔流畅,逻辑性强,信息量较大,内容重要,具有较高的学术价值。

度;漏斗图分析结果提示文献的发表偏倚较小。但同时也应当看到,国内文献的Jadad评分普遍较低,加之Meta分析本身的局限性存在,上述结论还需要纳入更多的大样本多中心的临床试验加以证实。

4 参考文献

- 1 张姝娜,安平,曹艳雪,戴文颖,卞丽,吕丹,王佳贺. 认知干预对慢性乙型肝炎患者心理状态和治疗依从性的影响. 中国临床康复 2005; 9: 44-45
- 2 沈翠珍,邵爱仙,倪金萍,郑小红,王晓燕. 心理干预对改善慢性乙型肝炎病人身心症状的研究. 护理研究 2004; 18: 974-976
- 3 宋仕玲,祝捷,田萍. 病毒性肝炎患者情绪障碍及心理干预研究. 武警医学 2005; 16: 973-974
- 4 周小茜,刘发彬,曾蕾. 慢性乙型肝炎病人心理治疗临床观察. 四川医学 1999; 20: 625
- 5 李桂香,王剑英,李桂琴. 心理干预对干扰素- α 治疗慢性乙型肝炎30例疗效及复发的影响. 新乡医学院学报 2005; 22: 518-520
- 6 张洪美. 心理干预对中年慢性乙型肝炎患者心理健康的影响. 济宁医学院学报 2005; 28: 52-53
- 7 张学海,张玉梅,满昌军,王啸. 感染乙型肝炎病毒孕妇心理社会干预的对照研究. 中国行为医学科学 2003; 12: 511-512
- 8 施巧珍,庄丽频,蒋幼娜. 健康教育和心理干预在慢性乙型肝炎患者中的应用分析. 安徽医药 2005; 9: 714-715
- 9 马明芳,任晚霞,朱娅鸽,赵晓莉. 支持性心理治疗对慢性乙型肝炎患者心理健康水平的影响. 中国临床康复 2005; 9: 30-31
- 10 周荣,韩荣,闫香芹. 慢性乙型肝炎病人焦虑与抑郁的调查及其心理干预. 护理研究 2005; 19: 592-594
- 11 李秀荣,陈积,舒乔. 心理行为干预对学龄儿童病毒性肝炎康复的影响. 中国临床康复 2002; 6: 3552
- 12 何艳,娄百玉,陈全花,黄淑云. 住院乙型肝炎患者情绪障碍及心理干预. 中国健康心理学杂志 2005; 13: 365-366
- 13 Beutels P, Musabaev EI, Van Damme P, Yasin T. The disease burden of hepatitis B in Uzbekistan. *J Infect* 2000; 40: 234-241
- 14 Kraus MR, Schafer A, Csef H, Scheurlen M, Faller H. Emotional state, coping styles, and somatic variables in patients with chronic hepatitis C. *Psychosomatics* 2000; 41: 377-384

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉, 遵义医学院附属医院普外科
贵州省遵义市 563003
贵州省科技基金资助项目, No. 20033040
通讯作者: 杨伟明, 563003, 遵义医学院附属医院普外科.
yangweiming2004@126.com
电话: 0852-8608941
收稿日期: 2007-08-28 修回日期: 2007-12-06

Activity of dendritic cells modified by joint antigen

Zi-Biao He, Wei-Ming Yang, Bao-Ting Jiao, Hui Song

Zi-Biao He, Wei-Ming Yang, Bao-Ting Jiao, Hui Song,
Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi
Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China
Supported by: the Science and Technology Foundation of
Guizhou Province, No. 20033040
Correspondence to: Wei-Ming Yang, Department of Gen-
eral Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College,
Zunyi 563003, Guizhou Province,
China. yangweiming2004@126.com
Received: 2007-08-28 Revised: 2007-12-06

Abstract

AIM: To study immune activity of dendritic cells (DCs) in colon cancer after modification by joint antigen.

METHODS: DCs were isolated and purified from peripheral blood mononuclear cells from patients with colon cancer, by combination of granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-4. In time-efficiency experiments, DCs were modified by tumor antigen and analyzed by flow cytometry. DCs of the best group and T lymphocytes were incubated for different times. The results were determined by MTT test the T lymphocyte incubated for different time with the DC destruct tumor cell. In dose-efficiency experiments, DCs were modified by tumor antigen and different concentrations of staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB) for the best time gained from the above step, and analyzed by flow cytometry. DCs of the best group and T lymphocytes were incubated in different proportions for the best time. It will be test by MTT test the T lymphocyte incubated with the DC in different proportions destructs tumor cell.

RESULTS: In time-efficiency first step experiments, DCs modified by the antigen expressed especial molecule of DC more, DC of 36 h group expresses them most. In time-efficiency second step experiments, the cell-killing rate was highest in the 36 h group, and differed significantly from the other groups (35.92 ± 0.71 vs 14.85 ± 1.24 , 35.92 ± 0.71 vs 9.68 ± 1.25 , 35.92 ± 0.71 vs 17.97 ± 1.01 , 35.92 ± 0.71 vs 20.32 ± 0.92 , $P < 0.05$). In dose-efficiency first step experiments, DCs modified by the joint antigen expressed special molecule of DC more, DC of joint antigen (SEB: $100 \mu\text{g/L}$) group expressed them the most at seventh day; the T lymphocyte incubated with the DC modified with joint antigen in the proportion destructs more tumor cell than the T lymphocyte incubated with the DC modified with tumor antigen in the same proportion ($P < 0.05$). the T lymphocyte incubated with the DC modified with joint antigen in the proportion of 1 : 100 destructs the most tumor cell (47.70 ± 2.84 vs 28.99 ± 6.95 , 47.70 ± 2.84 vs 40.02 ± 3.65 , 47.70 ± 2.84 vs 34.55 ± 3.21 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The best time was 36 h when DC obtains tumor antigen and is modified or presents tumor antigen in vitro, when SEB and tumor antigen are made to modify DC the best concentration of SEB is $100 \mu\text{g/L}$, The best ratio of DCs and T lymphocytes was 1 : 100.

Key Words: Dendritic cells; T lymphocyte; *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; Colon carcinoma

He ZB, Yang WM, Jiao BT, Song H. Activity of dendritic cells modified by joint antigen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 105-108

摘要

目的: 研究结肠癌患者外周血树突状细胞(dendritic cell, DC)体外联合抗原诱导后的免疫活性。

方法: 从结肠癌患者外周血中分离并培养DC, 时效实验中分时段以肿瘤抗原修饰DC, 取最佳组与T淋巴细胞共孵不同时间, 用MTT检验其对肿瘤细胞的杀伤率; 量效实验中将

背景资料
DC是体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 也是唯一能激活初始型T细胞的APC, 处于免疫反应的中心地位. SEB是金黄色葡萄球菌产生的系列肠毒素之一, 其至少表现出3种生物学特性: 致热原性、超抗原性和增加外毒素的致死能力. SEB抗肿瘤作用目前认为: 主要通过依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用、激活T淋巴细胞并促使释放大量细胞因子的直接和间接杀伤作用, 产生强大的杀伤或抑制肿瘤细胞效应. 但其对宿主有较大的系统毒性作用, 而不能直接体内治疗肿瘤. DC通过摄取上述抗原并递呈给T细胞, 从而激发高效而特异的免疫反应, 主动杀伤肿瘤。

研发前沿
如何有效诱导DC成熟并发挥其特异抗肿瘤作用是当前研究的热点。DC疫苗未来在临床上应用尚需考虑以下问题:如何恰当选择DC致敏抗原及DC来源、疫苗的应用方式、途径、剂量及辅助治疗、疫苗的毒性、副作用及远期疗效、免疫应答的持续时间。

肿瘤抗原和不同浓度金黄色葡萄球菌肠毒素B(staph-lococcus aureus enterotoxin B, SEB)在上一步得出的最佳时间内修饰DC, 取最佳组按不同比例(DC:T淋巴细胞)来共孵上一步得出的最佳共孵时间, 用MTT检验其对肿瘤细胞的杀伤率。

结果: 时效实验组抗原修饰36 h组DC特有分子表达最高, 对结肠腺癌细胞的杀伤率也最高, 与其他组比较有差异(35.92 ± 0.71 vs 14.85 ± 1.24 , 35.92 ± 0.71 vs 9.68 ± 1.25 , 35.92 ± 0.71 vs 17.97 ± 1.01 , 35.92 ± 0.71 vs 20.32 ± 0.92 , $P < 0.05$)。量效实验组联合抗原修饰第7天(SEB: $100 \mu\text{g/L}$)DC表达DC特有分子最高, 在联合修饰组内, 以1:100组的杀伤率最高, 与其他组比较有显著差异(47.70 ± 2.84 vs 28.99 ± 6.95 , 47.70 ± 2.84 vs 40.02 ± 3.65 , 47.70 ± 2.84 vs 34.55 ± 3.21 , $P < 0.01$)。

结论: 体外DC抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h, 联合应用超抗原SEB的最佳值 $100 \mu\text{g/L}$, DC与T淋巴细胞的最佳共孵比例是1:100。

关键词: 树突状细胞; T淋巴细胞; 金黄色葡萄球菌肠毒素B; 结肠癌

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉. 体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 105-108
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/105.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)在诱导宿主对肿瘤的高效而特异的细胞免疫反应中起关键作用^[1]。由于肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子, 常导致DC不能或递呈抗原能力低下^[2]。我们以结肠癌患者的DC在体外经GM-CSF及IL-4共诱导, 并经该患者结肠腺癌原代培养细胞制备的肿瘤抗原和金黄色葡萄球菌肠毒素B(staph-lococcus aureus enterotoxin B, SEB)激活后, 诱导同源的T淋巴细胞, 研究其免疫活性。

1 材料和方法

1.1 材料 经病理确诊的Dukes C期结肠腺癌患者1例, 男性, 49岁, 粒/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4)(Peprotech公司), 尼龙毛柱(北京天来生物医学科技有限公司), 淋巴细胞分离液(密度 1077g/L , Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养肿瘤细胞^[3-4]: 手术切取结肠腺癌患者原发病灶经组织块原代培养获得肿瘤细胞,

流式细胞仪鉴定其为一倍体癌细胞, 免疫组化CEA检验阳性, 该癌细胞贴壁生长, 以 100mL/L FCS+PRMI1640于pH7.2-7.4, 37°C 、 50mL/L CO_2 饱和湿度条件的细胞培养箱中培养, 2.5g/L 胰蛋白酶消化传代培养。

1.2.2 制备肿瘤抗原^[3-4]: 6×10^5 个对数生长期癌细胞用PBS液洗2遍, PBS液调致 1mL , 放入 -80°C 冰箱内, 10 min后迅速放入 37°C 水浴中, 待其完全融化后, 再次放入 -80°C 冰箱内, 反复4次, 将冻融物 4000r/min 离心, 30 min, 取上清液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 除去细胞碎片, PBS调致 6×10^8 肿瘤细胞/L, 收集滤液作为肿瘤抗原(紫外分光光度法测定, 以Lowry-Kalchar公式计算其蛋白浓度为 0.4g/L), -40°C 保存备用。

1.2.3 分离和培养T淋巴细胞^[3-4]: 患者外周血加淋巴细胞分层液(密度 1077g/L)分离获单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), RPMI1640调细胞数为 $5 \times 10^9/\text{L}$, 置 37°C 、 50mL/L CO_2 、饱和湿度条件的细胞培养箱培养2 h。收集非黏附性细胞, 以聚丙烯Petri培养皿培养选择性地除去巨噬细胞; 尼龙毛柱过滤除去B细胞, 获T淋巴细胞。RPMI1640调细胞数为 $1 \times 10^9/\text{L}$ 移入培养瓶中, 37°C 、 50mL/L CO_2 、饱和湿度条件细胞培养箱培养, 每2 d更换半量新鲜淋巴细胞培养液(RPMI1640+ 100mL/L FCS)。

1.2.4 DC细胞的体外诱导培养^[3-4]: 上述留有黏附细胞的培养瓶中, 每瓶加 5mL DC培养液(RPMI1640+ 100mL/L 血清, 含 100mg/L GM-CSF和 10mg/L IL-4)诱导DC。 37°C 、 50mL/L CO_2 、饱和湿度条件的细胞培养箱培养, 每2 d更换半量新鲜DC培养液, 培养至第5天收获细胞。

1.2.5 DC体外抗原修饰与递呈的时效关系实验: 上述收获的DC培养第5天, 调细胞浓度为 $1 \times 10^8/\text{L}$, 加入相应用癌细胞制备的肿瘤抗原(按肿瘤细胞数与DC数比例为3:1), 37°C 、 50mL/L CO_2 、饱和湿度条件下分别培养24 h, 36 h, 48 h, 以制备肿瘤抗原修饰的DC。用流式细胞仪鉴定及分析DC, 选用最佳组(36 h组)与T淋巴细胞共同培养。在24孔板上按DC:T淋巴细胞为1:100的比例, 每孔加入肿瘤抗原修饰后的DC 1×10^4 和T淋巴细胞 1×10^6 , 每个时段各6孔。 37°C 、 50mL/L CO_2 、饱和湿度条件下分别共同培养12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 激发T淋巴细胞活性。以DC激活的T淋巴细胞为效应细胞, 设为时效实验组(DC+T淋巴细胞组); 以单独T淋巴细胞为效应细胞, 设为时效对照组(T淋巴细胞组); 以癌细胞为靶细胞, 设

表 1 时效实验抗原修饰后流式细胞仪表型分析结果(%)

DC流式分析结果	CD11c	CD80	HLA-DR
修饰前	0.31	0.17	0.83
24 h组	1.45	1.01	3.76
36 h组	15.01	3.20	25.91
48 h组	0.94	0.39	11.18

单独靶细胞为时效阴性对照组. 每组6孔. 采用MTT法检测, 以效靶比10:1(T淋巴细胞每孔 1×10^5 个, 癌细胞每孔 1×10^4 个)将T淋巴细胞和靶细胞(浓度为 $1 \times 10^8/L$), 加入DC+T淋巴细胞组以及T淋巴细胞组中. 培养20 h, 每孔加入MTT(5 g/L)10 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h, 加入DMSO 100 μ L, 振荡10 min, 30 min内酶联免疫检测仪测各组560 nm处A值并记录数值, 结果以6孔均数表示. 计算效应细胞对肿瘤的杀伤率, 肿瘤细胞杀伤率(%) = (对照组A值-实验组A)/对照组A值 $\times 100\%$.

1.2.6 DC体外联合抗原修饰与递呈的量效关系实验: 上述收获的DC培养第5天调细胞浓度为 $1 \times 10^8/L$, 量效抗原修饰实验组1加入结肠癌细胞制备的冻融抗原(肿瘤细胞数与DC数比例为3:1), 量效抗原修饰实验组2-5加入冻融抗原(肿瘤细胞数与DC数比例为3:1)和SEB, 并使SEB终浓度为25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L, 每组6孔, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下培养36 h制备抗原修饰的DC. 各取修饰后DC 4×10^5 个, 进行流式细胞仪分析. 取最佳联合修饰组DC(SEB: 100 mg/L)进行下一步实验. 两块24孔板上按DC:T淋巴细胞分别为1:1, 1:10, 1:100, 1:1000的比例, 一块24孔板加入肿瘤抗原、SEB共同修饰的DC和T淋巴细胞, 一块24孔板加入肿瘤抗原修饰的DC和T淋巴细胞, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下分别培养36 h, 以激发T淋巴细胞活性. 分别以肿瘤抗原修饰的DC激发T淋巴细胞、联合抗原修饰的DC激发T淋巴细胞为效应细胞, 设为量效抗原递呈实验组A、量效抗原递呈实验组B, 以结肠癌细胞为靶细胞, 设单独靶细胞为抗原递呈阴性对照组, 每组6孔. 采用MTT法检测, 方法同1.2.5, 得肿瘤细胞杀伤率(%).

统计学处理 所有变量均以mean \pm SD表示, *t*检验分析两变量间差异性.

2 结果

2.1 DC体外抗原修饰与递呈的时效关系 应用rhGM-CSF和rhIL-4联合诱导单个核细胞分化的

表 2 时效实验组对结肠腺癌细胞的杀伤率(%) (mean \pm SD, *n* = 6)

分组		杀伤率
时效实验组	DC+ T淋巴细胞12 h	14.85 \pm 1.24
	DC+ T淋巴细胞24 h	9.68 \pm 1.25
	DC+ T淋巴细胞36 h	35.92 \pm 0.71
	DC+ T淋巴细胞48 h	17.97 \pm 1.01
时效对照组		20.32 \pm 0.92

表 3 量效实验组抗原修饰第5天和第7天流式细胞仪表型分析结果(%)

DC流式分析结果	CD11c	CD80	HLA-DR	
第5天	0.21	0.10	0.59	
第7天结肠癌抗原修饰后	0.31	0.17	0.83	
第7天联合抗原修饰后SEB	25 mg/L	0.38	0.26	0.99
	50 mg/L	0.95	0.39	11.18
	100 mg/L	15.01	3.20	25.91
	200 mg/L	1.46	1.63	2.11

DC, 用结肠癌细胞冻融抗原修饰DC使其成熟, 结果见表1. 时效实验组按照肿瘤细胞杀伤率计算公式分别计算出时效实验组对肿瘤细胞的杀伤率, 结果见表2.

2.2 DC体外联合抗原修饰与递呈的量效关系 应用rhGM-CSF和rhIL-4联合诱导单个核细胞分化的DC, 分别以肿瘤抗原、不同浓度的SEB联合修饰和单用肿瘤抗原修饰, 第5天和第7天分别加PE标记CD11c, FITC标记CD80, PE/CY5标记HLA-DR免疫荧光染色后进行流式细胞仪分析, 检测结果见表3. 按照肿瘤细胞杀伤率计算公式分别计算出量效抗原递呈实验组对肿瘤细胞的杀伤率, 结果见表4.

3 讨论

DC是体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 也是唯一能激活初始型T细胞(naive T cell)的APC, 处于免疫反应的中心地位. DC表面不仅形成MHC-II肽复合物作为克隆型T细胞表面受体的配体, 成熟DC还高表达共刺激分子B7-1(CD80)、B7-2(CD86)CD40、CD50(ICAM-3)及CD54(ICAM-1)等起关键作用的辅助信号, 可诱导T淋巴细胞增殖并分泌IL-12等细胞因子产生Th1型免疫应答而发挥抗肿瘤作用. 但肿瘤患者体内DC存在功能上的缺陷. 如何有效诱导DC成熟并发挥其特异抗肿瘤作用是当前研究的热点.

我们采用外周静脉血通过密度梯度离心的

应用要点

本次实验从体外DC抗原修饰和递呈的时间及剂量或比例等方面的研究得出了相应的最佳值, 为下一步实验提供可靠依据, 为临床DC瘤苗的应用进行了一次有益的探索. 联合抗原修饰和进一步提高结肠癌DC疫苗效率将给其临床应用带来新的希望.

名词解释

依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用: 超抗原所激活的T细胞(CTL)能对表达MHC类分子的靶细胞产生细胞毒作用, 是超抗原和抗体结合后, 由于带有了表面标记, 而引发具有细胞毒性作用的细胞的攻击, 进而清除抗原, 这种作用叫依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用。

表 4 抗原递呈实验组对结肠腺癌细胞的杀伤率(mean ± SD, n = 6)

DC : T淋巴细胞	T淋巴细胞+结肠癌细胞抗原递呈	
	联合抗原修饰的DC	结肠癌细胞冻融抗原修饰的DC
1 : 1	28.99 ± 6.95	19.34 ± 5.17 ^a
1 : 10	40.02 ± 3.65	20.83 ± 2.73 ^a
1 : 100	47.70 ± 2.84 ^b	33.66 ± 2.10 ^{ab}
1 : 1000	34.55 ± 3.21	12.15 ± 4.02 ^a

^aP<0.05 vs 联合抗原修饰的DC; ^bP<0.01 vs 其他组。

方法获得PBMC, 经rhGM-CSF和rhIL-4联合刺激诱导分化为DC, 经FCM分析表明, 细胞在培养过程中表达DC特有的CD11c、CD80和HLA-DR分子, 并在肿瘤抗原修饰后进一步上调, 与文献报道的结果一致^[5], 即我们获得了本实验需要的DC。在本实验中不同修饰和共孵时段表现出不同的杀瘤效果, 其中均以36 h为最佳。表明DC体外抗原修饰与递呈有一定的时间关系, 这与DC特殊的功能有关, DC将摄入细胞内的肿瘤抗原消化降解为抗原肽片段, 与细胞内MHC分子结合成抗原肽-MHC分子复合物并表达在细胞表面, 完成这一抗原修饰过程需要一定时间。修饰后的DC在与T淋巴细胞接触过程中将其抗原信息传递给T淋巴细胞, 完成这一抗原递呈过程也需要的一段时间。以及与体外DC的成熟和寿命有一定关系。DC随其成熟而功能增强, 随其衰老功能减弱。我们得出其体外DC肿瘤抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h。

本实验中, 超抗原SEB/肿瘤抗原联合修饰的DC比仅用肿瘤抗原修饰的DC表达CD11c等特有分子的百分比要高, 随SEB量的增大而增加, 在100 mg/L达到最大值, 再增加反而下降。100 mg/L SEB+肿瘤抗原联合修饰的DC与T淋巴细胞共孵后的杀伤肿瘤细胞效应强于单用肿瘤抗原修饰的DC与T淋巴细胞共孵后的杀伤肿瘤细胞效应(P<0.05)。SEB是金黄色葡萄球菌产生的系列肠毒素之一, 其通过依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用 (superantigen dependent cell mediated cytotoxicity, SDCC)、激活T淋巴细胞并促使释放大量细胞因子的直接和间接杀伤作用, 产生强大的杀伤或抑制肿瘤细胞效应^[6-7]。DC将其以内源性抗原的形式与MHC I分子结合, 形成MHC I肽复合物, 再进入高尔基复合体经糖化、修饰, 最后通过分泌小泡的方式表达在细胞表面, 与CD8+ T淋巴细胞相互作用。但其对宿主有较大的系统毒性作用, 随着其浓度增

大对细胞的毒性增加, 降低DC的功能, 最佳SEB值是100 mg/L。另外, DC与T淋巴细胞以不同比例(1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000)共孵后其杀伤肿瘤细胞效应在DC与T淋巴细胞以1 : 100最高, 说明负载SEB/肿瘤抗原的DC已成功摄取了相应抗原, 加工后经MHC类分子呈递给T淋巴细胞, 同时通过共刺激分子、黏附分子等将T淋巴细胞激活, DC与T淋巴细胞以此比例共同孵育, T淋巴细胞发挥最大限度活性, 特异性杀伤该肿瘤细胞的能力增强, 显示了修饰后的DC递呈抗原能力的量效关系。DC与T淋巴细胞最佳共孵比例是1 : 100。

总之, 本次实验得出了体外DC抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h, 联合应用超抗原SEB的最佳值100 mg/L, DC与T淋巴细胞的最佳共孵比例是1 : 100。为下一步实验提供可靠依据, 为临床DC瘤苗的应用进行了一次有益的探索。联合抗原修饰和进一步提高结肠癌DC疫苗效率将给其临床应用带来新的希望。

4 参考文献

- Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H, Kohne CH, Ehninger G, Schmitz M, Bornhauser M. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 268-276
- Pinzon-Charry A, Schmidt CW, Lopez JA. The key role of CD40 ligand in overcoming tumor-induced dendritic cell dysfunction. *Breast Cancer Res* 2006; 8: 402
- 冯毅, 杨伟明, 焦保庭, 杨建永, 王璜. 大肠癌肿瘤抗原修饰的树突状细胞活性检测. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 42: 237-239
- 杨建永, 杨伟明, 焦保庭, 冯毅, 黄璜. 超抗原和肿瘤抗原修饰树突状细胞的活性研究. *遵义医学院学报* 2006; 29: 229-231
- 朱学军, 曹雪涛, 于益之, 陈国友, 万涛, 马施华, 唐华, 章卫平. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1997; 4: 302-306
- 申志华, 邢飞跃, 陈代雄. 超抗原SE抗肿瘤研究进展. *遵义医学院学报* 2002; 25: 168-172
- 张子蕾, 张秀英. 超抗原抗肿瘤的研究进展. *医学理论与实践* 2004; 17: 27-28

编辑 李军亮 电编 郭海丽

同行评价

本文研究方法设计合理, 结果可信, 具有一定的参考价值。

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大 16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部预选为中国科技论文统计源期刊)、

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2006年度《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, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第780位, 内科医学类28种期刊的第21位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.134, 他引率0.71, 地区分布数27, 基金论文比0.42, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.50。本刊的出版模式是开放存取(Open Access, OA)+“第三方支付商业出版模式”=“公益性出版模式”。以这种模式出版的效果非常显著, 截止2007-12-31本刊的网络版点击次数达到了21350084次。我们倡导以科学家的研究经费来为科学家服务的宗旨, 编辑出版高质量的文章。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性

及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4000字以内, 研究原著6000字以内, 焦点论坛4000字以内, 文献综述6000字以内, 研究快报4000字以内, 临床经验1800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 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核心期刊, 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》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100025, 北京市2345信箱, 朝阳区东四环中路62号楼远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com

分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}¹, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等。基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为M_r 30 000或30kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即Ar(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-、±及-后列出。如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d.3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, t = 28.4±0.2°C。BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。M_r明确

的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写ν; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P。在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE。统计学显著性用^aP<0.05, ^bP<0.01(P>0.05不注)。如同一表中另有一套P值, 则^cP<0.05, ^dP<0.01; 第三套为^eP<0.05, ^fP<0.01等。

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3 = 0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12; 1985年4月,写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 ,百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜

明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。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。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 作者贡献分布 格式如:陈湘川与庞丽娟此文所作贡献两均等;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。

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量,本刊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。格式如: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。

3.7 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.9 英文摘要

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。

3.9 正文标题层次 为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;第3套为^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;

无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊:序号,作者(列出全体作者)。文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生,潘伯荣,马景云.世界胃肠病学杂志英文版的现状.世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In:Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中,陈九如.胃肠道造影原理与诊断.第1版.上海:上海科学技术文献出版社,1995: 382-385

5 网络版的发表前链接 本刊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。

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突;(3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿;(5)列出作者贡献分布;(6)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名;(7)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(8)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部,所有来稿均需接受同行评议。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2-3位同行专家的严格评审。投稿时,作者可以提出要求回避的同行

专家名单,也可以推荐2位非本单位的审稿人,尤其是本刊编委会成员。审稿过程平均时间需要1 mo。

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2-3位同行专家评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。录用后稿件作者需交纳发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15日内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理。

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物医学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

4.6 投稿方式 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过 submission@wjgnet.com 寻求帮助。

4.7 投稿清单 在线提交稿件并获得稿件编号后,请将以下材料寄到编辑部:(1)投稿函(注明稿件编号,内容见4.1);(2)稿件相关材料,含打印稿、基金资助证明、通讯作者和第一作者Email、电话、传真、高质量图片(非打印)、参考文献首页复印或打印件。

世界胃肠病学杂志社

北京百世登生物医学科技有限公司

100025,北京市2345信箱,朝阳区东四环中路62号楼远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381901

传真: 010-85381893

Email: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01,原刊名《China National of New Gastroenterology》,1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为WJG,国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类),获得商标注册证第2001158号。

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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

蔡三军 教授

复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈光 教授

吉林大学第一医院消化器官外科

陈洪 副教授

东南大学附属中大医院消化科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

房林 副教授

同济大学附属第十人民医院普外科

傅红 副教授

上海复旦大学肿瘤医院肿瘤外科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

黄晓东 副主任医师

湖北省武汉市中心医院消化内科

李定国 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

林勇 主治医师

第二军医大学附属长征医院消化内科

刘宝瑞 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘彬彬 副研究员

复旦大学附属中山医院, 复旦大学肝癌研究所

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

沈洪 教授

南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

沈琳 副教授

北京肿瘤医院消化内科

唐霓 副研究员

重庆医科大学传染病学

唐晓鹏 教授

中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

王健生 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王蒙 副教授

第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王新月 教授

北京中医药大学东直门医院消化科

吴君 主任医师

贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

于聪慧 教授

北京军区总医院肝胆外科

展玉涛 副主任医师

首都医科大学附属同仁医院消化科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

张继明 教授

复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张晓岚 教授

河北医科大学第二医院消化内科

周丁华 主任医师

解放军二炮总医院普外科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科