

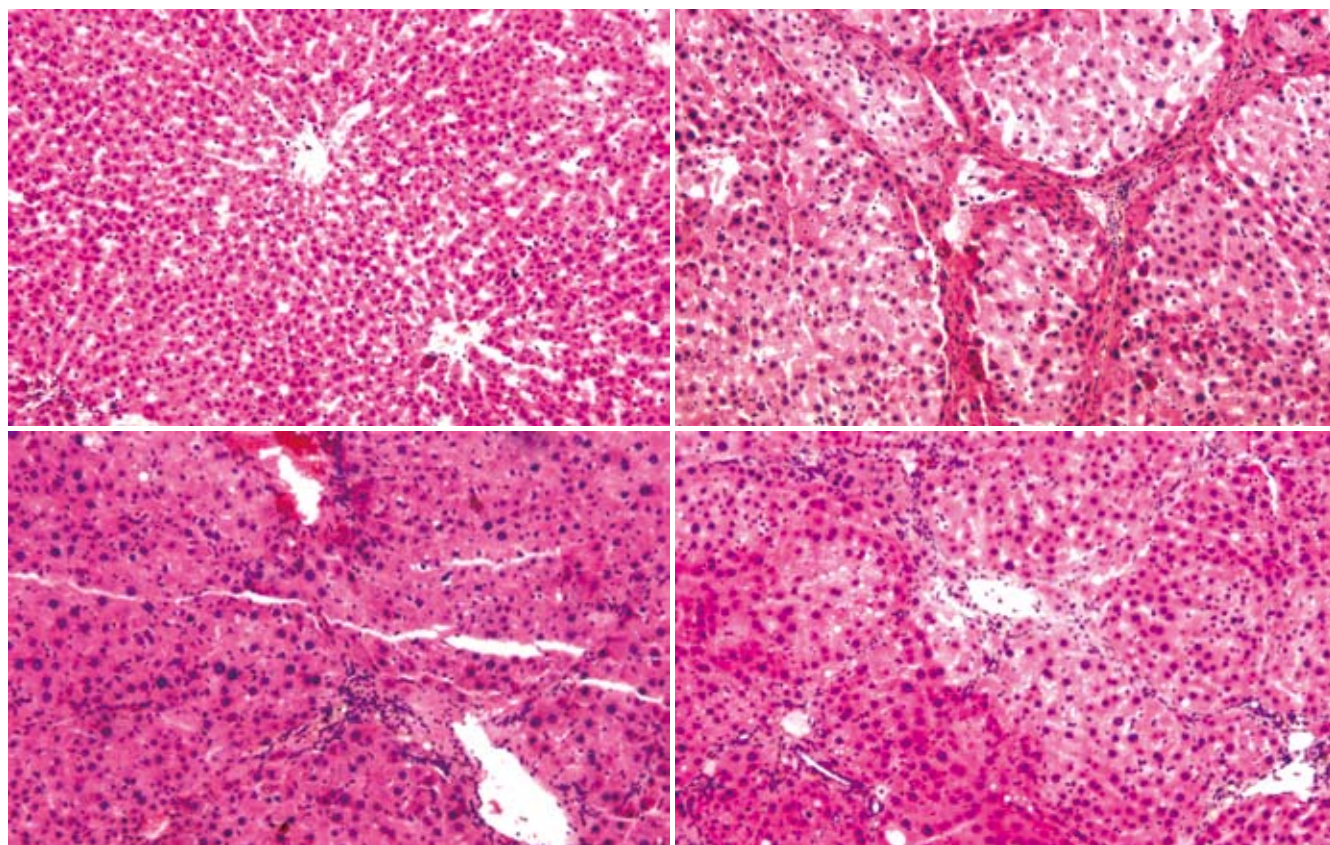
ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年4月28日 第16卷 第12期 (Volume 16 Number 12)



12 / 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

wcj@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

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  
程英升主任医师  
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  
苒新明教授  
陈洪副教授  
陈军贤主任医师  
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  
孙自勤教授  
唐采白副教授  
唐芙爱教授  
唐丽安教授  
田德安主任医师  
童强主任医师  
宛新建副教授  
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  
夏时海副教授  
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

张春清教授  
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  
朱人敬教授  
邹晓平主任医师

#### 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  
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  
傅廷亮教授  
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  
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  
邵永孚教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
沈岩主任医师  
师英强教授  
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  
王要军教授  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
卫洪波教授  
吴德全教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
席启主任医师  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师

徐智教授  
许戈良教授  
严律南教授  
严以群主任医师  
杨广顺教授  
杨维良教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于恩达教授  
于健春教授  
于良春教授  
于则利教授  
郝宝铭教授  
郝正亚副教授  
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  
唐霓副教授  
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  
曾惠平研究员  
杨林副教授  
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

陈克敏教授  
程红岩教授  
褚建国主任医师  
官泳松教授  
韩新巍教授  
胡红杰主任医师  
黄金华副教授  
匡安仁教授  
李健丁教授  
鲁华玉研究员  
施海彬教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐克教授  
扬业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜学

崔毅主任医师  
丁佑铭教授  
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  
倪才方教授  
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  
王玉美研究员

### 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  
阴赅宏研究员  
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  
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4月28日 第16卷 第12期 (总第236期)

述 评	1255 诱导性多潜能干细胞的研究进展和应用前景 刘国强, 洪天配
基础研究	1260 幽门螺杆菌与胃上皮细胞不同作用时间点蛋白质组的差异分析 宋衍燕, 赵飞, 肖迪, 马广源, 孟凡亮, 何丽华, 张建中 1266 复方中药木疏胶囊抗大鼠肝纤维化的免疫机制 高萍, 程留芳, 刘春, 邵泽勇 1273 柴胡皂甙D对实验性大鼠肝癌血管形成的抑制作用 王宝峰, 程延安, 王西京, 刘振国, 马红兵, 白明华, 党双锁, 贾晓黎 1281 肝细胞生成素205与细胞色素C的相互作用 储著朗, 王建, 杨永升, 唐刘君, 陈慧, 杨晓明, 汪思应 1287 选择性环氧合酶-2抑制剂PC407对TNBS诱导的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用 白卉, 张邦乐, 李宇华, 游宇, 郭振军, 孙阳, 梅其炳 1294 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良
临床研究	1299 血清MUC1、MUC2及MUC5AC表达与胃癌的关系 黄晓辉, 徐迎新, 李荣, 刘洪一, 张敏丽 1304 胃癌组织中eIF4E、VEGF和Cyclin D1的表达及其意义 方向明, 胡继军 1309 IQGAP2在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义 孙玉琳, 刘芳, 鲁海珍, 吕宁, 周兰萍, 蔡建强, 刘尚梅, 赵晓航
文献综述	1317 重症急性胰腺炎与胃肠动力障碍的研究进展 何志宇, 陈光远 1323 持续血液净化疗法在重症急性胰腺炎中的作用 郭佳, 黄宗文 1327 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞凋亡调控机制的研究进展 陈少东, 胡义扬 1332 MicroRNAs与p53基因在肿瘤中相互关系的研究进展 李琼, 王阁 1337 早期胚胎发育与肿瘤发生的相关性研究进展 马延磊, 秦环龙
研究快报	1344 HBsAg负载的慢性乙肝患者DCs诱导特异性Th1细胞分化的作用 吴琼, 汪晓莺, 周晓荣, 汤伟, 苏丽 1350 Tec激酶区作用蛋白RAI16的原核表达和纯化 许文, 王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 王东, 李增鹏, 杨志祥
临床经验	1355 TGF- $\alpha$ 和Cyclin E在中医不同证型患者胃病变组织中的表达及相关性 梁卫江, 马业俊, 阎曦, 张万岱, 罗荣城

	<p>1359 慢性胰腺炎诊治分析303例 肖南平, 欧阳钦</p> <p>1364 输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石126例 陈万发, 余忠, 罗强, 王文</p>
<b>致 谢</b>	1368 致谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	<p>1259 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>1265 世界华人消化杂志中文摘要要求</p> <p>1272 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>1280 世界华人消化数字用法标准</p> <p>1293 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>1298 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>1303 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策</p> <p>1308 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>1322 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>1326 世界华人消化杂志2006年检索指标及排名</p> <p>1343 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>1349 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>1354 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>1358 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>1363 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>1367 世界华人消化杂志名词术语标准</p>
<b>封面故事</b>	<p>高萍, 程留芳, 刘春, 邵泽勇. 复方中药木疏胶囊抗大鼠肝纤维化的免疫机制.</p> <p>世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1266-1272</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1266.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1266.asp</a></p>
<b>本期责任人</b>	<p>编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 英文审读 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

# 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 2008-04-28

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总 编 辑 马连生

常务副总编辑 张海宁

编辑部主任 张海宁

期 刊 名 称 世界华人消化杂志

主 管 单 位 山西省科学技术厅

主 办 单 位 太原消化病研治中心

**编辑** 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto: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](mailto: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](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 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》和俄罗斯《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**  
**CN 14-1260/R**

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每份24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

# World Chinese Journal of Digestology

**April 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 12**

<b>EDITORIAL</b>	1255 Research progress and application prospect of induced pluripotent stem cells <i>Liu GQ, Hong TP</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	1260 Sequential proteomic characteristics of AGS cells co-cultured with <i>H pylori</i> strain <i>Song YY, Zhao F, Xiao D, Ma GY, Meng FL, He LH, Zhang JZ</i> 1266 Antifibrotic action of Mushu capsule on rat hepatic fibrosis and its immunologic mechanism <i>Gao P, Cheng LF, Liu C, Shao ZY</i> 1273 Inhibitory effect of saikosaponin-d on the angiogenesis of experimental hepatocarcinoma in rats <i>Wang BF, Cheng YA, Wang XJ, Liu ZG, Ma HB, Bai MH, Dang SS, Jia XL</i> 1281 Identification of interaction between hepatopoietin 205 and cytochrome C <i>Chu ZL, Wang J, Yang YS, Tang LJ, Chen H, Yang XM, Wang SY</i> 1287 Therapeutic effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor PC407 on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats <i>Bai H, Zhang BL, Li YH, You Y, Guo ZJ, Sun Y, Mei QB</i> 1294 Effect of stem cell factor on colon interstitial cells of Cajal in murine with diabetes mellitus <i>Xu LM, Lin L, Tang YR, Zhang HJ, Li XL</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	1299 Relationship between serum expression of MUC1, MUC2 and MUC5AC and gastric cancer <i>Huang XH, Xu YX, Li R, Liu HY, Zhang ML</i> 1304 Expression of eukaryotic initiation factor 4E, vascular endothelial growth factor and Cyclin D1 in gastric carcinoma and their significances <i>Fang XM, Hu JJ</i> 1309 Expression of IQGAP2 and its clinical significance in hepatocellular carcinoma <i>Sun YL, Liu F, Lu HZ, Lv N, Zhou LP, Cai JQ, Liu SM, Zhao XH</i>
<b>REVIEW</b>	1317 Advances in study of severe acute pancreatitis and gastrointestinal dysmotility <i>He ZY, Chen GY</i> 1323 Effect of continuous blood purification on severe acute pancreatitis <i>Guo J, Huang ZW</i> 1327 Advances in regulation mechanism of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease <i>Chen SD, Hu YY</i> 1332 Research progress of the relationship between microRNAs and p53 gene in oncogenesis stasis by purgation <i>Li Q, Wang G</i> 1337 Research progress in correlation between early embryo development and tumorigenesis <i>Ma YL, Qin HL</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	1344 Effect of dendritic cells loaded with HBsAg on the differentiation of HBsAg-specific T helper 1 cells in patients with chronic hepatitis B

	<p><i>Wu Q, Wang XY, Zhou XR, Tang W, Su L</i></p> <p>1350 Prokaryotic expression and purification of retinoic acid induced 16 interacting with Tec kinase domain</p> <p><i>Xu W, Wang G, Deng J, Yang J, Zheng JJ, Wang HZ, Hu Q, Wang D, Li ZP, Yang ZX</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1355 Expression of transforming growth factor <math>\alpha</math> and Cyclin E and their correlation in chronic gastric lesion tissues from patients with different TCM types</p> <p><i>Liang WJ, Ma YJ, Yan X, Zhang WD, Luo RC</i></p> <p>1359 Diagnosis and treatment of chronic pancreatitis: an analysis of 303 cases</p> <p><i>Xiao NP, Ou-Yang Q</i></p> <p>1364 Treatment of bile duct stones with ureteroscopic air-pressure ballistic lithotripsy: an analysis of 126 cases</p> <p><i>Chen WF, Yu Z, Luo Q, Wang W</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>1368 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Gao P, Cheng LF, Liu C, Shao ZY.</i> Immunologic mechanism in antifibrotic action of Mushu capsule in rats.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(12): 1266-1272</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1266.asp">www.wjgnet.com/1009-3079/16/1266.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> English Language Reviewer: <i>Xian-Lin Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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 April 28, 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@wcjdnet.com](mailto:wjcd@wcjdnet.com)

#### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

#### PUBLISHING

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

#### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

#### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

#### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

#### SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

#### SUBSCRIPTION

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

#### CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

#### COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

#### SPECIAL STATEMENT

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

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at [www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp](http://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*

# 诱导性多潜能干细胞的研究进展和应用前景

刘国强, 洪天配

刘国强, 洪天配, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100083  
洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事干细胞分化研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30771032, No. 30700879  
国家973、863重大项目子课题资助项目, No. 2006CB503900,  
No. 2006AA02A112  
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No.  
20050001146  
作者贡献分布: 本文设计和指导由洪天配完成; 写作由刘国强完成。  
通讯作者: 洪天配, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京  
大学第三医院内分泌科. tpho66@bjmu.edu.cn  
电话: 010-62017691 传真: 010-62017700  
收稿日期: 2008-03-05 修回日期: 2008-03-27

## Research progress and application prospect of induced pluripotent stem cells

Guo-Qiang Liu, Tian-Pei Hong

Guo-Qiang Liu, Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30771032, No. 30700879; the National Major Fund Program (973, 863 Program), No. 2006CB503900, No. 2006AA02A112; and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20050001146

Correspondence to: Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, 49 Huanyuan North Road, Haidian District, Beijing 100083, China. tpho66@bjmu.edu.cn

Received: 2008-03-05 Revised: 2008-03-27

## Abstract

Recent reports demonstrate that mouse somatic cells can be directly reprogrammed into pluripotent embryonic stem (ES) cell-like cells by in vitro introduction of four transcription factors, Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4. These cells are designated as induced pluripotent stem (iPS) cells. Similarly, the transfection with these four transcription factors or a cocktail of Oct4, Sox2, Nanog and LIN28 has been shown to be sufficient to reprogram human somatic cells to iPS cells that are indistinguishable from human ES cells. Since reactivation of the c-Myc transgene has been reported to increase tumorigenicity in the chimeras and progeny mice, a modified protocol with only three factors (Oct4, Sox2 and Klf4) has been recently used to make mouse and human iPS cells from adult dermal fibroblasts. Based upon the data from recent publications,

human iPS cell lines should be useful in the establishment of new disease models and in drug development, and might require further investigation about the feasibility in transplantation medicine.

**Key Words:** Gene transfection; Somatic cell reprogramming; Stem cell; Transcription factor

Liu GQ, Hong TP. Research progress and application prospect of induced pluripotent stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1255-1259

## 摘要

研究证实采用体外导入Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4等4个转录因子可将小鼠体细胞直接重构成ES细胞样的多潜能细胞, 这类细胞被命名为诱导性多潜能干细胞(iPS细胞)。同样, 转染上述因子或Oct4、Sox2、Nanog、LIN28等4个因子也能够使人类体细胞重构成iPS细胞, 后者与人类ES细胞的基本特征相似。据报道, 由于转染基因c-Myc的重新激活可使嵌合体子代小鼠的肿瘤发生增加, 故近期建立了一种仅使用3个因子(Oct4、Sox2和Klf4)的改良方案, 也可将成年小鼠和成人皮肤成纤维细胞诱导转化为iPS细胞。近期文献资料表明, 人类iPS细胞系对于制备疾病的新模型和药物研究有帮助, 但其用于移植治疗的应用前景则需要进一步加以考证。

**关键词:** 基因转染; 体细胞重构; 干细胞; 转录因子

刘国强, 洪天配. 诱导性多潜能干细胞的研究进展和应用前景. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1255-1259

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1255.asp>

## 0 引言

干细胞(stem cells)是人体及其各种组织细胞的初始来源, 其最显著的生物学特征是既有自我更新和不断增殖的能力, 又有多向分化的潜能。干细胞根据不同的来源分为成体干细胞(somatic stem cells)和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)。成体干细胞包括骨髓间充质干细胞、胰腺干细胞、神经干细胞等成体组织中存在的

## ■背景资料

干细胞分为成体干细胞和胚胎干(ES)细胞, ES细胞是从囊胚内细胞团中分离得到的一种二倍体细胞, 具有发育和分化成为机体内几乎所有组织细胞类型的潜能。但ES细胞的研究一直存在激烈的伦理学争论, 为避开伦理学争论, 国外学者通过体细胞体外基因转染技术建立诱导性多潜能干(iPS)细胞系。

## ■同行评议者

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; 朴云峰, 教授, 吉林大学第一医院临床医消化科

### ■ 相关报道

Hanna *et al* 近期已经进行了iPS细胞应用基础研究的首次尝试, 利用人类镰状细胞性贫血的小鼠动物模型, 取其尾尖部皮肤的成纤维细胞, 通过导入Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc基因, 获得自体iPS细胞。

干细胞, 理论上在特定条件下可分化为特定的组织器官, 是修复和再生的基础。ES细胞是从着床前的早期胚胎(囊胚)内细胞团中分离得到的一种二倍体细胞, 理论上具有发育和分化成为机体内几乎所有组织细胞类型的潜能。治疗性克隆是开展ES细胞研究的终极目标, 但有关ES细胞和治疗性克隆的研究一直存在激烈的伦理学争论<sup>[1-2]</sup>。近1年来, 为避开伦理学争论, 国外学者通过体细胞体外基因转染技术建立诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)系。本文简要介绍iPS细胞的研究概况和应用前景。

## 1 胚胎干细胞研究的应用前景及面临的困难

1981年, ES细胞的分离和培养首先在小鼠中获得成功, 是至今研究最广泛、最成熟的干细胞体系。随后, 牛、羊等大动物的ES细胞分离和培养也相继获得成功。1995年, 美国威斯康辛大学Thomson *et al* 从恒河猴囊胚中分离并建立了第一个灵长类的ES细胞系。1998年, 该研究小组从体外受精形成的囊胚中首次分离并建立了人类ES(hES)细胞系<sup>[3]</sup>, 由此推动了干细胞研究热潮的兴起。hES细胞具有以下特征: (1)体外扩增培养条件下具有强大的增殖能力, 并且保持稳定的正常二倍体染色体核型和带型; (2)具有较高的端粒酶活性和碱性磷酸酶表达; (3)具有转录因子Oct4的表达; (4)具有阶段特异性胚胎抗原-3(stage-specific embryonic antigen-3, SSEA-3)、SSEA-4等特异性表面抗原的表达; (5)具有分化的多潜能性, 将hES细胞注射到小鼠皮下可形成畸胎瘤, 其中含3个胚层的组织细胞。上述特征可用于hES细胞建系的鉴定<sup>[3-4]</sup>。

治疗性克隆是指采用体细胞核转移(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术将患者体细胞核与供体去核卵母细胞重构形成克隆囊胚, 分离带有患者基因型的hES细胞, 进而在体外诱导分化为特定的自体组织细胞用于疾病治疗。治疗性克隆是开展hES细胞建系和诱导定向分化研究的根本意义所在。2004年, 韩国首尔大学黄禹锡 *et al* 报道利用SCNT技术获得人类克隆囊胚来源的hES细胞系<sup>[5]</sup>, 通过该技术方案可制备患者特异性的ES细胞<sup>[6]</sup>, 但这些研究结果后来被证实为学术造假。2007-11-22, 美国科学家Mitalipov领导的研究团队报道采用纺锤体显像系统直视下的改良SCNT技术建立猕猴ES细胞系<sup>[7]</sup>, 这是在灵长类动物中通过克隆技术成功建立ES细胞

系的首次报道, 说明SCNT的关键技术难题在非人灵长类中已经被破解。2008-2-21, French *et al*<sup>[8]</sup> 报道采用传统的抽吸或挤压去核方法的SCNT技术, 将青年女性的去核卵母细胞与成人男性成纤维细胞的细胞核进行融合, 从而建立了人类克隆胚胎, 其中发育成为囊胚的比率为23%。然而, 在所建立的5个克隆囊胚中, 只有1个囊胚被证实同时具有供体细胞核的基因组DNA和卵母细胞的线粒体DNA, 另外2个囊胚仅被证实具有供体细胞核的基因组DNA。此外, 该研究小组目前尚未建立相应的hES细胞系。提示SCNT技术距离临床应用还有一些关键技术环节需要得到破解。

截止2007-12底, 全世界已在美国国立卫生研究院(NIH)注册的hES细胞系共有78个。hES细胞研究的应用前景主要是移植治疗, 在组织工程学领域中以hES细胞作为种子细胞, 可为临床上细胞、组织或器官的移植治疗提供大量的材料。通过控制hES细胞分化培养环境、转染能够促进ES细胞定向分化的关键分子基因等体外诱导分化策略, 可获得特异性的组织细胞类型。这类细胞用于移植治疗, 将给糖尿病、帕金森氏病、脊髓损伤、白血病、心肌损伤、肾衰竭、肝硬化等疾病的治疗带来新的希望。此外, 利用基因打靶技术使外源性DNA与ES细胞中的相应区域基因进行重组, 或靶向破坏ES细胞等位基因造成基因纯合子失效的方法<sup>[9-10]</sup>, 可能用于治疗某些遗传性疾病。hES细胞还可用于研究人类胚胎发育、疾病的发生机制、药物筛选与药物研发等。

一直以来, hES细胞研究面临着许多难题和争议, 主要包括以下几个方面: (1)供体卵母细胞的来源困难, hES细胞建系效率低。在一项美国学者的研究中, 来自12名供卵者的162个卵母细胞有110个(68%)体外受精成功, 其中101个受精卵有50个(50%)发育至扩张的囊胚阶段, 40个囊胚采用免疫手术处理形成18个内细胞团, 最终仅建立了3个hES细胞系<sup>[11]</sup>。此外, SCNT技术的不成熟必将需要进一步耗费更多的人类卵母细胞, 故而来其来源难以得到保证。(2)免疫排斥反应, 除非采用SCNT技术, 否则患者对hES细胞分化而来的各种细胞和组织仍然存在免疫排斥反应。(3)hES细胞具有成瘤性, 移植到受体的体内后有发展为肿瘤的可能性, 即使采用SCNT技术、给移植细胞设置自杀基因等应对措施, 也不一定能够很好地解决这个问题<sup>[12-14]</sup>。(4)体外保持hES

细胞全能性的条件非常复杂, hES细胞在体外发育分化成为完整的器官目前也难以做到。(5)伦理学争论, 与上述困难相比, 伦理问题是hES细胞研究面临的障碍, 由于hES细胞研究必须摧毁人类早期胚胎, 并且治疗性克隆研究存在导向生殖性克隆的潜在风险, 这些已经触及了人类伦理观念甚至宗教和法律问题, 从而引起社会各界激烈的争议, 以至于美国总统布什曾两度否决了有关放宽美国联邦政府资助ES细胞研究的提案。

## 2 诱导性多潜能干细胞的研究进展

为避免hES细胞和治疗性克隆研究的伦理学争论, 需要找到一种替代途径, 以便将人类的体细胞直接转化为多潜能干细胞, 为患者提供“个性化”的自体干细胞。2003年, Gurdon研究小组发现, 将已完全分化的小鼠胸腺细胞或成人外周血淋巴细胞的细胞核注入爪蟾卵母细胞后, 哺乳动物细胞核的分化标志物丧失, 而哺乳动物干细胞中最具特征性的标志物Oct4则呈高表达, 提示哺乳动物细胞核可直接被两栖动物卵母细胞核泡所重构从而表达Oct4<sup>[15]</sup>, 这项研究开启了诱导人类体细胞转变成干细胞的新思路。2006年, 日本京都大学Yamanaka研究小组采用体外基因转染技术, 从24个因子中筛选出Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4等4个转录因子, 通过逆转录病毒将上述4个转录因子导入胚胎小鼠成纤维细胞或成年小鼠尾部皮肤成纤维细胞, 在小鼠ES细胞的培养条件下获得了Fbx15<sup>+</sup>的多潜能干细胞系, 该细胞系在细胞形态、生长特性、表面标志物、形成畸胎瘤等方面与小鼠ES细胞非常相似, 而在基因表达谱、DNA甲基化方式及形成嵌合体动物方面却不同于小鼠ES细胞, 故将其命名为iPS细胞<sup>[16]</sup>。

2007-07, Yamanaka研究小组进一步用Nanog代替Fbx15进行筛选, 得到了Nanog<sup>+</sup>的iPS细胞系, 该iPS细胞不仅在细胞形态、生长特性、标志物表达、移植到小鼠皮下可形成包含3个胚层组织细胞结构的畸胎瘤等方面与小鼠ES细胞非常相似, 而且在DNA甲基化方式、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等方面也与小鼠ES细胞几乎完全相似。此外, 研究还发现重新激活原癌基因c-Myc是嵌合体动物出现肿瘤形成的原因; 而转染的上述4个基因在iPS细胞中并没有表达, 表明这些基因只在诱导过程中起作用, iPS细胞保持多潜能性状态的原因是内源性转录因子Nanog基因的表达<sup>[17]</sup>。同时独立发

表的另一篇来自美国科学家的研究论文同样证实了上述4个转录因子足以使小鼠成纤维细胞在体外诱导重构成为类似小鼠ES细胞的iPS细胞<sup>[18]</sup>。新近, Yamanaka研究小组报道了小鼠肝细胞和胃上皮细胞同样也可被重构成为iPS细胞, 遗传学细胞谱系示踪分析显示, iPS细胞源自谱系定型的体细胞的直接重构, 而未发现逆转录病毒整合到特定的基因位点与细胞核重构相关<sup>[19]</sup>。

2007-11, Yamanaka研究小组利用相同的技术, 将上述同样的4个转录因子导入到人类皮肤成纤维细胞中, 也成功获得了iPS细胞。原代人类成纤维细胞样滑膜细胞和源自新生儿成纤维细胞的细胞系同样也可被重构成为iPS细胞。这类iPS细胞在细胞形态、增殖能力、表面抗原标志、基因表达谱、多潜能干细胞特异性基因的表观遗传学状态、端粒酶活性等方面与hES细胞相似, 并且在体外培养时和在小鼠体内畸胎瘤形成中均可分化为3个胚层的不同细胞类型<sup>[20]</sup>。与此同时, 威斯康辛大学Thomson研究小组也报道了成功诱导胎儿成纤维细胞转化为具有hES细胞基本特征的人类iPS细胞, 所不同的是他们使用慢病毒作为载体, 并在14个候选基因中选择了Oct4、Sox2、Nanog、Lin28等4个基因进行转导<sup>[21]</sup>。Park *et al*<sup>[22]</sup>利用来自胎儿、新生儿及成人的皮肤或肺部的原代成纤维细胞, 其中包括来自1名健康男性皮肤活检得到的成纤维细胞, 采用Yamanaka研究小组的策略也获得了相同的结果。他们还发现Oct4和Sox2在诱导重构为iPS细胞过程中是必需的, 正是这两个转录因子维持了人类iPS细胞的多潜能性, 而Klf4和c-Myc的作用是改变染色质的结构, 从而有利于Oct4和Sox2的结合, 以提高诱导的效率。此外, 这项研究的重要意义在于将取自皮肤活检的成纤维细胞诱导为iPS细胞。上述研究表明, 从活检人类皮肤组织中提取体细胞后进行诱导以制备患者特异性的干细胞是可行的, 因而有望克服细胞移植治疗中存在的免疫排斥反应。

鉴于导入c-Myc基因可使嵌合体小鼠的肿瘤发生率高达20%, 可能会阻碍其未来的临床应用<sup>[17]</sup>。因此, Yamanaka研究小组新近报道, 小鼠和人类皮肤成纤维细胞转染c-Myc以外的其余3个基因, 在调整培养条件后也可得到iPS细胞。去除c-Myc基因尽管可使未来临床应用的安全性显著提高, 但形成iPS细胞的效率却明显降低。虽然嵌合体小鼠在100 d内没有肿瘤发生, 但逆转录病毒的再激活仍有导致肿瘤发生的潜在

### ■应用要点

人类iPS细胞系可为患者提供“个性化”的自体干细胞, 为许多退行性或损伤性疾病的治疗学发展带来巨大的希望, 对于制备疾病的新模型和药物研发也有帮助, 但其用于移植治疗则需要进一步加以考证。

### ■名词解释

iPS细胞: 通过基因转染技术将某些因子导入动物或人的体细胞, 可将体细胞直接重构成ES细胞样的多潜能细胞, 该类细胞在细胞形态、生长特性、表面标志物和形成畸胎瘤等方面与ES细胞非常相似。

风险<sup>[23]</sup>。同样, 慢病毒转染技术可能也存在类似的风险。

### 3 诱导性多潜能干细胞的应用前景

Hanna *et al*<sup>[24]</sup>近期已经进行了iPS细胞应用基础研究的首次尝试, 利用人类镰状细胞性贫血的小鼠动物模型, 取其尾尖部皮肤的成纤维细胞, 通过导入Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc基因, 获得自体iPS细胞; 进一步采用基因特异性打靶技术对人类镰状血红蛋白等位基因进行纠正后, 将体外培养的自体iPS细胞诱导为造血干细胞, 移植后可治疗动物模型的镰状细胞性贫血。此外, 人类iPS细胞目前可能用于制备疾病的新模型以研究发病机制, 还可能用于药物研发中以鉴定药物治疗反应<sup>[21]</sup>。

iPS细胞研究成果在干细胞研究领域无疑具有里程碑意义的突破, 多种体细胞经过体外的培养和诱导均可转变成为具有多向分化潜能的干细胞, 并且证明了儿种已知的转录因子可以使已分化的体细胞逆转为未分化的状态, 从而阐明了细胞的巨大可塑性。由于iPS细胞研究不再使用人类早期胚胎, 故卵母细胞来源的难题得到了合理的解决, 伦理学的争论将随之平息, 自体iPS细胞来源的细胞移植给患者自身也将使免疫排斥反应的难题迎刃而解。尽管如此, iPS细胞在应用于临床之前, 还面临许多问题; (1)逆转录病毒和慢病毒载体导致肿瘤发生的潜在风险需要加以克服; (2)需进行深入的研究, 比较iPS细胞和hES细胞在细胞生物学特性、定向分化机制等方面是否具有显著的差异; (3)需建立一种新的方法以避免基因转染带来的潜在风险, 如通过某些药物或因子激活体细胞中业已存在的上述转录因子的方式以替换外源性基因转染的方式, 或者用某些因子的短暂性表达代替永久性导入<sup>[25]</sup>; (4)提高制备iPS细胞的效率。

需指出的是, iPS细胞研究的突破并不意味着ES细胞研究的衰亡, 因为iPS细胞所使用的转录因子正是来源于ES细胞长期研究的积淀, 并且治疗性克隆在近期也取得某些非常重要的进展。尽管iPS细胞研究的突破为许多退行性或损伤性疾病的治疗学发展带来巨大的希望, 但其真正的临床应用前景尚需进一步观察和考证。

### 4 参考文献

1 洪天配. 干细胞用于治疗糖尿病的研究: 梦想与现实

的距离. 中国糖尿病杂志 2008; 16: 65-67

- 2 洪天配. 胰腺干细胞研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2005; 13: 286-289
- 3 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147
- 4 Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod* 2006; 21: 217-222
- 5 Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669-1674
- 6 Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, Kim SJ, Park SW, Kwon HS, Lee CK, Lee JB, Kim JM, Ahn C, Paek SH, Chang SS, Koo JJ, Yoon HS, Hwang JH, Hwang YY, Park YS, Oh SK, Kim HS, Park JH, Moon SY, Schatten G. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; 308: 1777-1783
- 7 Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450: 497-502
- 8 French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485-493
- 9 Sangiuolo F, Scaldaferrri ML, Filaretto A, Spitalieri P, Guerra L, Favia M, Caroppo R, Mango R, Bruscia E, Gruenert DC, Casavola V, De Felici M, Novelli G. Cftr gene targeting in mouse embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR). *Front Biosci* 2008; 13: 2989-2999
- 10 Huh CG, Hakansson K, Nathanson CM, Thorgeirsson UP, Jonsson N, Grubb A, Abrahamson M, Karlsson S. Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol Pathol* 1999; 52: 332-340
- 11 Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001; 76: 132-137
- 12 Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404
- 13 Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 933-936
- 14 Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 432-438
- 15 Byrne JA, Simonsson S, Western PS, Gurdon JB. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr Biol* 2003; 13: 1206-1213
- 16 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent

- stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676
- 17 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-317
- 18 Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448: 318-324
- 19 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* 2008:
- 20 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872
- 21 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920
- 22 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141-146
- 23 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-106
- 24 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920-1923
- 25 Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 467-473

#### ■同行评价

本文对诱导性多潜能干细胞的研究进展和应用前景进行概述分析, 选题新颖, 不涉及医学伦理, 表述清晰, 文笔流畅, 具有较好的学术价值。

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 •

### 世界华人消化杂志英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)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; (2)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”; (3)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; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)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; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 幽门螺杆菌与胃上皮细胞不同作用时间点蛋白质组的差异分析

宋衍燕, 赵飞, 肖迪, 马广源, 孟凡亮, 何丽华, 张建中

## ■背景资料

人胃腺癌上皮细胞(AGS)是目前最为常用的研究 *H pylori* 和胃癌相关的细胞模型, 本实验拟应用 *H pylori* 国际标准菌株26695和AGS细胞共同孵育, 在不同时间点取样, 以期发现二者相互作用时对蛋白表达影响的时序性变化, 为更好的理解 *H pylori* 感染和致病机制提供有意义的线索。

宋衍燕, 赵飞, 肖迪, 马广源, 孟凡亮, 何丽华, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京市 102206  
宋衍燕, 在读博士, 主要从事幽门螺杆菌与胃黏膜上皮细胞相互作用表达谱芯片与蛋白质组学的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 39870032

“十一五”国家科技支撑计划重点资助项目, No. 2007BAI04B02

作者贡献分布: 本研究由宋衍燕及张建中设计; 研究过程由宋衍燕, 马广源, 孟凡亮及何丽华完成; 蛋白质谱鉴定由宋衍燕及肖迪完成; 数据分析由宋衍燕及赵飞完成; 本论文写作由宋衍燕及张建中完成。

通讯作者: 张建中, 102206, 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所. helico99@sina.com

电话: 010-61739456 传真: 010-61730233

收稿日期: 2008-03-12 修回日期: 2008-04-08

## Sequential proteomic characteristics of AGS cells co-cultured with *H pylori* strain

Yan-Yan Song, Fei Zhao, Di Xiao, Guang-Yuan Ma, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang

Yan-Yan Song, Fei Zhao, Di Xiao, Guang-Yuan Ma, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 39870032, and the Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period, No. 2007BAI04B02

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. helico99@sina.com

Received: 2008-03-12 Revised: 2008-04-08

## Abstract

**AIM:** To analyze the differential expression of proteome in human gastric adenocarcinoma epithelial AGS cells co-cultured with *H pylori*.

**METHODS:** The samples of AGS cells co-cultured with *H pylori* 26695 strain at three time-points (0.5, 2 and 4 h) were collected and separated by 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique and computer-assisted image analysis was used to analyze the differential proteomic expression. The significantly differentially expressed proteins were rec-

ognized and identified with the 4700 proteomics discovery system.

**RESULTS:** There were 66 protein spots that were significantly differentially expressed at different time-points, 34 (corresponding to 16 kinds of proteins) of which were identified with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF-TOF). At 2-h time-point, 8 kinds of proteins were up-regulated obviously, of which 2 originated from the cells and 6 from *H pylori*. At the 4-h time-point, 4 kinds of cell-originated proteins were down-regulated, and 4 kinds of new proteins were observed. Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit, HpaA, HSP 60 and peroxiredoxin were up-regulated at the early stage of co-infection. However, at the late stage of co-infection, two cell-originated proteins (cyclophilin A, nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide) and two *H pylori*-originated proteins (urease, non-heme iron protein) were found to express.

**CONCLUSION:** During the interaction between AGS cells and *H pylori*, the expression of proteins is associated with adhesion change in the early stage, followed by a favorable alteration in the survival and proliferation of *H pylori* as well as immunologic escape and pathological erosion.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Human gastric adenocarcinoma epithelial cell; Co-culture; Proteome

Song YY, Zhao F, Xiao D, Ma GY, Meng FL, He LH, Zhang JZ. Sequential proteomic characteristics of AGS cells co-cultured with *H pylori* strain. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1260-1265

## 摘要

**目的:** 分析幽门螺杆菌(*H pylori*)与人胃腺癌上皮细胞(human gastric adenocarcinoma epithelial, AGS)的相互作用蛋白质组学差异。

**方法:** 采用双向凝胶电泳分离 *H pylori* 26695

## ■同行评议者

李玉明, 教授, 江苏省南通市第一人民医院消化内科

株与AGS细胞相互作用0.5、2、4 h时间点的细胞和黏附菌的全蛋白样品, 考马斯亮兰染色, ImageMaster 2D图像分析软件比较分析, 识别差异蛋白, 将差异蛋白点进行胶内酶解, 经基质辅助电离解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF/MS)获得肽质量指纹图谱(PMF), 通过搜寻蛋白质数据库完成对差异蛋白的鉴定。

**结果:** 对0.5、2、4 h时间点图谱差异蛋白点分析共发现主要差异蛋白点66个, 对其中34个(共对应16种蛋白)最终完成准确鉴定, 2 h后8种蛋白开始上调, 其中2种是细胞来源, 6种 *H pylori* 来源; 4 h时4种细胞来源蛋白下调, 并有4种新的蛋白开始被观察到。在共感染的早期, 细胞的琥珀酸脱氢酶、*H pylori* 的抗氧化酶类、黏附素以及HSP 60表达上调。感染晚期主要是细胞来源的亲环素A、新生多肽相关复合物 $\alpha$ 多肽开始表达, *H pylori* 来源的尿素酶、非血红素铁蛋白等蛋白明显出现在黏附菌成分中。

**结论:** *H pylori* 与AGS细胞相互作用过程中, 细菌和细胞蛋白表达均存在明显时序性变化, 早期相互作用则主要表现为与黏附等有关的蛋白表达变化, 后期向有利细菌存活和增殖的方向发展, 并呈现出与免疫逃逸和病理损伤相关的变化。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 人胃腺癌上皮细胞; 共培养; 蛋白质组

宋衍燕, 赵飞, 肖迪, 马广源, 孟凡亮, 何丽华, 张建中. 幽门螺杆菌与胃上皮细胞不同作用时间点蛋白质组的差异分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1260-1265  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1260.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是一种可在人胃黏膜定植, 并与慢性活动性胃炎、萎缩性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤<sup>[1-2]</sup>等疾病发生相关的革兰氏阴性菌, 是WHO确认的唯一与癌症发生密切相关的细菌, 研究较多, 但结果千差万别<sup>[3-6]</sup>, 具体的*H pylori* 的致癌机制仍不清楚。人胃腺癌上皮细胞(human gastric adenocarcinoma epithelial, AGS)是目前最为常用的研究*H pylori* 和胃癌相关的细胞模型, 本实验拟应用*H pylori* 国际标准菌株26695和AGS细胞共同孵育, 在不同时间点取样, 以期发现二者相互作用时对蛋白表达影响的时序性变化, 为更好的理解*H pylori* 感染和致病机制提供有意义的线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *H pylori* 26695菌株, 全基因组测序国际标准菌株, 美国华盛顿大学医学院分子生物学系惠赠, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室保存。AGS细胞(ATCC CRL1739), 北京大学公共卫生学院惠赠。Bradford试剂盒购自Biorad公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 蛋白样品制备:** AGS细胞于100 mL/L FBS 1640培养基, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 气体培养环境, 37℃培养48 h; *H pylori* 26695接种于含50 mL/L 绵羊全血哥伦比亚琼脂平板上, 置50 mL/L O<sub>2</sub>, 100 mL/L CO<sub>2</sub>, 850 mL/L N<sub>2</sub> 的微需氧气体环境中37℃培养72 h后刮取菌苔用PBS洗3次, 5000 g 离心10 min, 去上清, 充分悬浮细菌, 测定A<sub>600</sub>值, 按照A<sub>600</sub> = 2.2 × 10<sup>8</sup>, 细胞每培养瓶计数2 × 10<sup>6</sup>, 细胞与细菌的比例按照1 : 300, 二者分别相互作用0.5, 2, 4 h, 弃去细胞培养液体, 预冷的PBS洗3次, 细胞刮刮取细胞培养皿底部的细胞, PBS液10 mL, 4000 r/min, 4℃离心10 min, 计3次。每皿细胞平均加入1.5 mL的裂解液, 冰浴30 kHz 超声, 超声2 s间隔2 s直至完全溶解; 加入蛋白酶、核酸酶抑制剂, 10 μL/mL; 室温1 h, 12 000 r/min, 4℃离心30 min, 取上清<sup>[7]</sup>。蛋白定量方法按Bradford<sup>[8]</sup>方法进行。

**1.2.2 2-DE:** 等电聚焦<sup>[9-10]</sup>(IEF)使用24 cm pH3-pH10非线性干胶条(GE Healthcare), 设置聚焦仪(Amersham Biosciences产品)程序: 20℃表面温度, 电流强度50 μA/胶条, 30 V, 6 h; 60 V, 6 h; 100 V, 30 min; 300 V, 1 h; 600 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 10 h; 聚焦至VhT 90 000左右。等电聚焦结束后, 将干胶条分别在130 mmol/L的DTT(Amersham Biosciences产品)和135 mmol/L的碘乙酰胺(Amersham Biosciences产品)中振荡平衡15 min后转至125 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 使用垂直电泳仪(Ettan DALT twelve System, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)跑二向电泳, 25℃, 自动泵, 2.5 W/胶, 30 min, 18 W/胶, 4.5 h。考马斯亮兰染色<sup>[11]</sup>, 扫描仪采集图像, ImageMaster 2D Platinum 5.0分析软件分析图像, 以增加或降低1.5倍以上做为标准, 确定差异蛋白点。用自动切点仪(SpotPicker, Amersham Biosciences产品)切下各差异点, 胶粒用300 mL/L 乙腈的0.1 mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 脱色, 采用胰酶(Sigma产品)进行胶上蛋白酶解。

**1.2.3 质谱鉴定:** ABI4700时间飞行质谱仪进行

## ■ 研发前沿

*H pylori* 与人胃腺癌上皮细胞相互作用是研究的经典思路, 但具体致病机制目前尚不清楚。

### ■ 相关报道

李波清 *et al* 对胃癌和非胃癌来源的菌株进行蛋白质学分析, 发现HSP60存在丙氨酸和苏氨酸的变异, 推测这一结构域可能是区分胃癌与非胃癌菌株的分子特征之一。

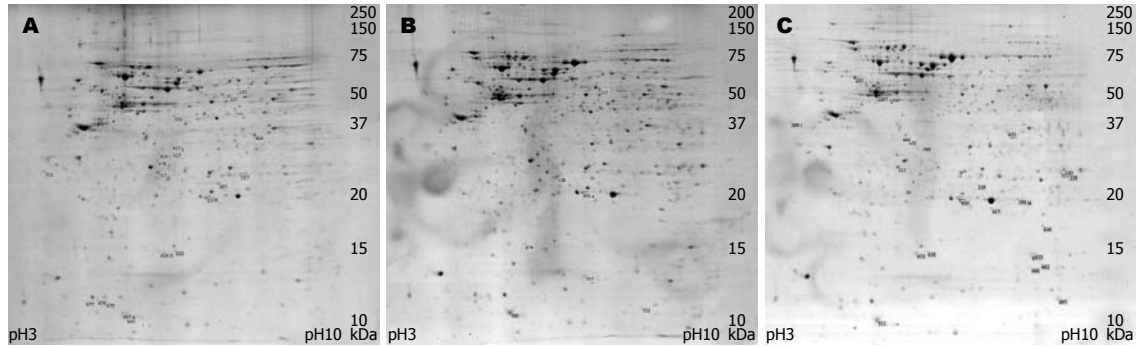


图 1 *H. pylori*与AGS相互作用0.5、2、4 h 2-DE图谱. A: 0.5 h; B: 2 h; C: 4 h.

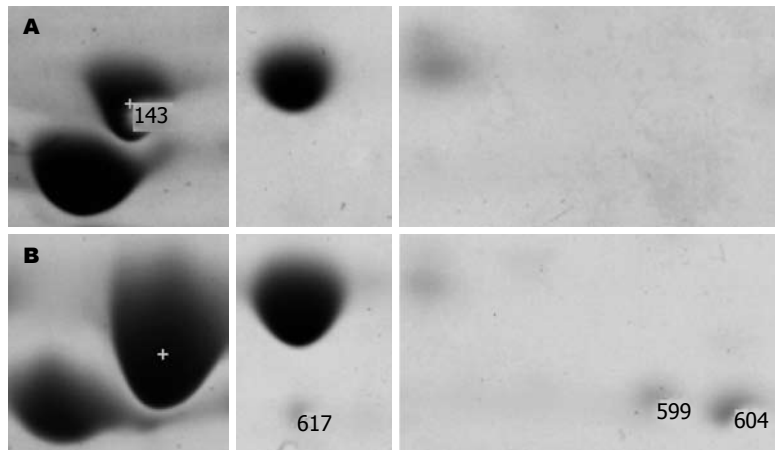


图 2 差异点在图谱上的位置. A: 0.5 h 2-DE图谱; B: 4 h 2-DE图谱.

质谱分析<sup>[12]</sup>, Nd: YAG激光器, 335 nm, 200 Hz激光激发, 应用GSP Explorer Workstation软件搜索NCBI数据库。

## 2 结果

2.1 2-DE图谱及差异蛋白图谱 *H. pylori*与AGS细胞共孵育0.5 h 2-DE图谱中识别蛋白点691个, 2 h蛋白点693个, 4 h蛋白点710个(图1). 蛋白图谱展示AGS细胞和黏附在细胞上的*H. pylori*菌体全蛋白, 应用ImageMaster 2D Platinum 5.0分析软件分析以volume $\geq$ 1.5倍以上作为差异点, 将2 h和4 h图谱分别与0.5 h图谱分析, 共发现差异蛋白点66个, 差异点的情况如图2所示。

2.2 2-DE图谱差异点的质谱鉴定结果 差异点切下, 酶解后经过MALDI-TOF/TOF-MS鉴定, 鉴定出34个蛋白, 鉴定蛋白的等电点和分子量基本与理论值相符, 质谱鉴定结果如表1所示. 共有16种, 其中8种蛋白自2 h开始上调, *H. pylori*来源的6种, 分别是热休克蛋白(heat shock protein, HSP)60、硫氧还蛋白、烷基过氧化物还原酶、神经氨酸乳糖结合原纤维血凝素(neuraminyl-lactose-binding hemagglutinin homolog, NLBH, HpaA)、巯基过氧化物还原酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽

酶, 细胞来源的2种, 分别是琥珀酸脱氢酶、泛醌-细胞色素C还原酶; 4种蛋白下调, 全部是细胞来源, 包括ATP合成酶、肌动蛋白、过氧化物酶6(peroxiredoxin 6, PDX6), 未命名蛋白; 有4种蛋白在4 h蛋白图谱提示开始表达: 细胞来源的亲环素A(cyclophilinA, CyPA)、新生多肽相关复合物 $\alpha$ 多肽(nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide, NAC)以及*H. pylori*来源的尿素酶、非血红素铁蛋白。

## 3 讨论

胃癌的发生发展是多阶段、很多因素参与这个过程, *H. pylori*慢性感染与此密切相关, 具体机制尚未清楚. 本实验结果显示0.5、2、4 h三个时间点*H. pylori*与AGS相互作用的动态变化主要是三羧酸循环代谢相关、抗氧化相关酶类、黏附素以及致病机制相关蛋白变化。

感染早期细菌来源的琥珀酸脱氢酶、*H. pylori*来源的抗氧化相关酶类、黏附素以及HSP60开始表达上调. 琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环代谢相关酶类, 此酶升高表示细胞代谢在早期旺盛, 但随二者相互作用时间延长, *H. pylori*逐渐占据优势, *H. pylori*的抗氧化作用相关酶类

表 1 2-DE图谱差异点的质谱鉴定结果

Spot No.	Accession No.	Protein	PI/MW(Da)
0.5 h-143	gi5644643	chaperonin GroEL ( <i>H pylori</i> )	5.55/58 227.5
0.5 h-200	gi114644226	mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit ( <i>Homo sapiens</i> )	4.95/48 083
0.5 h-290	gi164451511	actin	5.3/41 796.9
0.5 h-284	gi157111829	actin	5.29/41 615.8
0.5 h-193	gi90077396	unnamed protein product	8.46/29 151.2
0.5 h-478	gi15644820	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit ( <i>H pylori</i> 26695)	5.34/27 633.4
0.5 h-513	gi55775699	V protein [Simian parainfluenza virus 5]	7.55/23 920
0.5 h-517	gi114565485	peroxiredoxin 6 isoform 1 ( <i>Pantrogloodytes</i> )	5.69/23 205.2
0.5 h-547	gi54036561	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	8.78/29 746.5
0.5 h-579	gi11139093	GrpE-like protein cochaperone ( <i>Homo sapiens</i> )	8.29/24 132.9
0.5 h-578	gi15646170	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> 26695)	5.88/22 221.4
0.5 h-689	gi15611830	thioredoxin ( <i>H pylori</i> J99)	5.16/11 847.1
4 h-205	gi89574029	mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit ( <i>Homo sapiens</i> )	5.8/57 919.4
4 h-289	gi1703127	actin, cytoplasmic type 8	5.31/41 820.8
4 h-287	gi1703123	actin, cytoplasmic type 5	5.3/ 41 822.8
4 h-399	gi149029725	nascent-polypeptide-associated complex alpha	4.87/15 006.8
4 h-400	gi149029725	nascent-polypeptide-associated complex alpha	4.87/15 006.8
4 h-515	gi55775699	V protein [Simian parainfluenza virus 5]	7.55/23 920
4 h-466	gi15645574	hypothetical protein HP0958 ( <i>H pylori</i> 26695)	8.73/29 673.6
4 h-724	gi54301401	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> )	5.88/22 222.4
4 h-600	gi15646170	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> 26695)	5.88/22 221.4
4 h-652	gi18482498	non-heme ferritin protein ( <i>H pylori</i> )	5.51/19 242.6
4 h-711	gi15611830	thioredoxin ( <i>H pylori</i> J99)	5.16/11 847.1
4 h-599	gi15646170	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> 26695)	5.88/22 221.4
4 h-604	gi15646170	alkylhydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> 26695)	5.88/22 221.4
4 h-559	gi54036561	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	8.78/29 746.5
4 h-535	gi15645038	putative neuraminylactose-binding hemagglutinin homolog (hpaA) ( <i>H pylori</i> 26695)	5.19/53 905.2
4 h-520	gi15644703	bifunctional urease subunit gamma/beta ( <i>H pylori</i> 26695)	8.46/26 522.9
4 h-617	gi54301431	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> )	6.08/22 221.5
4 h-666	gi13937981	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) ( <i>Homo sapiens</i> )	7.68/17 999.9
4 h-656	gi15645018	adhesin-thiol peroxidase ( <i>H pylori</i> 26695)	7.68/18 280.8
4 h-634	gi15645732	amma-glutamyltranspeptidase ( <i>H pylori</i> 26695)	9.27/61 112.9
2 h-6041	gi15646170	alkyl hydroperoxide reductase ( <i>H pylori</i> 26695)	5.88/22 221.4
2 h-760	gi15611830	thioredoxin ( <i>H pylori</i> J99)	5.16/11 847.1

0.5 h-143表示共孵育0.5 h的2-DE蛋白点id值143号的蛋白点, 其他用同样的原则命名。

表达逐渐增强上调, 如硫氧还蛋白和烷基过氧化氢还原酶硫氧蛋白泛醌-细胞色素C还原酶等。这可能是两个方面的作用结果, 一是*H pylori*与AGS共孵育时在有氧环境中, 而*H pylori*培养的环境是微需氧的环境, 为适应环境生存*H pylori*的代谢改变; 也可能是AGS作为弱抗原提呈细胞感染细菌后引发杀菌机制, 产生依氧杀菌机制, 从而引发氧化酶和其他酶类的活化, 产生多

种具有有效杀伤活性的活性氧中介物和活性氮中介物, 后者是否参与变化尚需验证。黏附素HpaA感染2 h开始上调, 并逐渐增强。HpaA是*H pylori*的主要黏附素之一, 能够与AGS细胞特异性受体结合, 使二者紧密黏附。实验结果提示*H pylori*和AGS相互作用2 h开始受体配体方式的紧密黏附逐渐加强。近来研究表明HSP在多种肿瘤细胞表达增强, 与肿瘤的增殖、侵袭力、转移性及

#### ■ 创新盘点

本研究观察细胞变化的在同时观察了细菌蛋白质组学的连续性时间点的变化。

### ■应用要点

本研究有利于 *H pylori* 的致病机制和治疗靶点的发现, 为更好的理解 *H pylori* 感染机制提供有意义的线索。

凋亡等生物学行为以及与肿瘤免疫、肿瘤耐药性等有关<sup>[13-14]</sup>。HSP60在浅表性胃炎不同分型的肠化胃黏膜组织、胃癌组织中的表达阳性率呈逐渐增高趋势<sup>[15]</sup>。李波清 *et al* 对胃癌和非胃癌来源的菌株进行蛋白质学分析, 发现HSP60存在丙氨酸和苏氨酸的变异, 推测这一结构域可能是区分胃癌与非胃癌菌株的分子特征之一(资料待发表)。本研究中HSP60自2 h开始上调, 表明此蛋白在感染早期就开始发挥作用。

共培养4 h出现4种差异蛋白, 其中 *H pylori* 来源的非血红素铁蛋白是一大类含铁但不含血红素的蛋白, 核苷酸还原酶和脂加氧酶均属于此类蛋白, 前者活性增高可引起DNA的合成增加, 后者在生物膜磷脂氧化性降解起到关键的作用, 这类蛋白的表达提示感染后期细菌的增生旺盛以及对细胞膜的破坏性增强。 *H pylori* 尿素酶A/B亚单位在晚期开始表达, 与 *H pylori* 适应酸性环境代谢相关, 也和 *H pylori* 致病相关。细胞来源的CyPA是一种在生物界广泛存在、高度保守的蛋白质, 具有肽基脯氨酰顺/反异构酶活性, 参与蛋白质折叠、装配与运输; 在细胞内能与环孢霉素A结合, 参与免疫抑制; 还可介导胆固醇转运, 能发挥前炎症因子的功能, 并在信号转导中具有重要作用, 而且是一种氧化应激诱导分泌的生长因子<sup>[16-23]</sup>。实验提示CyPA在 *H pylori* 致病过程中可能起到很重要的作用, 如炎症刺激以及免疫逃逸, 参与 *H pylori* 的持续性感染。而NAC是与种系发育进化相关的高度保守的蛋白, 与核糖体结合参与转录调节, 生物学功能多样; 有研究发现其参与很多生物学过程并和肝炎、脑恶性肿瘤等多种临床疾病相关, 可参与信号转导<sup>[24]</sup>、抑制凋亡<sup>[25]</sup>过程, 过度表达可以扰乱细胞分化<sup>[26]</sup>等。在 *H pylori* 的感染晚期出现此蛋白的表达上调, 提示其在致病机制中发挥相应的作用。

66个差异蛋白点共鉴定出34个, 未鉴定出蛋白主要是由于目前国际上的数据库(肽库)的积累尚不充分, 这部分尚需今后通过蛋白测序来确认。

不同时间点的蛋白图谱为我们提供了一个动态变化的 *H pylori* 与 AGS 相互作用过程程序贯性特点。相互作用过程, 细菌最终占据优势, 整个蛋白图谱出现明显下调的蛋白都是细胞来源的, 细胞上调的2种蛋白主要与病理变化相关, 均在4 h蛋白图谱中开始表达, 提示这个时间点是 *H pylori* 致病机制启动的关键。本研究结果为进

一步研究 *H pylori* 的致病机制提供很重要的线索。

### 4 参考文献

- Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GN, van der Ende A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-1175
- Pasceri V, Patti G, Cammarota G, Pristipino C, Richichi G, Di Sciascio G. Virulent strains of *Helicobacter pylori* and vascular diseases: a meta-analysis. *Am Heart J* 2006; 151: 1215-1222
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9390-9395
- Grünenfelder B, Rummel G, Vohradsky J, Röder D, Langen H, Jenal U. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4681-4686
- Nilsson I, Utt M, Nilsson HO, Ljungh A, Wadström T. Two-dimensional electrophoretic and immunoblot analysis of cell surface proteins of spiral-shaped and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Electrophoresis* 2000; 21: 2670-2677
- Pereira DR, Martins D, Winck FV, Smolka MB, Nishimura NF, Rabelo-Gonçalves EM, Hara NH, Marangoni S, Zeitune JM, Novello JC. Comparative analysis of two-dimensional electrophoresis maps (2-DE) of *Helicobacter pylori* from Brazilian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer: a preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48: 175-177
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21: 1037-1053
- Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 2000: 158-159
- Larsson T, Bergström J, Nilsson C, Karlsson KA. Use of an affinity proteomics approach for the identification of low-abundant bacterial adhesins as applied on the Lewis(b)-binding adhesin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 2000; 469: 155-158
- Enroth H, Akerlund T, Sillén A, Engstrand L. Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 301-306
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996: 885-886
- Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 2000; 68: 915-920
- Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 Suppl 3: iii65-iii68
- Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM Jr, Evers BM. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg Oncol* 1995; 4: 197-203
- 刘东屏, 王颖, 王炳元. 热休克蛋白HSP60与幽门螺杆菌

- 菌在各型肠化胃黏膜组织表达的同步研究. 中华肿瘤防治杂志 2007; 14: 969-997
- 16 Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; 226: 544-547
  - 17 Gasser CS, Gunning DA, Budelier KA, Brown SM. Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 9519-9523
  - 18 Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mihatsch MJ, Foxwell BM. Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 1991; 72: 399-404
  - 19 Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; 271: 29427-29435
  - 20 Thériault Y, Logan TM, Meadows R, Yu L, Olejniczak ET, Holzman TF, Simmer RL, Fesik SW. Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* 1993; 361: 88-91
  - 21 Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87: 789-796
  - 22 Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1186-1191
  - 23 Kim SH, Lessner SM, Sakurai Y, Galis ZS. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol* 2004; 164: 1567-1574
  - 24 Neuhof A, Rolls MM, Jungnickel B, Kalies KU, Rapoport TA. Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 103-115
  - 25 Stilo R, Liguoro D, di Jeso B, Leonardi A, Vito P. The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 1034-1041
  - 26 Yotov WV, St-Arnaud R. Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* 1996; 10: 1763-1772

■同行评价  
本研究设计合理, 结果可信, 具有一定的参考价值。

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 •

## 世界华人消化杂志中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350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). (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 复方中药木疏胶囊抗大鼠肝纤维化的免疫机制

高萍, 程留芳, 刘春, 邵泽勇

## ■背景资料

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路, 已有研究表明肝纤维化有可能发生逆转。木疏胶囊能明显改善肝纤维化大鼠的肝功能, 预防治疗可降低血清纤维化相关酶, 显著改善肝组织病理学损害, 有效地干预大鼠肝纤维化。

高萍, 中国人民解放军总医院肿瘤科 北京市 100853  
程留芳, 中国人民解放军总医院消化科 北京市 100853  
刘春, 中国人民解放军总参军训和兵种部后勤部卫生处 北京市 100859  
邵泽勇, 四川省泸州医学院附属医院 四川省泸州市 646000  
高萍, 主治医师, 博士, 主要从事肿瘤方面的研究。  
作者贡献分布: 此课题由高萍及程留芳设计; 研究过程由高萍及刘春操作完成; 数据分析由高萍、刘春及邵泽勇完成; 写作由高萍、程留芳及邵泽勇完成。  
通讯作者: 程留芳, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科。greenpla@163.com  
电话: 010-89861915  
收稿日期: 2007-09-23 修回日期: 2008-03-10

## Immunologic mechanism in antifibrotic action of Mushu capsule in rats

Ping Gao, Liu-Fang Cheng, Chun Liu, Ze-Yong Shao

Ping Gao, Department of Oncology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Chun-Liu, Healthcare Office of Logistics Division, Department of Military Training and Arms of Services, General staff of Chinese PLA, Beijing 100859, China  
Ze-Yong Shao, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. greenpla@163.com  
Received: 2007-09-23 Revised: 2008-03-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the immunologic mechanism underlying the antifibrotic action of Mushu capsule in rats with hepatic fibrosis.

**METHODS:** A hepatic fibrosis model was induced by subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Wister rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, Mushu capsule (MC) group and Biejia Ruangan tablet (BRT) group. MC group and BRT group were subdivided into prevention group and treatment group. Liver sections were stained with HE and Masson respectively for pathological examination. Serum interleukin-2, -6, -8 (IL-2, 6, 8) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels were determined by radioimmunoassay. The levels of CD4 and CD8 cells were

measured by flow cytometry.

**RESULTS:** IL-2 and IL-6 levels were not obviously different between MC group and BRT group, but IL-8 level in MC groups was markedly lower than that in BRT groups (preventing group:  $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$  vs  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ ; treatment group:  $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$  vs  $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ , both  $P < 0.05$ ). MC was superior to BRT in preventing serum TNF- $\alpha$  elevation ( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$  vs  $1.4 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.05$ ). The decreased serum CD4 and CD4/CD8 levels were markedly raised in MC preventing groups and treatment group (CD4:  $36.4\% \pm 7.5\%$ ,  $34.6\% \pm 5.0\%$  vs  $28.0\% \pm 5.1\%$ ; CD4/CD8:  $1.9\% \pm 0.4\%$ ,  $1.8\% \pm 0.3\%$  vs  $1.5\% \pm 0.2\%$ , all  $P < 0.01$ ) in comparison with those in model group. The decreased serum CD4 level was markedly raised in BRT preventing group ( $33.4\% \pm 4.9\%$  vs  $28.0\% \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.05$ ), while there was no difference in BRT treatment group. BRT up-regulated the levels of serum CD8 and CD4/CD8 cells without significant differences. The levels of CD4, CD8 and CD4/CD8 cells had no notable difference between MC group and BRT group.

**CONCLUSION:** Mushu capsule can regulate the humoral immunity in rats with liver fibrosis by elevating serum IL-2 and decreasing serum IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ . Simultaneously, it can up-regulate the levels of CD4 and CD4/CD8.

**Key Words:** Mushu capsule; Liver fibrosis; Interleukin; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; CD4; CD8; Flow cytometry; Radioimmunoassay

Gao P, Cheng LF, Liu C, Shao ZY. Immunologic mechanism in antifibrotic action of Mushu capsule in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1266-1272

## 摘要

**目的:** 探讨木疏胶囊抗大鼠肝纤维化的免疫作用机制。

**方法:** 400 g/L CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化模型。Wister大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 木疏胶囊预防组和治疗组, 鳖甲软肝片预防组

■同行评议者  
党双锁, 副教授,  
西安交通大学第二医院感染科

和治疗组. HE染色和Masson染色观察肝右叶相同部位组织病理改变. 放免法测定血清细胞因子IL-2、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ , 流式细胞术检测血淋巴细胞CD4、CD8表达.

**结果:** 木疏胶囊与鳖甲软肝片各组两两比较, 对IL-2和IL-6作用均无显著性差异; 对IL-8的降低作用木疏胶囊优于鳖甲软肝片(预防组:  $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$  vs  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ ; 治疗组:  $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$  vs  $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ ; 均 $P < 0.05$ ); 对TNF- $\alpha$ 的降低作用为木疏胶囊预防组优于鳖甲软肝片( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$  vs  $1.4 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.05$ ), 而治疗组无显著差异. 与模型对照组比较, 木疏胶囊预防组和治疗组使CD4和CD4/CD8均显著升高(CD4:  $36.4\% \pm 7.5\%$ ,  $34.6\% \pm 5.0\%$  vs  $28.0\% \pm 5.1\%$ ; CD4/CD8:  $1.9\% \pm 0.4\%$ ,  $1.8\% \pm 0.3\%$  vs  $1.5\% \pm 0.2\%$ ; 均 $P < 0.01$ ), 鳖甲软肝片预防组使CD4显著升高( $33.4\% \pm 4.9\%$  vs  $28.0\% \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.05$ ), 治疗组无显著性差异, 鳖甲软肝片使CD8和CD4/CD8升高, 但均无显著性差异; 木疏胶囊和鳖甲软肝片对CD4、CD8、CD4/CD8的作用无显著性差异.

**结论:** 木疏胶囊可升高肝纤维化大鼠血清IL-2, 降低IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 水平, 升高CD4、CD4/CD8.

**关键词:** 木疏胶囊; 肝纤维化; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; CD4; CD8; 流式细胞术; 放射免疫法

高萍, 程留芳, 刘春, 邵泽勇. 复方中药木疏胶囊抗大鼠肝纤维化的免疫机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1266-1272  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1266.asp>

## 0 引言

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路, 已有研究表明肝纤维化有可能发生逆转. 由于肝纤维化的发生发展与免疫状态有关, 我们从体液免疫和细胞免疫的角度研究木疏胶囊对实验性肝纤维化大鼠免疫功能的调节作用, 进一步探讨其抗纤维化机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 同系Wister大鼠60只, 雌雄各半, 体重 $200 \pm 20 \text{ g}$ , 清洁级, 中国人民解放军总医院动物实验中心提供. 木疏胶囊为当归、黄芪、鳖甲、大枣、黑豆等, 由北京宝树堂科技药业有限公司精制而成胶囊. 鳖甲软肝片为鳖甲、三七、赤芍、冬虫夏草、连翘等, 中国人民解放军302医院研制, 内蒙古福瑞制药厂生产.

CCl<sub>4</sub>分析纯北京化学试剂公司. IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 放射免疫测定试剂盒由中国人民解放军总医院东亚放免所提供. FITC标记的大鼠CD4 mAb, PE标记的大鼠CD8 mAb由北京鼎国生物技术发展中心提供. N-695B型智能放免 $\gamma$ 测量仪(北京海核所日环光电仪器有限公司). FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton Dickson公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组:** 根据人与大鼠药物剂量换算<sup>[1]</sup>本课题组前期实验研究成果<sup>[2]</sup>选用木疏胶囊每日 $3.125 \text{ g/kg}$ , 鳖甲软肝片 $0.625 \text{ g/kg}$ 作为实验. 将CCl<sub>4</sub>分析纯 $40 \text{ mL}$ 溶于橄榄油 $60 \text{ mL}$ 中, 常温保存备用. 造模各组于实验第1天sc  $400 \text{ mL/L CCl}_4$   $5 \text{ mL/kg}$ , 以后每4天 $3 \text{ mL/kg}$ , 连续8 wk. 各组均用普通饲料喂养, 自由饮水. Wister大鼠40只, 雌雄各半, 随机分为正常对照组( $n = 10$ ), 模型对照组( $n = 10$ ), 木疏胶囊预防组( $n = 10$ ), 鳖甲软肝片预防组( $n = 10$ ). 造模同时正常对照组及模型对照组蒸馏水 $5 \text{ mL/d}$ , 分2次ig, 木疏胶囊预防组木疏胶囊 $3.125 \text{ g/kg}$ 溶于蒸馏水 $5 \text{ mL}$ 后, 每日分2次ig, 鳖甲软肝片预防组鳖甲软肝片 $0.625 \text{ g/kg}$ 溶于蒸馏水 $5 \text{ mL}$ 后, 每日分2次ig, 治疗4 wk. 另Wister大鼠40只, 雌雄各半, 随机分为正常对照组( $n = 10$ ), 模型对照组( $n = 10$ ), 木疏胶囊治疗组( $n = 10$ ), 鳖甲软肝片治疗组( $n = 10$ ). 造模结束后正常对照组及模型对照组蒸馏水 $5 \text{ mL/d}$ , 分2次ig, 木疏胶囊治疗组木疏胶囊 $3.125 \text{ g/kg}$ 溶于蒸馏水 $5 \text{ mL}$ 后, 每日分2次ig, 鳖甲软肝片治疗组鳖甲软肝片 $0.625 \text{ g/kg}$ 溶于蒸馏水 $5 \text{ mL}$ 后, 每日分2次ig, 治疗4 wk.

**1.2.2 血清细胞因子的测定:** 心脏取血 $2 \text{ mL}$ 迅速注入肝素抗凝管(消毒配置好的商品化 $4 \text{ mL}$ 玻璃管), 即刻用于CD4、CD8检测<sup>[4]</sup>, 其余 $3000 \text{ r/min}$ ,  $25^\circ\text{C}$ 离心 $15 \text{ min}$ , 留取血清用于IL-2、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ 等指标检测. 另用流式细胞术检测大鼠血T淋巴细胞亚群的影响.

**1.2.3 肝组织学观察:** 取肝右叶相同部位组织固定于中性甲醛溶液中, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明、浸蜡包埋,  $4-7 \mu\text{m}$ 厚度连续切片用于HE、Masson染色行组织学观察和肝脏纤维组织定量测定. Masson染色, 片选取四周及中央5个区域, 取胶原纤维含量最多的视野, 用病理图像分析系统测定胶原面积百分比(胶原纤维面积/肝组织面积 $\times 100\%$ ), 取平均数作为判定肝纤维化程

### ■ 研发前沿

已有研究利用检测肝组织内的细胞因子如TGF- $\beta 1$  mRNA与I型前胶原mRNA的水平, 来判断肝纤维化的程度, 也有用IFN- $\gamma$ 及其他的抗肝纤维化药物治疗肝纤维化, 测定细胞因子判断药物疗效, 均获得满意效果. 细胞因子的研究, 对肝纤维化的防治具有广阔的前景和重要意义.

### ■ 相关报道

本课题组前期研究证实,木苏丸治疗有促进蛋白合成,改善肝功能作用。干预治疗可以改善大鼠肝纤维化程度,具有延缓及逆转实验性肝纤维化形成的作用。

度的客观指标。HE染色片,由资深病理医师阅片,按文献[5]方法进行肝纤维化分级。

**统计学处理** 数据采用SPSS13.0统计软件包进行分析,结果以mean±SD表示。数值变量资料多组间比较采用方差分析,LSD法进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为具有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 一般状况** 实验结束时,正常对照组大鼠均存活良好。CCl<sub>4</sub> sc 4 wk动物出现乏力、嗜睡、皮毛皱而不洁、进食减少、尿黄,个别大鼠趾甲易出血,鼻有出血。造模结束时模型对照组大鼠皮毛松弛、杂乱、粗糙无光泽,活动及食欲少、营养状况欠佳;木疏胶囊及鳖甲软肝片预防组及治疗组大鼠皮毛松弛、无光泽,营养状况一般。实验结束时模型对照组大鼠死亡1只,鳖甲软肝片预防组死亡1只,木疏胶囊预防组大鼠死亡2只,鳖甲软肝片治疗组死亡1只,木疏胶囊治疗组大鼠无死亡。

**2.2 肝组织病理** 肝组织病理切片HE和Masson染色观察,正常对照组大鼠肝小叶结构完整,肝索排列整齐,汇管区无纤维化;模型对照组造模后,大鼠肝细胞浊肿,肝小叶失去正常结构,汇管区胶原沉积,可见胶原纤维自中央静脉及汇管区向周围延伸,形成较粗的纤维间隔,有的已经有假小叶形成;木疏胶囊预防组及鳖甲软肝片预防组肝小叶结构基本正常,肝细胞无明显变性、坏死,肝索排列相对整齐,仅汇管区少量胶原沉积,无明显纤维间隔形成;木疏胶囊治疗组、鳖甲软肝片治疗组部分肝小叶结构排列仍紊乱,肝细胞轻度脂肪变性,汇管区有较多胶原纤维沉积(图1-2,表1)。

**2.3 血清细胞因子** 木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清IL-2影响的结果为:模型对照组与正常对照组比较,下降有显著性差异;各用药组与模型对照组比较,升高均有显著性差异;木疏胶囊预防组和治疗组分别与鳖甲软肝片预防组和治疗组进行两两比较,对IL-2的升高作用均无显著性差异。木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清IL-6影响的结果为:模型对照组与正常对照组比较,升高有显著性差异;各用药组与模型对照组比较,下降均有显著性差异;木疏胶囊各组与鳖甲软肝片各组进行两两比较,对IL-6的降低作用相当,均无显著性差异。木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清IL-8影响的结果为:模型对照组与正常对照组比较,升高有显著性差异;各用药组与模型对照组比较,下

表1 大鼠肝纤维化程度及胶原面积比较 (mean±SD)

分组	n	肝纤维化分级					胶原面积(%)
		-	+	++	+++	++++	
正常对照	10	0	0	0	0	0	0.9±0.6 <sup>b</sup>
模型对照	9	0	1	2	4	1	19.5±4.0
鳖甲软肝片预防	9	2	3	2	0	0	10.8±4.0 <sup>a</sup>
木疏胶囊预防	8	1	2	4	1	0	10.2±5.1 <sup>a</sup>
鳖甲软肝片治疗	9	1	3	3	2	0	15.0±5.0
木疏胶囊治疗	10	1	2	3	3	0	14.6±5.0

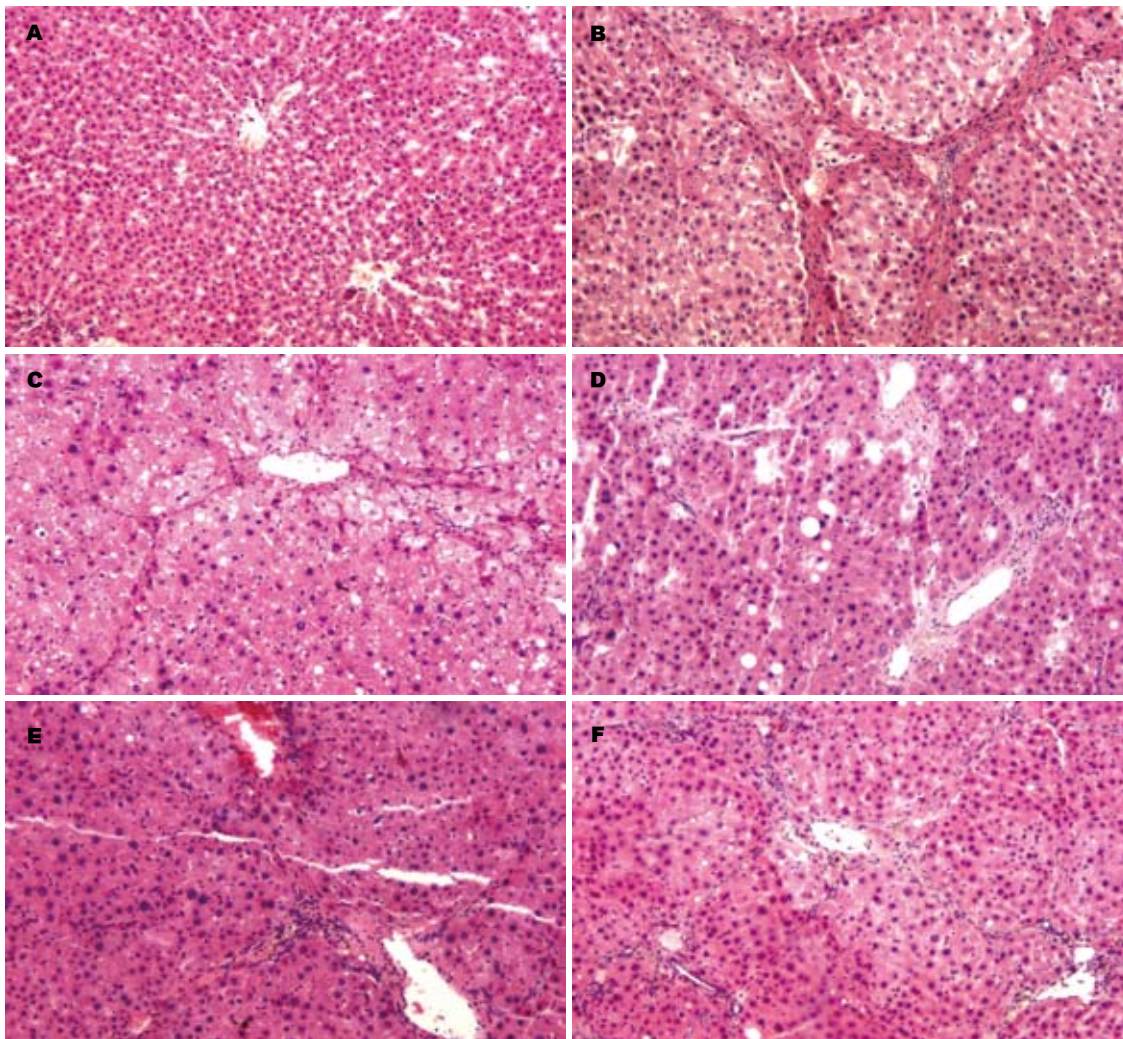
<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型对照。

降均有显著性差异;与鳖甲软肝片预防组和治疗组进行两两比较,木疏胶囊预防组和治疗组对IL-8的升高作用均优于鳖甲软肝片,均有显著性差异。木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清TNF- $\alpha$ 影响的结果为:模型对照组与正常对照组比较,升高有显著性差异,各用药组与模型对照组比较,下降均有显著性差异,与鳖甲软肝片预防组和治疗组进行两两比较,木疏胶囊预防组对TNF- $\alpha$ 的升高作用优于鳖甲软肝片预防组和治疗组,而木疏胶囊治疗组与鳖甲软肝片预防组和治疗组对TNF- $\alpha$ 的降低作用相当,无统计学意义(表2)。

**2.4 T淋巴细胞亚群** 模型对照组与空白对照组比较,下降有显著性差异,各用药组与模型对照组比较,鳖甲软肝片治疗组升高没有显著性差异,其余各组升高均有显著性差异,木疏胶囊预防组和治疗组分别与鳖甲软肝片预防组和治疗组进行两两比较,显示木疏胶囊与鳖甲软肝片使CD4升高的作用相当,无显著性差异。木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清CD8影响的结果为:模型对照组与空白对照组比较,下降无显著性差异,各用药组与模型对照组比较及木疏胶囊预防组和治疗组与鳖甲软肝片预防组和治疗组之间两两比较,对CD8的升高作用均无显著性差异。木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清CD4/CD8影响的结果为:模型对照组与空白对照组比较,降低有显著性差异,鳖甲软肝片治疗组与空白对照组比较,降低也有显著性差异,各用药组与模型对照组比较,木疏胶囊预防组和治疗组CD4/CD8升高均有显著性差异,与鳖甲软肝片预防组和治疗组进行两两比较,木疏胶囊预防组和治疗组与鳖甲软肝片对CD4/CD8的升高作用相当,无显著性差异(表3)。

## 3 讨论

木疏胶囊在益气养血的同时,根据辨证论治,



**■创新盘点**  
本研究从体液免疫和细胞免疫的角度研究木疏胶囊对实验性肝纤维化大鼠免疫功能的调节作用, 进一步探讨其抗纤维化机制。

图 1 肝纤维化大鼠肝组织病理学改变(HE × 100). A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 木疏胶囊预防组; D: 木疏胶囊治疗组; E: 鳖甲软肝片预防组; F: 鳖甲软肝片治疗组.

表 2 木疏胶囊对肝纤维化大鼠血清细胞因子的影响 (mean ± SD, μg/L)

分组	n	IL-2	IL-6	IL-8	TNF-α
空白对照	10	4.9 ± 2.7 <sup>b</sup>	103.0 ± 33.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>b</sup>
模型对照	9	2.2 ± 1.4	151.9 ± 29.8	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.3
鳖甲软肝片预防	9	4.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	121.7 ± 24.2 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>b</sup>
木疏胶囊预防	8	4.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	111.9 ± 28.4 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>bce</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>bce</sup>
鳖甲软肝片治疗	9	4.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	120.0 ± 28.9 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>b</sup>
木疏胶囊治疗	10	4.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	112.6 ± 17.9 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>bce</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型对照; <sup>c</sup>P<0.05 vs 鳖甲软肝片预防治疗; <sup>d</sup>P<0.05, <sup>e</sup>P<0.01 vs 鳖甲软肝片治疗.

注重活血化瘀, 兼顾扶正、补虚、利湿等, 前期实验已证实能有效干预大鼠肝纤维化及其部分机制. 肝脏是产生细胞因子主要场所之一, 细胞因子又影响着肝脏受化学及感染等损伤的修复过程, IL-2、IL-6、IL-8和TNF-α是一组由单核巨噬细胞、内皮细胞产生的细胞因

子, 具有激活诱导T或B细胞分化, 增强NK细胞杀伤靶细胞, 促进吞噬等功能, 广泛参与生物调节和免疫应答过程, 是机体炎症反应和一系列病理生理过程的重要介质. IL-2具有激活免疫效应细胞和产生协同效应因子的作用, 能有效的清除肿瘤细胞和病毒细菌感染细胞, 其产

### ■应用要点

木疏胶囊可使肝纤维化大鼠血清IL-2升高, IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 水平降低, 对肝纤维化大鼠体液免疫功能有一定的调节作用。

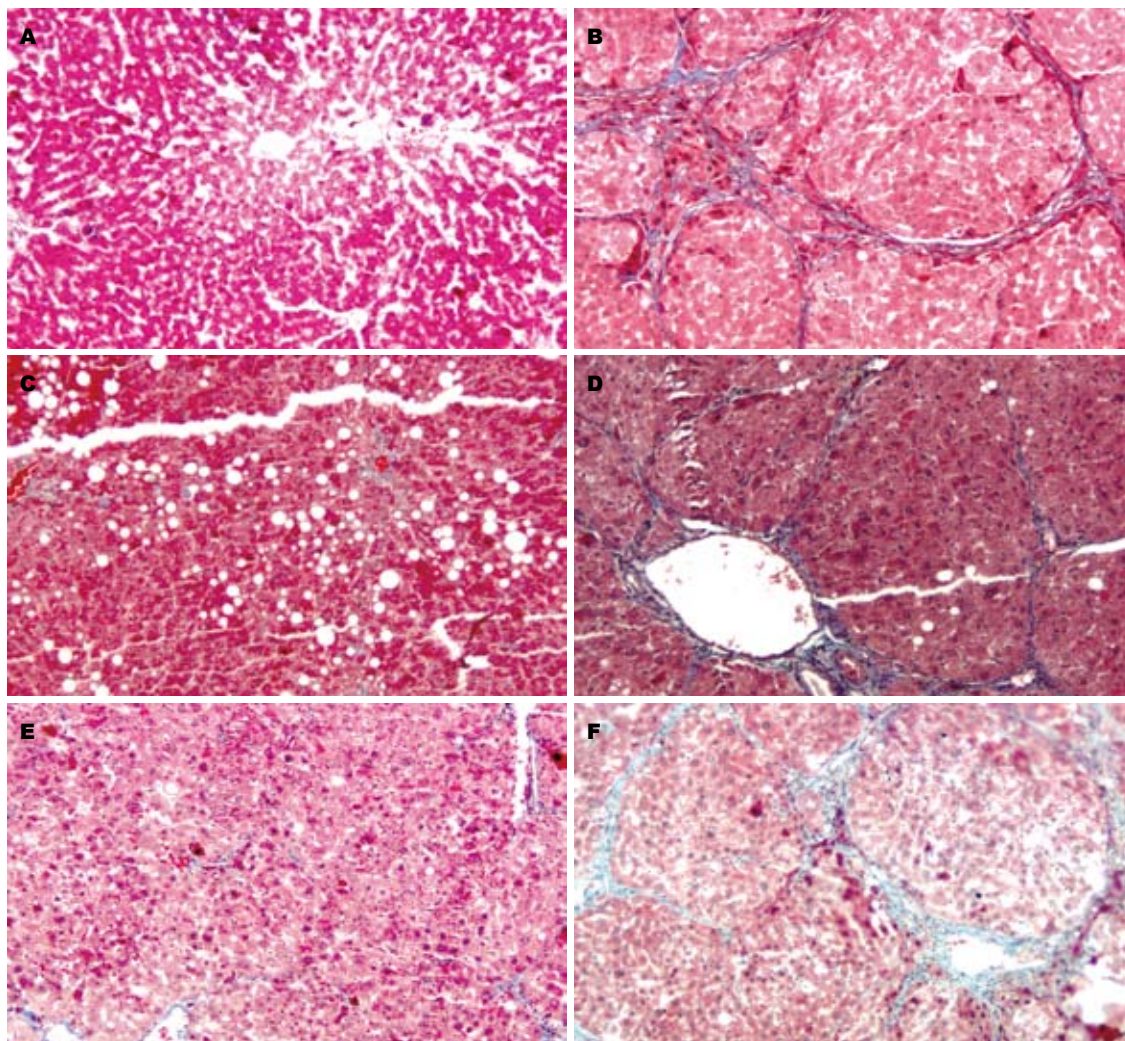


图2 肝纤维化大鼠肝组织病理学改变(Masson  $\times 100$ ). A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 木疏胶囊预防组; D: 木疏胶囊治疗组; E: 鳖甲软肝片预防组; F: 鳖甲软肝片治疗组。

表3 木疏胶囊对肝纤维化大鼠T淋巴细胞亚群的影响结果 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	n	CD4	CD8	CD4/CD8
空白对照组	10	44.1 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	22.2 $\pm$ 3.5	2.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
模型对照组	9	28.0 $\pm$ 5.1	19.0 $\pm$ 2.1	1.5 $\pm$ 0.2
鳖甲软肝片预防组	9	33.4 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	19.7 $\pm$ 5.9	1.8 $\pm$ 0.4
木疏胶囊预防组	8	36.4 $\pm$ 7.5	19.4 $\pm$ 3.0	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
鳖甲软肝片治疗组	9	31.6 $\pm$ 4.1	20.0 $\pm$ 2.6	1.6 $\pm$ 0.3
木疏胶囊治疗组	10	34.6 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 2.2	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照。

生和表达异常与临床疾病有密切关系, 所以通过外周血IL-2测定, 可以反映疾病变化<sup>[6]</sup>。木疏胶囊及鳖甲软肝片预防组和治疗组均可使血清IL-2水平升高, 提示其抗肝纤维化作用可能与此有关。IL-6与肝脏疾病的关系密切。又称肝细胞刺激因子(hepatocyte stimulating factor, HSF),

肝细胞表面有其高亲和力受体。Hanada *et al*<sup>[7]</sup>研究发现正常大鼠FSC能表达IL-6 mRNA和分泌有生物活性的IL-6, 并通过自分泌机制促进其自身转化为肌纤维母细胞。Migita *et al*<sup>[8]</sup>对77例HCVA<sub>b</sub> + 的肝硬化患者进行血清IL-6水平的测定, 发现其明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 提示IL-6刺激和维持肝纤维化。这些证据均提示, IL-6作为一种炎性细胞因子, 介导肝脏炎症反应, 从而刺激肝纤维化的发生, 这一点是肯定的。本研究中肝纤维化大鼠血清IL-6水平明显升高也说明IL-6与肝纤维化密切相关, 木疏胶囊预防组和治疗组大鼠血清IL-6水平均明显下降, 与模型组比较有统计学意义( $P < 0.01$ ), 我们认为木疏胶囊可能通过降低血清IL-6水平, 减轻IL-6对肝脏炎症反应的介导, 对储脂细胞的激活, 降低IL-6刺激和维持肝纤维化的作用, 从而发挥抗肝纤维化作用, 但木疏胶囊与鳖甲

软肝片作用相当。

英国学者Swiatkowska-Stodulska *et al*<sup>[9]</sup>对酒精性肝病患者的血清及肝组织检测发现IL-8在两者中水平皆增高。研究还发现, 肝炎后肝硬变患者的血浆IL-8水平亦升高, 且与肝细胞恶性变相关<sup>[10]</sup>。本研究中肝纤维化大鼠血清IL-8水平明显升高, 与文献报道一致。IL-8在肝硬化过程中, 可能通过细胞因子的瀑布效应, 促进胶原、纤维连接素等的合成, 形成肝纤维化及肝硬化<sup>[11]</sup>。本研究中木疏胶囊治疗后肝纤维化大鼠血清IL-8水平明显下降, 我们认为木疏胶囊抗肝纤维化作用机制可能与IL-8有关, 通过降低IL-8水平, 减轻肝脏炎症反应, 减少肝细胞损害, 阻断肝纤维化过程中细胞因子的瀑布效应, 从而延缓肝纤维化的进展。且木疏胶囊降低IL-8的作用优于鳖甲软肝片。

TNF- $\alpha$ 异常分泌可作为机体炎症, 损伤及休克的重要介质, 在体内细胞因子网络中发挥重要调节作用, 他的增加可引起IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IFN等多种细胞因子的水平变化, 使细胞因子网络失衡而导致机体发生病理生理变化。Wang *et al*<sup>[12]</sup>对肝纤维化的形成进行了动态研究, 发现纤维化早期肝组织内首先出现TNF- $\alpha$  mRNA水平上升, 随后出现I型胶原mRNA水平增高, 到肝纤维化晚期, 后者继续升高, 前者则出现下降, 木疏胶囊预防组和治疗组均可降低肝纤维化大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平, 提示木疏胶囊可能通过降低肝纤维化大鼠TNF- $\alpha$ 水平, 而减小TNF- $\alpha$ 对肝脏的毒性, 减轻肝细胞损伤, 减少其在肝脏炎症反应和肝纤维化中的作用, 认为木疏胶囊抗肝纤维化的机制可能与此有关, 且木疏胶囊预防组与鳖甲软肝片预防组和治疗组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), 效果优于鳖甲软肝片, 而木疏胶囊治疗组与鳖甲软肝片预防组和治疗组比较, 仅有轻度降低, 差异均无统计学意义, 认为木疏胶囊治疗组降低TNF- $\alpha$ 的作用与鳖甲软肝片相当, 可能与TNF- $\alpha$ 在肝纤维化发生早期升高显著, 而晚期时已呈下降趋势, 治疗效果表现不及早期时表现明显。

外周的T细胞大部分是免疫成熟的CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞, 不同亚群的T淋巴细胞具有各自的潜在功能, 他们在外周血中的数量和比例的变化能够反映机体的病理生理状况。CD4<sup>+</sup>细胞的数量和功能下降, 直接导致细胞免疫功能低下。CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞对清除感染

的肝细胞, 清除病毒感染有重要作用, 其产生依赖CD4<sup>+</sup>淋巴细胞的存在。Urbani *et al*<sup>[13]</sup>对急性自限性HBV感染患者与HBV持续感染患者外周血CD4<sup>+</sup> T细胞及CD8<sup>+</sup> T细胞反应进行比较分析, 结果显示, CD4<sup>+</sup> T细胞功能下降及CD8<sup>+</sup> T细胞反应下调与HBV感染持续有关。肖光明 *et al*<sup>[14]</sup>研究显示慢性肝炎、肝炎肝硬变、慢性重型肝炎外周血CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞绝对计数和CD4<sup>+</sup>/CD<sup>+</sup>比值均低于正常对照组和急性肝炎患者, 肝硬变患者细胞免疫功能的明显下降, 是临床上肝硬变易发展为肝癌和易并发感染的重要因素之一。本研究中肝纤维化大鼠外周血中CD4<sup>+</sup> T细胞明显下降, CD8无明显下降, 但P值为0.052, 接近具有显著性差异的临界值0.05, 可能由于样本量小所致, 提示应扩大样本量进行进一步研究, CD4/CD8同时下降, 与文献报道基本一致, 也反映了肝纤维化大鼠细胞免疫功能下降, 木疏胶囊预防组和治疗组CD4、CD4/CD8均升高, 有统计学意义( $P < 0.05$ ), 故认为木疏胶囊对肝纤维化大鼠的细胞免疫功能紊乱可能有一定的调节作用, 并因此而发挥抗肝纤维化作用。

#### 4 参考文献

- 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203-205
- 高峰, 程留芳, 王志强, 杨云生. 木苏丸对大鼠二甲亚硝胺肝纤维化肝组织TIMP-1, MMP-2 mRNA表达的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 355-357
- 丁里玉, 刘殿武, 贺宇彤. 硒强化软肝胶囊对大鼠实验性肝纤维化的治疗作用. 中国中医基础医学杂志 2004; 10: 23-25
- 刘栋, 刘志红. 流式细胞术检测人外周血CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞方法的建立. 肾脏病与透析肾移植杂志 1998; 7: 400-401
- 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 383
- 龙振洲. 医学免疫学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 48
- Hanada H, Ikeda-Dantsuji Y, Naito M, Nagayama A. Infection of human fibroblast-like synovial cells with Chlamydia trachomatis results in persistent infection and interleukin-6 production. *Microb Pathog* 2003; 34: 57-63
- Migita K, Abiru S, Maeda Y, Daikoku M, Ohata K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2006; 67: 27-32
- Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobinska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit* 2006; 12: CR215-CR220
- Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, Kaneko S. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer*

#### ■同行评价

本研究方法先进可行, 结果可信, 尤其在免疫调节方面研究肝纤维化发生发展有一定的参考意义。

- Lett* 2007; 251: 36-42
- 11 Koivisto H, Hietala J, Niemela O. An inverse relationship between markers of fibrogenesis and collagen degradation in patients with or without alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 773-779
- 12 Wang X, Chen YX, Xu CF, Zhao GN, Huang YX, Wang QL. Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 18
- 13 Urbani S, Boni C, Amadei B, Fisicaro P, Cerioni S, Valli MA, Missale G, Ferrari C. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology* 2005; 41: 826-831
- 14 肖光明, 姚细安, 连粤湘, 吴茂盛, 刘远煌, 雷春亮. 乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 22-24

编辑 李军亮 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 •

## 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 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. 以下逐条陈述: (1) 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. (2) 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. (3) 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. (4) 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, 表内非公认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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$  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  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 柴胡皂甙D对实验性大鼠肝癌血管形成的抑制作用

王宝峰, 程延安, 王西京, 刘振国, 马红兵, 白明华, 党双锁, 贾晓黎

王宝峰, 马红兵, 白明华, 王西京, 西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科 陕西省西安市 710004  
程延安, 刘振国, 党双锁, 贾晓黎, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 陕西省西安市 710004  
王宝峰, 硕士, 主要从事肝癌的发病机制与治疗的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30471982  
作者贡献分布: 王宝峰和程延安对此文所作贡献均等; 此课题由王宝峰, 程延安, 王西京, 刘振国, 马红兵, 白明华, 党双锁及贾晓黎设计; 研究过程由王宝峰, 刘振国, 白明华及贾晓黎操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由程延安, 马红兵及党双锁提供; 数据分析由王宝峰, 马红兵及贾晓黎完成; 本论文写作由王宝峰, 刘振国, 白明华及贾晓黎完成。  
通讯作者: 王宝峰, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科。 wangbf1680@sohu.com  
电话: 029-87679789  
收稿日期: 2007-12-10 修回日期: 2008-03-29

## Inhibitory effect of saikosaponin-d on the angiogenesis of experimental hepatocarcinoma in rats

Bao-Feng Wang, Yan-An Cheng, Xi-Jing Wang, Zhen-Guo Liu, Hong-Bing Ma, Ming-Hua Bai, Shuang-Suo Dang, Xiao-Li Jia

Bao-Feng Wang, Xi-Jing Wang, Hong-Bing Ma, Ming-Hua Bai, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China  
Yan-An Cheng, Zhen-Guo Liu, Shuang-Suo Dang, Xiao-Li Jia, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471982  
Correspondence to: Bao-Feng Wang, Department of Oncology, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, 157 Xiwu Road, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. wangbf1680@sohu.com  
Received: 2007-12-10 Revised: 2008-03-29

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of saikosaponin-d (SSd) on the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and CD34 during hepatocellular carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN).

**METHODS:** Ninety male SD rats were randomly divided into 5 groups: control group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 20$ ) and three treatment groups ( $n = 20$  in each group). Except for the

control group, the other groups were administered (ig) with 2 g/L DEN at a dose of 10 mg/kg body weight (5 times/wk for 16 wk). At the same time, the rats in the treatment groups were injected intraperitoneally with SSd at different doses (1.0, 1.5 and 2.0 mg/kg) once per day for 16 wk. The rats were anesthetized and killed at 6, 12, and 16 wk. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to examine the changes of liver pathology and the expression of COX-2, VEGF and CD34 in liver tissues were dynamically monitored by SABC immunohistochemistry.

**RESULTS:** During 6, 12, and 16 wk of experiment, typical pathological changes such as hepatocyte injury, hyperplasia, cirrhosis, and carcinogenesis appeared in the rats of model group. Both the volume and the number of tumors were significantly reduced in 3 SSd treatment groups. Under microscope, the cancer cells in the rats of model group showed polymorphic and abnormal shape. In contrast, the cancer cells in the rats of SSd treatment groups were well differentiated. Immunohistochemistry demonstrated that the expression of COX-2 and VEGF and the value of microvessel density (MVD) in the model group were low in the early stage of carcinogenesis, but they were all remarkably increased in the stage of carcinoma. Whereas, the expression of COX-2 and VEGF and MVD value were all reduced in every stage of carcinogenesis after SSd treatment, especially in the stage of carcinoma after high-dose SSd treatment. There was a highly positive correlation between COX-2 and VEGF expression ( $r = 0.815, P < 0.01$ ), VEGF expression and MVD value ( $r = 0.862, P < 0.01$ ) and between COX-2 expression and MVD value ( $r = 0.726, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** SSd has inhibitory effect on the angiogenesis during DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats, which may be related to the down-regulation of COX-2 expression and VEGF activity.

**Key Words:** Saikosaponin-d; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor; Hepatocarcinoma; Angiogenesis; Microvessel density; Immunohistochemistry

### 背景资料

肝癌术后复发与转移率极高, 血管形成丰富为其特点, 目前尚缺乏有效的治疗方法。实验模型提示诱导血管生成的能力在肿瘤发生的早期即表现出来, 是肿瘤的一种固有的生物属性, 肿瘤新生血管生成与恶性肿瘤的发生、发展和转移关系密切。

### 同行评议者

黄志勇, 副教授, 华中科技大学同济医学院普外科

## ■ 研发前沿

探讨血管生成的机制及寻找血管生成抑制剂已经成为当前肿瘤防治研究的热点。

Wang BF, Cheng YA, Wang XJ, Liu ZG, Ma HB, Bai MH, Dang SS, Jia XL. Inhibitory effect of saikosaponin-d on the angiogenesis of experimental hepatocarcinoma in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1273-1280

## 摘要

**目的:** 观察柴胡皂甙D(saikosaponin-d, SSd)对大鼠肝脏癌变过程中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)及CD34表达的调节作用,并探讨其与SSd抗肝肿瘤作用的关系。

**方法:** 清洁级雄性SD大鼠90只,随机分为5组:模型组( $n = 20$ ),对照组( $n = 10$ )与SSd大、中、小剂量治疗组(各组 $n = 20$ )。对照组给予(ig)等量生理盐水,其余各组大鼠均给予(ig)2 g/L二乙基亚硝胺(DEN, 10 mg/kg),每周5次,同时各治疗组每天腹腔注射不同浓度SSd(2.0, 1.5, 1.0 mg/kg),至16 wk停药。分别于第6、12、16周处死大鼠,HE染色观察实验大鼠各期肝组织病理学结构的改变,免疫组化检测大鼠肝脏癌变过程中COX-2、VEGF及CD34的表达。

**结果:** 实验第6、12、16周,单纯造模组大鼠呈现典型的肝细胞损伤、增生硬化和肝癌形成的病理变化。SSd各治疗组大鼠癌结节数及灶的大小均小于模型组。镜下单纯造模组癌细胞呈多形性,异形性明显;相反,SSd各干预组癌细胞分化程度高,异形性较低。免疫组化结果显示COX-2、VEGF及CD34均在诱癌早期表达较少,肝癌期表达明显增强。SSd干预后,肝癌形成期COX-2、VEGF及CD34表达的抑制作用最明显,与单纯造模组相比差异显著( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );COX-2与VEGF( $r = 0.815$ ,  $P < 0.01$ ), VEGF与MVD( $r = 0.862$ ,  $P < 0.01$ )以及COX-2与MVD( $r = 0.726$ ,  $P < 0.01$ )的表达均明显正相关。

**结论:** SSd对实验性大鼠肝癌形成具有一定的抑制作用,其作用机制可能与SSd下调肝肿瘤中COX-2的表达,抑制VEGF的活性有关。

**关键词:** 柴胡皂甙D; 环氧化酶-2; 血管内皮生长因子; 肝肿瘤; 血管生成; 微血管密度; 免疫组化

王宝峰,程延安,王西京,刘振国,马红兵,白明华,党双锁,贾晓黎. 柴胡皂甙D对实验性大鼠肝癌血管形成的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1273-1280

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1273.asp>

## 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)术后复发和转移率极高,血管形成丰富为其特点,因此

抑制血管形成在抗肝肿瘤的研究中意义重大。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是一种诱导酶,有诱导肿瘤血管生成的特性,与肝癌的发生、发展、浸润、转移及血管形成有密切关系<sup>[1-4]</sup>。柴胡皂甙D(saikosaponin-d, SSd)是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分,具有明显抑制肝肿瘤细胞生长、促凋亡及抑制肿瘤细胞分泌COX-2蛋白的作用<sup>[5-7]</sup>。因此,本研究通过动态检测SSd对大鼠肝脏癌变过程中COX-2、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)及CD34表达的调节作用,初步探讨SSd抑制血管形成与其抗肝癌作用的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 二乙基亚硝胺,纯度>0.99 kg/L(Sigma公司),柴胡皂甙D(SSd,江西本草天工科技有限责任公司),二甲亚砜(DMSO, Sigma公司),VEGF、COX-2、CD34均为兔抗鼠多克隆抗体,VEGF购自北京中山生物公司,COX-2、CD34、SABC试剂盒及DAB显色剂均购自武汉博士德生物公司,图像信号采集分析系统(QWin550CW, Leica),架盘药物天平(北京医用天平厂),电热三用水箱(北京市医疗设备厂),台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂),自动石蜡包埋机(Leitz, Germany),组织切片机(RM2135, Leica),隔水式电热恒温干燥箱(上海医疗器械厂)。

**1.2 方法** 90只♂清洁级SD大鼠,平均体质量 $248.18 \pm 12.32$  g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。将大鼠随机分为5组:正常对照组10只,肝癌模型组及SSd大、中、小剂量治疗组每组各20只。SSd溶液的配制:称取SSd 40、30、20 mg,分别溶于DMSO 3 mL中,静止10 min,然后用生理盐水稀释至100 mL,避光保存;2 mg/L DEN溶液的配制:500 mL生理盐水加1 mL DEN,振荡混匀,避光保存。

**1.2.1 造模:** 模型组与治疗组均给予2 mg/L DEN ig,按体质量10 mg/kg给药,每只1.5-2.0 mL/d,5次/wk,至16 wk停药,对照组给予等量生理盐水ig;造模同时,治疗组大鼠分别给以不同浓度SSd ip(按0.50 mL/100 g)干预,1次/d,共16 wk。每天观察动物的精神状态、饮食状况及背毛等一般情况的变化,1次/wk称体质量,记录1次进水量和进食量。灌胃给药严格遵循操作规则及剂量要求,减少由操作不当引起的动物死亡。分别于第6、12、16周麻醉后处死动物。

**1.2.2 免疫组化:** SABC法检测大鼠肝脏癌变过程中COX-2、VEGF及CD34的表达。参考SABC试

剂盒说明书, 三种因子临用前按1:50比例稀释, 检测时均用PBS液代替一抗作阴性对照。

1.2.3 判断标准: COX-2染色阳性以细胞质内出现棕黄色颗粒状染色为标准, 参照文献[8]并加以改进后采用半定量积分法, 即对每张切片的阳性细胞(基本不着色、着色淡、着色适中、着色强)及阳性细胞率( $\leq 5\%$ ,  $6\%-30\%$ ,  $31\%-70\%$ ,  $\geq 71\%$ )分别计分为0, 1, 2, 3然后根据两项评分之和判断结果: 0-2分为阴性(-), 3-4分为阳性(+),  $\geq 5$ 分为强阳性(++). VEGF阳性判定标准参照有关文献[9]. 以细胞质内出现棕黄色颗粒状染色为阳性标准, 高倍镜下( $\times 400$ )对每张切片随机选取5个视野, 每个视野计数200个细胞, 共计1000个, 计算阳性细胞的百分数. MVD的测定参照Weidner *et al*<sup>[10]</sup>的方法: (1)CD34阳性以血管内皮细胞胞质内出现棕黄色颗粒状染色为标准; (2)微血管计数以被染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为1个血管计数. 只要结构不相连, 其分支结构也计作一个血管计数(肌层较厚以及管腔面积大于8个红细胞直径的不计数). (3)先在低倍( $\times 40$ )下观察切片, 选择微血管分布最高密度区; 然后在高倍( $\times 200$ )计数5个视野的微血管数, 取其平均值为该例的MVD值, 分辨不清或染色模糊的细胞不计入计数结果。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析, 根据资料的性质和数据类型分别用t检验、方差分析及卡方检验, 相关性检验用Spearman等级相关分析, 显著性水平 $\alpha \leq 0.05$ .

## 2 结果

实验开始时, 各组大鼠进食、饮水好, 喜活动, 背毛柔顺、有光泽. 模型组在第4周死亡1只, 经病理确诊死亡原因为肝细胞的中毒坏死、肺部感染, 死前背毛倒竖、无光泽, 精神萎靡, 活动减少, 体质量明显下降. 治疗组无1例死亡; 8-10 wk模型组及中、小剂量治疗组各死亡2只, 经病理确诊均有肝硬化形成, 死前除精神差, 活动减少外, 其他无异常表现; 14-16 wk模型组死亡3只, 治疗组各死亡1只(表1), 经病理确诊为肝癌, 死前精神萎靡, 进食较差, 活动减少, 背毛倒竖, 但体质量无明显变化, 其中2例解剖发现腹腔大量出血, 1例可见大量腹水形成伴肝癌肺部转移, 1例可见肠胀气并与肝脏粘连未见转移; 实验结束时, 除SSd大剂量治疗组有两例未见肝癌形成外, 其他各治疗组及模型组均可见明显的肝癌形成. 提示SSd能够减轻造模大鼠早期的中毒症

表 1 实验性大鼠死亡率

	空白	单纯	SSd		
	对照组	造模组	大剂量组	中剂量组	小剂量组
<i>n</i>	10	20	20	20	20
死亡 <i>n</i> (%)	0(0)	6(30.0)	1(5.0)	3(15.0)	3(15.0)

状, 降低大鼠死亡率, 抑制肝癌的形成与发展。

2.1 大鼠肝脏癌变过程中的病理变化 正常对照组大鼠肝脏表面光滑, 色淡红, 边缘锐利, 质地软. 随着诱癌过程的进行, 实验经历肝炎、肝硬化阶段进而形成肝癌. 实验结束时, 单纯造模组大鼠肝脏表面粗糙, 可见多个大小不一的灰白色癌结节, 最大者 $1.5\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 0.8\text{ cm}$ , 切面呈结节状, 可见出血和坏死, 癌周肝脏常伴有结节或肝硬化改变; 相反, SSd各治疗组癌结节数及灶的大小均小于对照组, 其中SSd大剂量治疗组有两例未见肝癌形成(图1A-C). 镜下观: 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐, 细胞核清晰. 单纯造模组正常肝小叶结构被破坏, 大体观白色结节处为肝癌细胞, 瘤细胞呈多形性, 异形性明显, 胞核增大, 胞质少, 嗜碱性. 根据Edmondson分级法<sup>[11]</sup>多数属于III级; 相反, SSd各干预组镜下癌细胞分化程度高, 异型性低, 分级多为I-II级(图1D-F), 提示SSd能够抑制肝癌的形成与发展。

2.2 大鼠肝脏癌变过程中COX-2与VEGF的表达 诱癌早、中期, 单纯造模组中可见COX-2蛋白的微弱表达, 相应SSd各治疗组中COX-2蛋白的表达较单纯造模组有所下降, 但无统计学差异; 诱癌晚期单纯造模组中COX-2蛋白的表达明显增强(图2A1), 与早、中期单纯造模组COX-2蛋白的表达相比差异显著( $P < 0.001$ , 表2), 相应SSd各治疗组中COX-2蛋白的表达均较单纯造模组明显下降, 以SSd大、中剂量组效果最明显(图2B1), 与单纯造模组相比( $P < 0.01$ ), 但SSd大、中剂量间无显著性差异( $P > 0.05$ ), 在正常肝脏中未见COX-2蛋白的表达(图2C1). VEGF在正常肝脏中及诱癌早期阶段表达均较少, 分别为( $3.9 \pm 1.5$ ,  $12.8 \pm 3.2$ , 图2A2), 随着诱癌过程的进行, 表达增强, 晚期肝癌组织中VEGF呈弥漫性表达(图2B2), 单纯造模组中、晚期VEGF的表达分别为( $31.9 \pm 4.2$ ,  $72.8 \pm 10.6$ ), 较正常肝脏及诱癌早期阶段表达均明显增强( $P < 0.001$ , 图3A); SSd大、中、小剂量干预组中, 诱癌早期VEGF表达分别为( $10.3 \pm 2.2$ ,  $11.2 \pm 3.1$ ,  $10.6 \pm 2.6$ ), 和单纯造模

## ■ 相关报道

Nagatsuka *et al*报道在植入人结肠癌细胞株的小鼠中, COX-2抑制剂可阻抑VEGF的产生, 影响肿瘤组织血管形成. Lara-Pezzi *et al*报道在裸鼠肝转移模型上, COX-2抑制剂可抑制结肠癌细胞株产生MMP-2, 减弱肿瘤的侵袭力。

### ■创新盘点

本文通过动态检测大鼠肝脏癌变过程中COX-2与VEGF的变化, 结果发现SSd对诱癌晚期即肝癌期的血管形成抑制作用明显, 而对诱癌早、中期即肝炎、肝硬化期的血管形成未见明显的抑制作用。

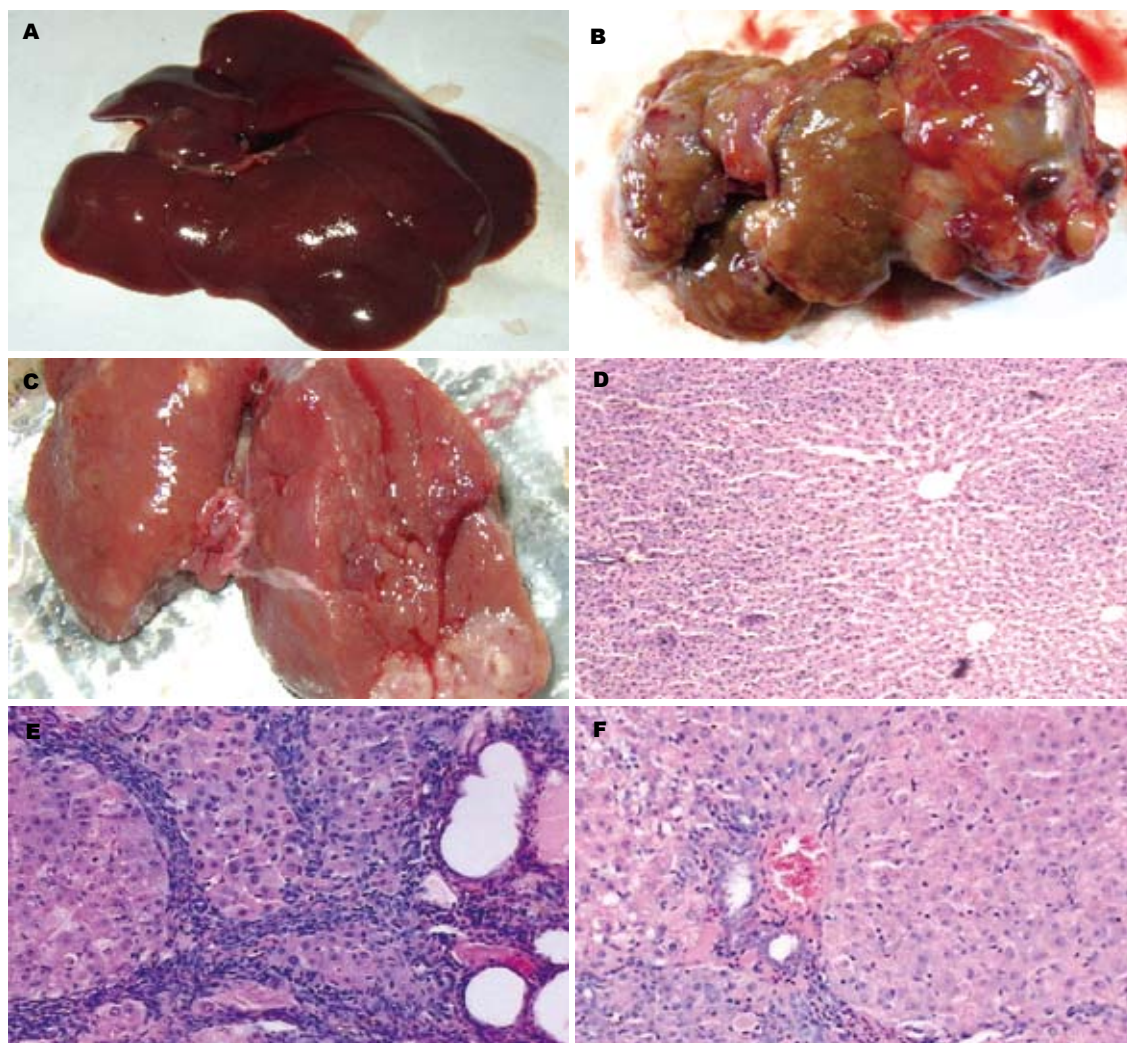


图1 大鼠肝脏癌变过程中的病理变化. A: 正常组; B: 第16周模型组; C: 第16周SSd大剂量组; D: 正常组(HE × 40); E: 第16周模型组(HE × 100); F: 第16周SSd大剂量组(HE × 100).

表2 SSd对大鼠肝脏癌变过程中COX-2表达的抑制作用 (n)

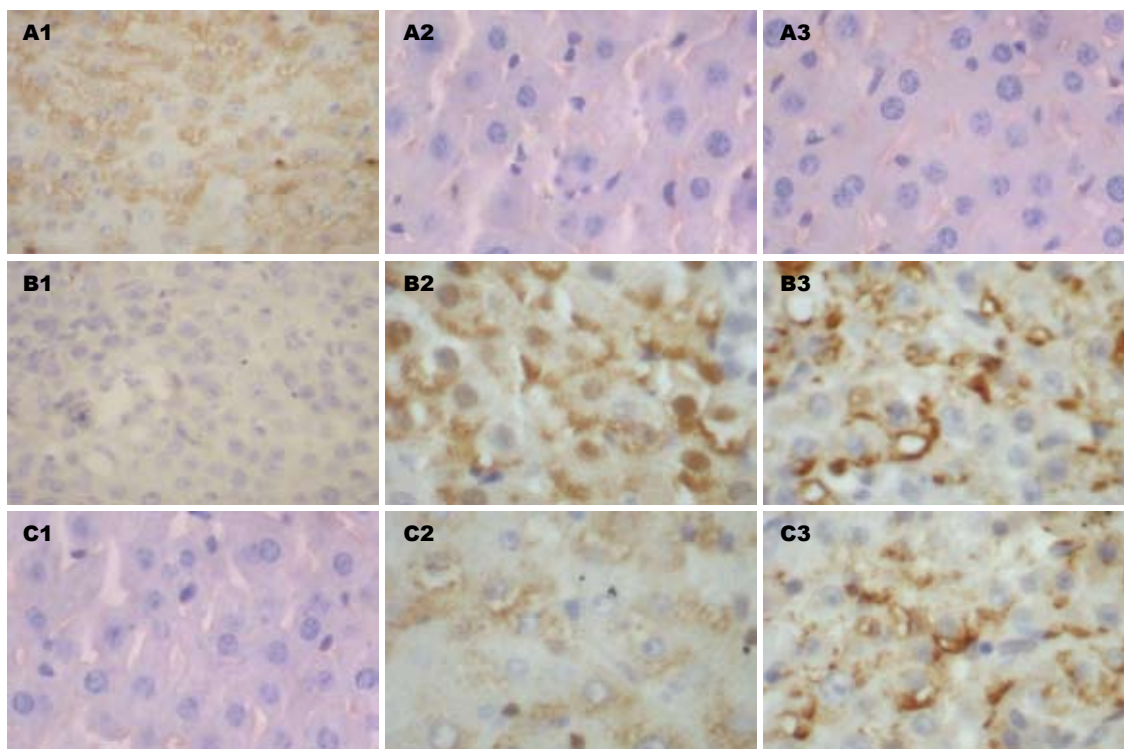
分组	诱癌早、中期				诱癌晚期			
	n	-	+	++	n	-	+	++
模型组	8	3	3	2	12	1	5	6
SSd大剂量组	10	5	4	1	10	4	5	1
SSd中剂量组	8	4	2	2	12	3	5	4
SSd小剂量组	8	3	4	1	12	3	4	5

组相比无统计学差异. 相反, 诱癌中、晚期各干预组VEGF的表达分别为(16.1±2.1, 17.4±3.9, 24.6±5.2; 27.2±11.5, 30.5±9.7, 48.9±12.3), 均较单纯造模组明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

2.3 大鼠肝脏癌变过程中MVD的变化 CD34在正常大鼠肝脏及诱癌早期肝组织中表达量极低, MVD分别为(4.8±1.1, 5.4±1.6), 组间无差异性. 在诱癌中期表达增加, 诱癌晚期表达最明显, MVD分别为(10.7±2.1, 28.4±4.5)(图2A3、B3,

图3B); SSd干预后, 对早期CD34在大鼠肝组织中的表达几乎无影响, 和单纯造模组相比无统计学差异. 诱癌中、晚期, SSd大、中、小剂量组MVD分别为(7.2±3.0, 8.4±1.5, 9.6±2.2; 12.8±4.9, 14.9±3.7, 17.8±5.4)均较单纯造模组有不同程度减少, 其中SSd大剂量组抑制血管生成作用最明显( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ . 图2C3, 图3B).

2.4 COX-2、VEGF表达与大鼠肝癌MVD的相关性分析 相关分析显示, 在大鼠肝脏癌变过程



**■应用要点**  
 本研究表明柴胡皂甙D可能通过抑制肿瘤血管生成的效应, 达到靶向抗肝肿瘤治疗的目的, 有望成为一种新的毒副作用小的天然抗肝肿瘤药物投入临床应用, 具有良好的应用前景。

图 2 大鼠肝脏癌变过程中COX-2, VEGF和CD34的表达. A1、B1、C1: 分别为诱癌晚期模型组、SSd大剂量治疗组及正常肝脏COX-2蛋白的表达(SABC法×400); A2、B2、C2: 分别为正常肝脏组织、诱癌晚期模型组及诱癌晚期SSd大剂量治疗组中VEGF蛋白的表达(SABC法×400); A3、B3、C3: 分别为正常肝脏组织、诱癌晚期模型组及诱癌晚期SSd大剂量治疗组中CD34的表达(SABC法×200).

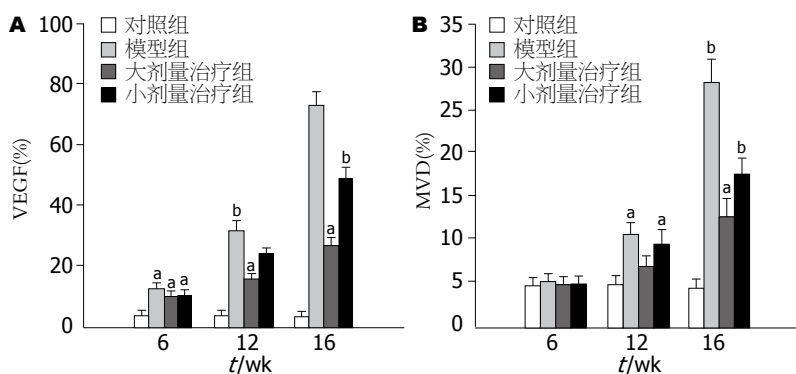


图 3 SSd对大鼠肝脏癌变过程中VEGF和MVD表达的影响. A: VEGF; B: MVD; \* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

中, COX-2与VEGF( $r = 0.815, P < 0.01$ ), VEGF与MVD( $r = 0.862, P < 0.01$ )以及COX-2与MVD( $r = 0.726, P < 0.01$ )的表达均明显正相关(图4).

### 3 讨论

DEN具有很强的化学毒性, 所含的亚硝胺基因具有中毒剂和诱癌剂的双重效应<sup>[12]</sup>, 并且其诱发的肿瘤多为肝细胞癌, 和人肝细胞癌比较相似. 我们每周5次给予SD大鼠2 mg/L DEN, 按体质量10 mg/kg给药, 由于我们精确控制给药剂量, 减少了实验早期DEN对大鼠的毒性, 实验早期仅死亡1只大鼠, 降低了早期实验大鼠的死亡率. 实验经历肝炎、肝硬化阶段进而形成肝癌,

很好的模拟了人肝癌的发生、发展过程. 诱癌16 wk后, 病理结果证实大鼠肝癌形成, 所诱发出的肝癌多数是结节型肝癌, 而人肝癌也是以结节型最为常见<sup>[13]</sup>. 因此, 通过间断小剂量DEN ig诱发肝肿瘤是一种经典的建立大鼠肝癌的模型.

造模同时, 我们给予SSd干预治疗, 发现SSd各治疗组大鼠饮食、精神、活动等一般情况变差, 均比单纯造模组出现的晚且程度较轻; 实验结束时共死亡大鼠13只, 其中模型组6只, SSd大剂量治疗组1只, 中、小剂量组各3只; 模型组, SSd大、中、小剂量组死亡率分别为30%、5%、15%、15%; 肉眼下SSd各治疗组癌结节数及灶的大小均小于对照组, 其中SSd大剂量

### ■名词解释

柴胡皂甙D(SSd): 是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分, 具有糖皮质激素(GC)样甾环结构, 能够抑制花生四烯酸等代谢产物的生成, 具有显著的抗炎、抗肿瘤作用。

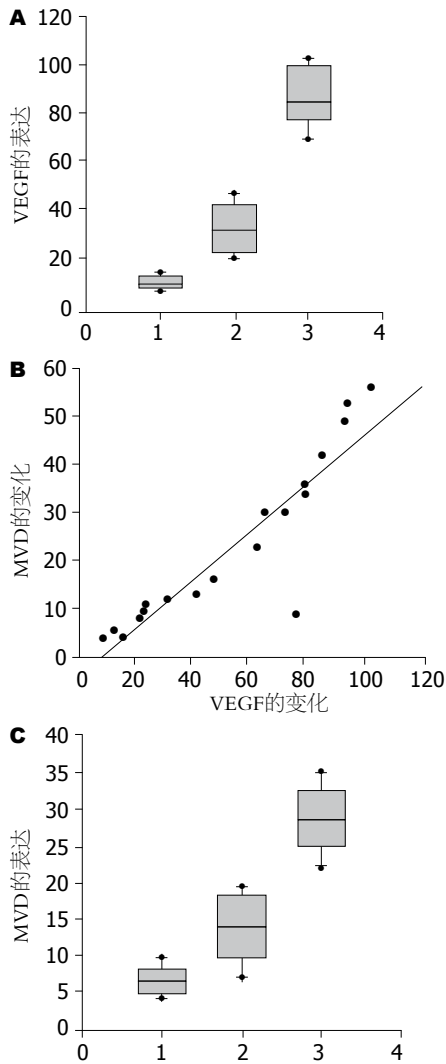


图4 肝肿瘤组织中VEGF、COX-2与MVD三者之间的关系。A: VEGF与COX-2,  $r = 0.815, P < 0.01$ ; B: MVD与VEGF,  $r = 0.862, P < 0.01$ ; C: MVD与COX-2,  $r = 0.726, P < 0.01$ 。1-3: 分别代表COX-2(-)、(+)、(++)。

治疗组有两例未见肝癌形成。镜下可见单纯造模组正常肝小叶结构破坏, 瘤细胞呈多形性, 异形性明显, 胞核增大, 胞质少, 嗜碱性。根据Edmondson分级法<sup>[11]</sup>多数属于III级; 相反, SSd各干预组镜下癌细胞分化程度高, 异型性较低, 分级多为I-II级, 提示SSd具有抵抗DEN对大鼠的毒性作用, 抑制肝癌的形成与发展。

环氧化酶(cyclooxygenase, COX), 又称前列腺素内过氧化物合成酶(prostaglandin H synthase, PGHS), 是合成前列腺素(prostaglandin, PG)的一个关键限速酶。目前发现, 哺乳动物中至少存在两种COX的异构酶: COX-1和COX-2。COX-1属于结构型基因, 在正常组织和细胞中稳定表达, 促进PG的产生, 参与机体多种生理功能的完成; 而COX-2是一种诱导型表达蛋白, 主要表达于核膜, 被认为是“快速反应基因”一般

只在各种诱导因子如炎症因子、内毒素、肿瘤诱导剂等的诱导下迅速合成, 从而参与炎症、肿瘤等多种病理生理的发生、发展过程。近年来研究表明, COX-2有诱导肿瘤血管生成的特性, 在许多癌前病变及恶性肿瘤中均表达增强, 被认为与肝癌的发生、发展、浸润、转移及血管形成有密切关系<sup>[1-4]</sup>。肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移的形态学基础, 他不仅为肿瘤提供充足的营养, 而且为转移的肿瘤细胞提供了通道。VEGF为分子质量为36-45 kDa的二聚体糖蛋白, 是目前已知最强烈的血管发生蛋白, 当与其受体(flt-1和KDR/flt-1)特异性结合后通过诱导血管内皮细胞增殖、增强血管通透性, 促进包括肝癌在内的多种肿瘤新生血管的形成及癌细胞的侵袭和转移<sup>[14]</sup>。

我们在建立大鼠肝癌模型基础上, 全程检测其癌变过程中COX-2与VEGF的动态变化。结果显示, 正常肝脏组织中未见或者仅有少量COX-2与VEGF的阳性表达, 随着诱癌过程的进行, 肝脏中逐渐出现COX-2与VEGF的阳性表达, 并且表达逐渐增加, 肝癌形成时表达最明显, 提示COX-2与VEGF参与了大鼠肝癌的发生与发展过程; 另外, 在诱癌各期, 我们还全程检测了CD34标记的MVD值变化, 研究认为CD34标记的微血管是真正的新生肿瘤血管<sup>[15-16]</sup>, 我们发现CD34在正常大鼠及诱癌早、中期肝组织表达量极低, 而在诱癌晚期即肝癌期表达明显增加( $P < 0.01$ ); 同时我们发现, MVD值与COX-2及VEGF的表达明显正相关, 在COX-2表达阴性以及VEGF低表达时, CD34在肝组织中几乎不表达。相反, 在COX-2表达阳性时, 且在VEGF高表达时MVD值明显增加( $P < 0.01$ ); 说明COX-2和VEGF与肝癌的肿瘤血管生成有关, 与肝癌的恶性生物行为密切相关, 但两个分子在时间和空间上如何协同作用的机制还不清楚。

目前认为, COX-2的高表达使其催化花生四烯酸生成的前列腺素E2(PGE2)显著增多, PGE2通过与细胞表面的PGE2受体或通过核受体过氧化物酶体增殖物激活受体 $\delta$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ , PPAR $\delta$ )直接进入核内, 诱导多种血管生长因子尤其是VEGF的表达, 促进了肿瘤血管生成。同时, COX-2基因通过核受体(PPAR $\delta$ )可直接作用于VEGF基因, 诱导VEGF mRNA和蛋白表达水平的上调<sup>[17-18]</sup>, VEGF升高又可上调COX-2蛋白的表达和活性<sup>[19]</sup>。从而使COX-2与VEGF之间形成一种正反

馈调节, 共同促进了肿瘤血管的形成. 近年来, 自从Williams *et al*<sup>[20]</sup>初步证实COX-2选择性抑制剂可明显抑制野生型纤维母细胞VEGF的合成, 从而有效抑制血管形成以来, 越来越多的证据表明, 包括肝癌在内的多种恶性肿瘤中COX-2的高表达常伴有VEGF的高表达<sup>[21-22]</sup>, COX-2可以使肿瘤中VEGF的表达上调<sup>[23-24]</sup>, 抑制COX-2则可抑制VEGF的表达<sup>[25]</sup>. 由此推测VEGF可能是COX-2参与肿瘤血管生成的中介物质. HCC是人类最常见的一种血管性恶性肿瘤, 丰富而又扭曲的血管是其重要的特征, 结扎血管或栓塞血管可有效地治疗部分肝癌. 因此, 抑制COX-2的活性, 下调VEGF的表达, 从而减少血管形成在肝肿瘤的治疗中具有重要的现实意义.

本研究发现, 经SSd干预后, 诱癌早、中、晚各期COX-2、VEGF以及CD34的表达均较单纯造模组有所下降, 但以诱癌晚期即肝癌形成期SSd的抑制效果最明显, 与单纯造模组相比差异显著( $P < 0.01$ ); 相应SSd对诱癌早、中期, 即肝细胞的变性坏死期与肝硬化期, COX-2、VEGF及CD34表达的抑制作用较弱, 其中, 诱癌早期SSd各治疗组中COX-2、VEGF与CD34的表达和单纯造模组相比无统计学差异( $P > 0.05$ ); 因此, SSd对DEN诱导大鼠肝癌模型各期的血管形成均有抑制作用, 但对诱癌晚期即肝癌期的血管形成抑制作用最明显.

#### 4 参考文献

- 1 Tang TC, Poon RT, Lau CP, Xie D, Fan ST. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1896-1902
- 2 Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1325-1332
- 3 Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, Ryu WS. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1410-1418
- 4 Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471
- 5 Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Involvement of p53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines. *Cancer Lett* 2004; 213: 213-221
- 6 Chou CC, Pan SL, Teng CM, Guh JH. Pharmacological evaluation of several major ingredients of Chinese herbal medicines in human hepatoma Hep3B cells. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19: 403-412
- 7 He SX, Luo JY, Zhao G, Xu JL, Wang YL, Fu H, Dong L. Effect of saikosaponins-d on cyclooxygenase-2 expression of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 712-714
- 8 Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001; 3: 53-61
- 9 Xie YH, Yuan MB. A relationship between cyclooxygenase-2 expression and tumor angiogenesis in experimental rat liver carcinogenesis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 676-679
- 10 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
- 11 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48, 900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 12 Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat. *Hepatology* 2002; 24: 385-394
- 13 Shimizu M, Iijima H, Horibe T, Yamada M, Suzuki S, Yanagisawa K, Seki T, Moriyasu F. Usefulness of contrast-enhanced ultrasonography with a new contrast mode, Agent Detection Imaging, in evaluating therapeutic response in hepatocellular carcinoma treated with radiofrequency ablation therapy. *Hepatology* 2004; 29: 235-242
- 14 Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; 2: 667-673
- 15 Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 348-351
- 16 Lin P, Buxton JA, Acheson A, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Channon KM, Hale LP, Dewhirst MW, George SE, Peters KG. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8829-8834
- 17 Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002; 62: 506-511
- 18 Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A, Ehrenborg E. PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 361-368
- 19 Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3504-3507
- 20 Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois

#### ■同行评价

本文立体新颖, 设计较合理, 对揭示柴胡皂甙D对肝癌的治疗作用及其机制有一定的科学意义.

- RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1589-1594
- 21 Yuan A, Yu CJ, Shun CT, Luh KT, Kuo SH, Lee YC, Yang PC. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 2005; 115: 545-555
- 22 Liu J, Yu JP, Wang XL, Zhou XD, Yu HG. The role of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C in lymphatic metastasis of gastric cancer. *Zhonghua Neike Zazhi* 2004; 43: 841-844
- 23 Beraza N, Marqués JM, Martínez-Ansó E, Iñiguez M, Prieto J, Bustos M. Interplay among cardiotrophin-1, prostaglandins, and vascular endothelial growth factor in rat liver regeneration. *Hepatology* 2005; 41: 460-469
- 24 Cheng AS, Chan HL, To KF, Leung WK, Chan KK, Liew CT, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 853-860
- 25 Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2323-2326

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 •

## 世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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,  $3.5 \pm 0.5$  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 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 $\pm$ 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 $\leq$ 100, 百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 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!(常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

## 肝细胞生成素205与细胞色素C的相互作用

储著朗, 王建, 杨永升, 唐刘君, 陈慧, 杨晓明, 汪思应

储著朗, 汪思应, 安徽医科大学病理生理学教研室 安徽省合肥市 230032

储著朗, 王建, 杨永升, 唐刘君, 陈慧, 杨晓明, 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室 北京市 100850

储著朗, 2005级安徽医科大学病理生理硕士, 主要从事蛋白质相互作用研究。

国家自然科学基金创新群体基金资助项目, No. 30621063

国家高新技术研究发展计划(863计划)资助项目, No. 2006AA02A310

国家重点基础研究发展规划(973计划)资助项目, No. 2006CB910802

安徽省人才开发基金资助项目, No. 2002Z035

安徽省2006研究实验基地科研带头人培养专项基金资助项目

作者贡献分布: 储著朗和王建对此文所作贡献均等; 本课题设计由储著朗, 王建, 杨晓明及汪思应完成; 研究过程由储著朗, 杨永升, 唐刘君及陈慧共同完成; 本文写作由储著朗完成。

通讯作者: 汪思应, 230032, 安徽省合肥市梅山路69号, 安徽医科大学病理生理教研室. sywang@ahmu.edu.cn

电话: 0551-5167706 传真: 0551-5167706

收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-03-18

### Identification of interaction between hepatopoietin 205 and cytochrome C

Zhu-Lang Chu, Jian Wang, Yong-Sheng Yang, Liu-Jun Tang, Hui Chen, Xiao-Ming Yang, Si-Ying Wang

Zhu-Lang Chu, Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Zhu-Lang Chu, Jian Wang, Yong-Sheng Yang, Liu-Jun Tang, Hui Chen, Xiao-Ming Yang, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Institute of Radiation Medicine; Beijing Proteome Research Center, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 100850, China

Supported by: the National Natural Science Innovation Group Foundation of China, No.30621063; the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A310; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2006CB910802; the Talent Development Foundation of Anhui Province, No. 2002Z035; and the Experimental Research Base Special Fund for Scientific Research Leaders Training.

Correspondence to: Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, 69 Meishan Road, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2008-01-09 Revised: 2008-03-18

### Abstract

**AIM:** To identify the interaction between hepatopoietin 205 (HPO205) and cytochrome C (Cytc).

**METHODS:** The coding genes of HPO205 and Cytc, amplified by polymerase chain reaction, were cloned into pDBLeu and pPC86 vector respectively. The interaction was confirmed by co-transformation with the recombinant plasmids into MaV203 of yeast two-hybrid system (Y2H), and verified by GST-Pull down assay simultaneously.

**RESULTS:** The coding genes of HPO205 and Cytc were successfully cloned into relevant vectors, and the obtained vectors were named as pDBLeu-*GRER*, pDBLeu-*CYCS*, pPC86-*GFER* and pPC86-*CYCS*. After Y2H identification, we found that co-transformation of pDBLeu-*GFER* pPC86-*CYCS* activated reporter genes *Ura* and *His*, but co-transformation of pDBLeu-*CYCS* and pPC86-*GFER* activated no reporter genes. GST-Pull down assay showed that HPO205 was deposited by GST-*CYCS*, but not by GST, verifying the interaction between HPO205 and Cytc.

**CONCLUSION:** The interaction between HPO205 and Cytc suggests that HPO205 participates in the biology processes of electron transfer or (and) apoptosis via Cytc.

**Key Words:** Hepatopoietin 205; Cytochrome C; Protein-protein interaction; Yeast two hybrid; GST-Pull down

Chu ZL, Wang J, Yang YS, Tang LJ, Chen H, Yang XM, Wang SY. Identification of interaction between hepatopoietin 205 and cytochrome C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1281-1286

### 摘要

**目的:** 应用酵母双杂交(yeast two hybrid, Y2H)和GST-Pull down技术鉴定肝细胞生成素205(hepatopoietin 205, HPO205)与细胞色素C(cytochrome c, Cytc)间的相互作用。

**方法:** 采用PCR技术扩增HPO205和Cytc编码基因, 分别将其构建Y2H质粒pDBLeu和pPC86的重组载体。应用Y2H技术将二者的重组质粒共转染酵母MaV203进行鉴定, 同时用GST-Pull down方法对其验证。

### ■背景资料

人源肝细胞生成素(HPO/ALR)是一种能特异性刺激肝脏再生的细胞因子, 存在于细胞核中; HPO205是其编码基因另一转录本的产物, 存在于胞质和线粒体膜间隙(IMS)中。目前, 关于HPO的功能研究较多, 但对定位在IMS的HPO205的功能还知之甚少。

### ■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

## ■ 相关报道

近些年有报道细胞色素C(Cytc)是人HPO酵母同源分子Erv1p的电子受体,并且以DTT作为还原底物时,Cytc接受来自于人HPO/ALR电子的能力远高于氧分子。

**结果:**成功克隆HPO205和Cytc编码基因至Y2H载体和相应表达载体,包括pDBLeu-*GRER*、pDBLeu-*CYCS*、pPC86-*GRER*、pPC86-*CYCS*。经过Y2H鉴定发现,pDBLeu-*GRER*+pPC86-*CYCS*共转后能激活Ura和His两个报告基因,而pDBLeu-*CYCS*+pPC86-*GRER*共转则不能激活任何一个报告基因。GST-Pull down实验显示,GST-*CYCS*能将HPO205沉淀下来,而GST空蛋白不能沉淀HPO205,证实HPO205与Cytc存在相互作用。

**结论:**HPO205可能通过Cytc参与电子传递或/和细胞凋亡过程。

**关键词:**肝细胞生成素205; 细胞色素C; 蛋白质相互作用; 酵母双杂交; GST-Pull down技术

储著朗, 王建, 杨永升, 唐刘君, 陈慧, 杨晓明, 汪思应. 肝细胞生成素205与细胞色素C的相互作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1281-1286

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1286.asp>

## 0 引言

人源肝细胞生成素(hepatopoietin, HPO/ALR)是一种能特异性刺激肝脏再生的细胞因子,他含有125个氨基酸(15 kDa),并具有巯基氧化酶活性,参与MAPK以及转录因子AP-1通路的激活,存在于细胞核中<sup>[1-3]</sup>;HPO205是HPO/ALR编码基因另一转录本的编码蛋白,在其N端比HPO多80个氨基酸(23 kDa),存在于胞质和线粒体膜间隙(intermembrane space of mitochondria, IMS)中<sup>[3-5]</sup>。HPO属于Erv1p/Alrp蛋白家族,该家族成员广泛存在于从酵母到人的各种低等和高等真核生物以及一些双链DNA病毒中<sup>[6]</sup>。前期研究表明,人HPO的酵母同源分子Erv1p参与线粒体膜间隙蛋白的转运<sup>[7-8]</sup>,定位于IMS中的人Alrp在胞质中铁硫蛋白的生物发生过程中起重要作用<sup>[5]</sup>;正常条件下Cytc也定位于IMS参与呼吸链电子传递以及细胞凋亡,而在以二硫苏糖醇(DTT)作为还原底物时,Cytc接受来自于人HPO/ALR电子的能力是氧分子的100倍<sup>[9]</sup>,推测Cytc可能是HPO电子的接收者。因此,HPO205和Cytc可能存在相互作用。

目前关于HPO/ALR的功能研究较多,但对定位在IMS的HPO205的功能还知之甚少,为了证实HPO205和Cytc的相互作用、探讨HPO205在IMS中的其他功能,本研究利用Y2H和GST-Pull down技术对HPO205和Cytc间相互作用进行鉴定,试图为揭示HPO205的新功能提供线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ProQuest<sup>TM</sup>酵母双杂交系统、成人肝cDNA文库购于美国Invitrogen公司; Yeast Nitrogen Base(YNB)、Bacto-yeast extract、Bacto-Peptone购于美国BD公司; 各种氨基酸购于北京百灵克生物科技有限公司; 3AT、PMSF、PEG3350、LiAc、玻璃珠购自美国Sigma公司; IPTG、X-gal、PCR及酶切产物纯化试剂盒、细菌质粒小量提取试剂盒购于美国Promega公司; Taq酶、dNTP、DNA分子量标记、DNA限制性内切酶购于大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司。T4 DNA连接酶、预染蛋白Marker购于纽英伦生物技术(北京)有限公司; DMEM粉末、胰酶购自Gibco公司,胎牛血清购自四季青公司; 其他所有试剂为国产分析纯以上产品; GST标签抗体、c-Myc标签抗体,HRP-羊抗小鼠IgG、蛋白A/G偶联琼脂糖珠及谷胱甘肽琼脂糖珠购自北京中杉金桥公司; JM109和BL21感受态、pCMV-Myc(MCS经改构)真核表达载体, pGEX-4T-2原核表达载体、HEK293细胞为实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 酵母双杂交载体的构建:**利用PCR扩增的方法从成人肝cDNA文库中获得HPO205和Cytc编码基因的DNA序列,通过相应限制性内切酶酶切后,与同样酶切后的含DNA结合结构域(DNA binding domain, DB)的pDBLeu空载体和含转录激活结构域(activation domain, AD)的pPC86空载体连接,连接产物转化*E.coli JM109*感受态,相应抗性筛选(pDBLeu:卡那抗性;pPC86:氨苄抗性)并挑取阳性菌落提取质粒进行PCR和酶切鉴定,送北京奥科公司测序。

**1.2.2 融合蛋白自激活检测、3AT浓度的确定:**参考ProQuest<sup>TM</sup>酵母双杂交系统操作手册操作进行细菌质粒的酵母菌MaV203转化,分别共转下列质粒组合:用于自激活检测-pDBLeu-*GFER*+pPC86、pDBLeu-*CYCS*+pPC86、pDBLeu+pPC86-*GFER*、pDBLeu+pPC86-*CYCS*,用于相互作用鉴定-pDBLeu-*GFER*+pPC86-*CYCS*和pDBLeu-*CYCS*+pPC86-*GFER*(每种质粒均加入约200 ng)分别涂布于SC-Leu-Trp营养缺陷平板上,30℃培养48-72 h后将平板上所生长酵母挑取4个单克隆/转化,对照菌A-E各2个接种划线到SC-Leu-Trp平板(用于自激活检测和相互作用筛选的酵母克隆分开划线)。将自激活检测的SC-Leu-Trp平板30℃培养24 h后用绒布复制到一系列3AT浓度梯度(10、

25、50、75、100 mmol/L)的SC-Leu-Trp-His营养缺陷平板上并同时用绒布清除, 30℃培养24 h后再清除1次, 30℃继续培养24-48 h观察结果, 抑制转化子细胞生长(基础His表达)的最低的3AT浓度就是鉴定相互作用阳性克隆所需加入的3AT浓度。

1.2.3 Y2H鉴定相互作用: 将1.2.2中转化平板上生长的酵母菌落均划线SC-Leu-Trp平板上(4个单克隆/转化和对照菌A-E各2个), 30℃培养24 h后, 用绒布分别复制到SC-Leu-Trp-Ura-His+3AT(3AT浓度即为1.2.2所确定的浓度)及覆盖有灭菌Whatman滤纸的YPAD平板上, 进行His、Ura、LacZ 3个报告基因的鉴定。

1.2.4 真核表达载体pCMV-Myc-*GFER*(*GFER*: HPO205编码基因)的构建及表达: 将构建成功的pPC86-*GFER*和pCMV-Myc空载体用*EcoR* I、*Spe* I 双酶切, 回收后连接, 转化JM109感受态并经PCR鉴定后获得pCMV-Myc-*GFER*阳性克隆。接种HEK293细胞, 待生长至80%-90%融合时, 利用Invitrogen公司的Lipofectamine™ 2000将pCMV-Myc-*GFER*转染293细胞, 24 h后裂解细胞提取蛋白, 离心收集上清并加入SDS-PAGE样品缓冲液, 煮沸后进行Western blot, 以抗Myc抗体(1:2000稀释)为一抗, 羊抗小鼠IgG(1:2000稀释)为二抗检测表达。

1.2.5 原核表达载体pGEX-4T-2-*CYCS*(*CYCS*: Cytc编码基因)的构建及表达: 将构建成功的pDBLeu-*CYCS*和GST表达空载体pGEX-4T-2用*Sal* I、*Not* I 双酶切, 回收后连接, 转化JM109感受态并经PCR鉴定后获得pGEX-4T-2-*CYCS*阳性克隆。摇菌提取pGEX-4T-2-*CYCS*质粒转化BL21感受态, 以30℃、120 r/min、0.5 mmol/L IPTG诱导4 h后离心收集菌体, 以1×PBS重悬后超声破菌, 10 000 g离心10 min分离上清和沉淀, 分别取适量上清和沉淀重悬液(1×PBS重悬)加SDS-PAGE样品缓冲液沸水煮5-10 min, 冰上冷却后离心收集进行SDS-PAGE电泳后, 考染, 脱色, 观察蛋白在上清和沉淀中的表达情况。并依此条件, 各用200 mL LB大量诱导表达。

1.2.6 GST-Pull down验证相互作用: 将诱导表达的GST空蛋白和融合蛋白用谷胱甘肽-琼脂糖珠纯化(具体操作参考谷胱甘肽-琼脂糖珠使用说明书)。同时以1.2.4的方法将pCMV-Myc-*GFER*转染293细胞, 24 h后裂解细胞提取蛋白; 离心收集上清加入到含有纯化GST空蛋白的谷胱甘肽琼脂糖珠的离心管中(预清除), 4℃旋转混合7 h以

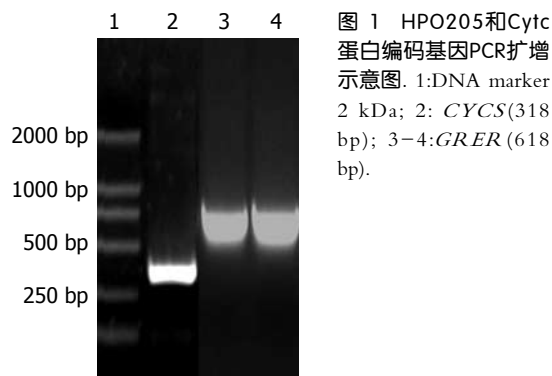


图1 HPO205和Cytc蛋白编码基因PCR扩增示意图。1:DNA marker 2 kDa; 2: *CYCS*(318 bp); 3-4:*GFER*(618 bp)。

■创新盘点  
本研究应用酵母双杂交和GST-Pull down技术, 首次证实HPO205与Cytc存在相互作用。

上, 4℃, 13 000 r/min离心2 min, 再次收集上清取45 μL做蛋白表达对照, 其余平均转移至含有纯化pGEX-4T-2-*CYCS*融合蛋白和GST空蛋白的谷胱甘肽琼脂糖珠的EP管中, 混合8 h或过夜后离心弃上清并用裂解液洗4次, 离心弃上清沉淀加入50 μL的SDS-PAGE样品缓冲液重悬, 煮沸后离心收集上清液, 进行Western blot, 分别以抗Myc抗体(1:2000稀释)、抗GST抗体(1:1000稀释)为一抗, 羊抗小鼠IgG(1:2000稀释)为二抗进行检测。

## 2 结果

2.1 诱饵和猎物载体的构建 通过<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站查找出HPO205和Cytc基因编码序列, 针对基因的全长设计引物, 从成人肝cDNA文库中成功扩增出相应的编码基因, 经酶切、连接、转化、鉴定后送测序, 结果表明pDBLeu-*GRER*、pDBLeu-*CYCS*、pPC86-*GFER*、pPC86-*CYCS*载体构建正确, 这样成功构建出HPO205和Cytc酵母双杂交载体(表1, 图1)。

2.2 融合蛋白自激活检测及3AT浓度的确定 根据加入不同浓度3AT的SC-Leu-Trp-His营养缺陷平板上的菌落生长情况, 可以观察到所有自激活的质粒组合(见1.2.2)共转酵母MaV203后的转化子在3AT浓度为25、50、75、100 mmol/L的平板均不能生长, 表明所构建的诱饵和猎物均无自激活作用, 可用于酵母双杂交系统进行相互作用筛选。因此采用25 mmol/L的3AT浓度作为鉴定相互作用阳性克隆的浓度。

2.3 Y2H鉴定相互作用 将pDBLeu-*GFER*+pPC86-*CYCS*、pDBLeu-*CYCS*+pPC86-*GFER*共转MaV203后生长的酵母划线4个转化至新的SC-Leu-Trp平板, 进行His、Ura、LacZ表型分析。发现pDBLeu-*GFER*+pPC86-*CYCS*共转后能激活Ura和His两个报告基因, 而pDBLeu-*CYCS*+pPC86-*GFER*共转则不能激活任何一个

### 应用要点

本文为研究HPO205在IMS中的功能以及可能机制提供了线索。

表 1 Y2H诱饵和猎物载体构建情况

蛋白名称	编码基因(WCBL_AC)	靶向载体	酶切位点	引物序列 <sup>1</sup>
HPO205	<i>GFER</i> (NM_005262)	pDBLeu	<i>Stu</i> I	5'-gaaggccttgatggcggcgcccggcgag-3'
			<i>Spe</i> I	5'-ggactagtctagtcacaggagccatc-3'
		pPC86	<i>Eco</i> RI	5'-gggaattcagatggcggcgcccggcgag-3'
			<i>Spe</i> I	5'-ggactagtctagtcacaggagccatc-3'
Cytc	<i>CYCS</i> (NM_018947)	pDBLeu	<i>Sa</i> I	5'-acgcgtcgaccatgggtgatgttgagaaaggcaag-3'
		和pPC86	<i>Not</i> I	5'-ataagaatgaggccgcttactcattagtagctttttgag-3'

<sup>1</sup>斜体加下划线部分为相应酶切位点。

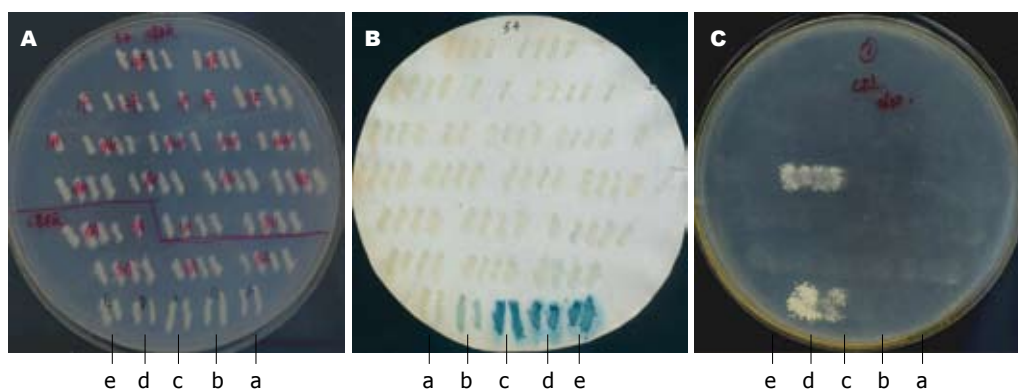


图 2 酵母双杂交筛选相互作用表型鉴定。A: 母板(B、C和母板的酵母克隆位置对应)图中白色线段即为划线生长的酵母单克隆, 指示的a-e为对照菌, 从a-e相互作用由阴性逐渐增强到强阳性; B: LacZ表型, 阳性菌落应显蓝, 白色表示阴性, 和a-e对照菌对比判断阳性和强弱; C: Ura和His表型, 生长菌落为阳性菌落(pDBLeu-*GFER*+pPC86-*CYCS*, 图中pDBLeu-*CYCS*+pPC86-*GFER*阴性结果未显示出来), 和a-e对照菌对比判断阳性和强弱。

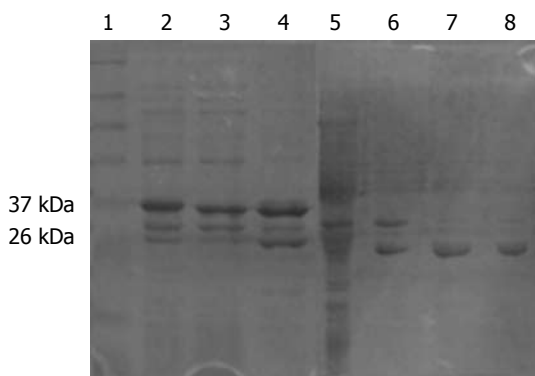


图 3 SDS-PAGE电泳后考染检测GST空蛋白以及GST-融合蛋白表达情况。1: 预染蛋白marker; 2: GST-*CYCS*(37 kDa)全菌; 3: GST-*CYCS*上清; 4: GST-*CYCS*沉淀; 5: 未经IPTG诱导菌对照; 6: GST空蛋白(26 kDa)全菌; 7: GST空蛋白上清; 8: GST空蛋白沉淀。

报告基因(图2)。

2.4 真核表达载体pCMV-Myc-*GFER*的构建及表达 亚克隆成功构建pCMV-Myc-*GFER*后, 将其质粒瞬时转染HEK293细胞, 24 h后裂解细胞提取蛋白进行Western blot检测, 发现pCMV-Myc-*GFER*在293细胞中正常表达。

2.5 原核表达载体pGEX-4T-2-*CYCS*的构建及表

达 亚克隆成功构建pGEX-4T-2-*CYCS*后, 以0.5 mmol/L IPTG诱导后超声破菌, 离心分离上清和沉淀, 取上清和沉淀重悬液进行SDS-PAGE电泳后, 考染, 脱色。发现GST空载体以及pGEX-4T-2-*CYCS*(GST-*CYCS*)在上清中均有表达(图3)。

2.6 GST-Pull down验证相互作用 谷胱甘肽琼脂糖珠纯化GST融合蛋白和GST空蛋白后与转染了pCMV-Myc-*GFER*的HEK293细胞裂解液(预清除后)混合孵育, 离心、洗涤后加入SDS-PAGE样品缓冲液进行Western blot。实验结果表明: GST-*CYCS*能将HPO205沉淀下来, 而GST空蛋白不能沉淀HPO205, 进一步证明了酵母双杂交筛选HPO205与Cytc相互作用的可可靠性(图4)。

### 3 讨论

蛋白质-蛋白质相互作用是一切生命活动的基础, 作为研究蛋白质相互作用的技术平台, 近年来酵母双杂交(Y2H)技术已经成功用于各种模式生物以及人类大规模相互作用组的研究<sup>[10-13]</sup>, 但该技术自身的局限性造成结果存在假阳性和假阴性。为了减少假阳性, 本研究采用可信度高的ProQuest™酵母双杂交系统(低拷贝载体、3

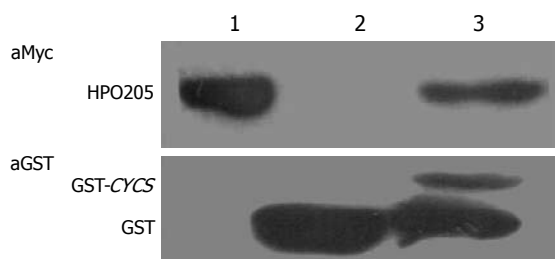


图 4 GST-Pull down验证HPO205和Cyt c相互作用. 1: Input(pCMV-Myc-GFER); 2: GST+pCMV-Myc-GFER; 3: GST-CYCS+pCMV-Myc-GFER.

个独立的报告基因及严格对照)并应用GST-Pull down对相互作用进行验证, HPO205和Cyt c间相互作用经Y2H和GST-Pull down鉴定均为阳性, 表明该对相互作用结果比较可靠; 而且本研究在应用Y2H技术时采取诱饵和猎物互换形式(即DB-HPO205对AD-Cyt c和AD-HPO205对DB-Cyt c)鉴定以减少假阴性, 发现Y2H阳性结果是通过HPO205和Cyt c特定载体的融合获得的, 而反向鉴定时为阴性结果, 这可能由于不同载体造成融合蛋白的折叠形式差异所致<sup>[14]</sup>.

Erv1p/Alrp蛋白家族成员广泛存在于从酵母到人的各种低等和高等真核生物以及一些双链DNA病毒中, HPO和HPO205是该家人Alrp蛋白成员<sup>[6]</sup>. 人ALR与酵母Erv1p分子在结构和功能上具有一定的同源性<sup>[6]</sup>, 他们C-末端都具有保守的CXXC模序、都具有巯基氧化酶功能<sup>[1,15]</sup>. Erv1p以二聚体形式定位于IMS中, 参与胞质中铁硫蛋白的生物发生<sup>[5]</sup>. 在酵母IMS中Erv1p和Mia40分子共同形成二硫键的接力系统, 通过氧化折叠机制参与IMS中小Tims蛋白的转运, 电子也由小Tims前体蛋白经Mia40分子传递给Erv1p<sup>[8,16-18]</sup>. 最近研究发现, 通过电子传递Erv1p将二硫键的接力系统和呼吸链联系起来<sup>[19-20]</sup>, 该途径中Cyt c和Cyt c过氧化物酶(cytochrome c peroxidase, Ccp1)发挥Erv1p依赖性的电子受体作用: Erv1p通过和Cyt c形成复合物直接将电子传递给细胞色素, 或将电子传递给分子氧、通过Ccp1将产生的过氧化氢还原为水<sup>[21]</sup>; 前期应用酵母双杂交技术以人HPO为诱饵筛选肝脏cDNA文库, 也曾经得到呼吸链上的多种相互作用蛋白, 如NADH脱氢酶等<sup>[22]</sup>, 而且, 以DTT作为还原底物时, Cyt c接受来自于人HPO/ALR电子的能力远高于氧分子<sup>[9]</sup>, 因此, 人的HPO205和Cyt c间的相互作用提示HPO205可能作为电子传递载体发挥电子传递功能从而影响能量代谢.

此外, 对哺乳动物Alrp的研究发现, Alrp能促进肝源性细胞线粒体基因的表达, 提高细胞内细胞色素含量, 增强线粒体氧化磷酸化能力<sup>[23]</sup>. 巯基氧化酶在维持线粒体膜结构完整性和功能上具有重要作用: 他可以催化底物蛋白形成新的二硫键改变蛋白构象, 从而影响膜的功能<sup>[24]</sup>; 另一方面巯基氧化酶可以调节线粒体的氧化还原电势<sup>[25]</sup>. 而线粒体维持恰当的膜电位是进行氧化磷酸化的前提. 线粒体途径凋亡的早期事件涉及线粒体膜通透性增加引起的膜电位丧失和Cyt c从IMS中释放. 前期研究表明HPO和凋亡相关蛋白BNIP1间存在相互作用<sup>[26]</sup>. 本研究发现HPO205和Cyt c存在相互作用, 提示在IMS中HPO205作为巯基氧化酶<sup>[1]</sup>可能通过调控Cyt c的释放影响细胞凋亡.

总之, 本研究应用Y2H和GST-Pull down技术鉴定出HPO205和Cyt c间的相互作用, 提示HPO205可能通过Cyt c发挥电子传递功能或/和影响细胞凋亡, 但这些假设只是基于相互作用的初步设想, 对于HPO205发挥功能的精确机制则需要更进一步研究.

**致谢:** 感谢北京蛋白质组研究中心蛋白质相互作用研究室原艳芝、金超智等老师和同事在课题研究过程中的帮助; 感谢安徽医科大学病理生理学教研室郑红、李菲菲等老师对本课题的支持.

#### 4 参考文献

- 1 Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G. Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 173-180
- 2 Lu C, Li Y, Zhao Y, Xing G, Tang F, Wang Q, Sun Y, Wei H, Yang X, Wu C, Chen J, Guan KL, Zhang C, Chen H, He F. Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB J* 2002; 16: 90-92
- 3 Li Y, Wei K, Lu C, Li Y, Li M, Xing G, Wei H, Wang Q, Chen J, Wu C, Chen H, Yang S, He F. Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3888-3893
- 4 Lu J, Xu WX, Zhan YQ, Cui XL, Cai WM, He FC, Yang XM. Identification and characterization of a novel isoform of hepatopoietin. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 353-356
- 5 Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Mühlenhoff U, Kispal G, Lill R. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2001; 2: 715-720
- 6 Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. Insights on augments of liver regeneration cloning and

#### 同行评价

本研究方法和技术有特色, 证据充分, 结论明确, 具有一定的科学性, 创新性和可读性.

- function. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4951-4958
- 7 Rissler M, Wiedemann N, Pfannschmidt S, Gabriel K, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* 2005; 353: 485-492
- 8 Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 2005; 121: 1059-1069
- 9 Farrell SR, Thorpe C. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* 2005; 44: 1532-1541
- 10 Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL Jr, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg JM. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2003; 302: 1727-1736
- 11 Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gonsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 2004; 303: 540-543
- 12 Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzclaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksöz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 2005; 122: 957-968
- 13 Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005; 437: 1173-1178
- 14 Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabási AL, Vidal M, Zoghbi HY. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006; 125: 801-814
- 15 Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; 477: 62-66
- 16 Tokatlidis K. A disulfide relay system in mitochondria. *Cell* 2005; 121: 965-967
- 17 Grumbt B, Stroobant V, Terziyska N, Israel L, Hell K. Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 2007; 282: 37461-37470
- 18 Müller JM, Milenkovic D, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. Precursor oxidation by mia40 and erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 226-236
- 19 Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol* 2007; 179: 389-395
- 20 Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol* 2005; 353: 937-944
- 21 Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM. A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J* 2007; 26: 4801-4811
- 22 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screening of augmenter of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 81-84
- 23 Polimeno L, Capuano F, Marangi LC, Margiotta M, Lisowsky T, Ierardi E, Francavilla R, Francavilla A. The augmenter of liver regeneration induces mitochondrial gene expression in rat liver and enhances oxidative phosphorylation capacity of liver mitochondria. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 510-517
- 24 Wittke I, Wiedemeyer R, Pillmann A, Savelyeva L, Westermann F, Schwab M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7742-7752
- 25 Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schürmann P, Droux M, Buchanan BB. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2642-2647
- 26 Shen L, Hu J, Lu H, Wu M, Qin W, Wan D, Li YY, Gu J. The apoptosis-associated protein BNIP1 interacts with two cell proliferation-related proteins, MIF and GFER. *FEBS Lett* 2003; 540: 86-90

# 选择性环氧合酶-2抑制剂PC407对TNBS诱导的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用

白卉, 张邦乐, 李宇华, 游宇, 郭振军, 孙阳, 梅其炳

白卉, 张邦乐, 李宇华, 郭振军, 孙阳, 梅其炳, 中国人民解放军第四军医大学药理学教研室 陕西省西安市 710032  
游宇, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院神经外科 陕西省西安市 710038

白卉, 2005级中国人民解放军第四军医大学硕士, 主要从事药物合成及消化药理的研究。

作者贡献分布: 此课题由梅其炳及白卉设计; 研究过程由白卉, 张邦乐, 李宇华, 郭振军及孙阳操作完成; 研究所用新化合物合成及结构分析由白卉及张邦乐完成; 数据分析由白卉, 游宇及孙阳完成; 本论文写作由白卉, 李宇华及梅其炳完成。

通讯作者: 梅其炳, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 中国人民解放军第四军医大学药理学教研室。

qbmei@fmmu.edu.cn

电话: 029-84774552 传真: 029-84774552

收稿日期: 2007-11-12 修回日期: 2008-03-11

## Therapeutic effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor PC407 on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats

Hui Bai, Bang-Le Zhang, Yu-Hua Li, Yu You, Zhen-Jun Guo, Yang Sun, Qi-Bing Mei

Hui Bai, Bang-Le Zhang, Yu-Hua Li, Zhen-Jun Guo, Yang Sun, Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Yu You, Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, 17 Changle Western Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. qbmei@fmmu.edu.cn

Received: 2007-11-12 Revised: 2008-03-11

### Abstract

**AIM:** To explore the therapeutic effects of a new selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor PC407 on rat ulcerative colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and its possible mechanism.

**METHODS:** A rat colitis model was induced by TNBS and ethonal enema. The rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model control group, celecoxib group (18 mg/kg) and PC407 groups (9, 18mg/kg). Celecoxib

and PC407 were administered intragastrically once per day for 6 days and the loose stool were recorded. All the rats were anesthetized to separate colon, thymus gland and spleen on the 7th day. The body weights of experimental rats before anesthesia were documented and the macroscopic and histological changes of the colon were observed. The effects in treatment groups were evaluated by loose stool rate, colon index, ulcer ratio, thymus index and spleen index. The protein products of COX-2, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in mucosa were analyzed by immunohistochemistry.

**RESULTS:** In comparison with that in model control group, the body weight was increased significantly in 18 mg/kg-PC407 group (258.9 g vs 223.6 g,  $P < 0.05$ ), but the loose stool rate was decreased markedly (30% vs 80%,  $P < 0.01$ ); moreover, 18 mg/kg PC407 significantly ameliorated the lesions and pathological changes in colon caused by TNBS, improved the indexes such as colon index ( $5.03 \pm 1.26$  mg/g vs  $7.60 \pm 2.07$  mg/g,  $P < 0.01$ ), ulcer ratio ( $24.69\% \pm 2.83\%$  vs  $36.13\% \pm 9.64\%$ ,  $P < 0.01$ ), thymus index ( $1.96 \pm 0.48$  mg/g vs  $1.08 \pm 0.32$  mg/g,  $P < 0.01$ ) and spleen index ( $2.85 \pm 0.33$  mg/g vs  $3.87 \pm 0.96$  mg/g,  $P < 0.01$ ), and down-regulated the colonic mucosal expression of COX-2 ( $30.6\% \pm 7.0\%$  vs  $67.4\% \pm 1.2\%$ ,  $P < 0.01$ ) and TNF- $\alpha$  ( $19.5\% \pm 3.0\%$  vs  $52\% \pm 4.7\%$ ,  $P < 0.01$ ). PC407 at a dose of 9 mg/kg also could improve the above indexes, but the effects were less than PC407 at 18 mg/kg.

**CONCLUSION:** PC407 has significant therapeutic effects on TNBS-induced colitis in rats, and the mechanism may relate to its regulation on COX-2 and TNF- $\alpha$  expression.

**Key Words:** Ulcerative colitis; 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; Selective COX-2 inhibitor; Immunohistochemistry; Cyclooxygenase; Tumor necrosis factor-alpha

Bai H, Zhang BL, Li YH, You Y, Guo ZJ, Sun Y, Mei QB. Therapeutic effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor PC407 on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren*

### ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性特异性炎症反应。作为UC的首选治疗药物,氨基水杨酸类药物因其对环氧合酶(COX)的非选择性抑制而产生不良反应,新型非甾体抗炎药(NSAID)的应用正在探索之中。

### ■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理学室; 陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第二一一医院中医师

## ■ 研发前沿

UC被世界卫生组织列为现代难治病之一,其病因探寻和治疗药物发掘一直是研究热点.

Xiaohua Zazhi 2008; 16(12): 1287-1293

## 摘要

**目的:** 观察新型选择性环氧合酶-2抑制剂PC407对2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎的疗效并探讨其机制.

**方法:** 应用TNBS/乙醇灌肠复制大鼠溃疡性结肠炎模型. 实验设正常对照组、模型对照组、塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)和PC407治疗组(9, 18 mg/kg), ig 给药, 每天1次, 共6 d, 观察稀便出现情况. 实验第7天, 麻醉大鼠, 分离大鼠结肠、脾脏、胸腺, 观察各组实验动物体质量变化及结肠组织病理学改变, 选用稀便率、结肠指数、溃疡比、胸腺指数和脾脏指数作为衡量治疗效果的指标. 采用免疫组织化学方法检测结肠黏膜环氧合酶-2(COX-2)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的变化.

**结果:** 与模型组相比, 18 mg/kg PC407治疗可明显阻止结肠炎大鼠的体质量下降(258.9 g vs 223.6 g,  $P < 0.05$ ), 降低稀便发生率(30% vs 80%,  $P < 0.01$ ), 改善大鼠结肠组织损伤及病理学改变, 包括降低结肠指数( $5.03 \pm 1.26$  mg/g vs  $7.60 \pm 2.07$  mg/g,  $P < 0.01$ )及溃疡比( $24.69\% \pm 2.83\%$  vs  $36.13\% \pm 9.64\%$ ,  $P < 0.01$ ); 同时, PC407治疗可对抗结肠炎症引起的胸腺萎缩( $1.96 \pm 0.48$  mg/g vs  $1.08 \pm 0.32$  mg/g,  $P < 0.01$ )和脾脏肿大( $2.85 \pm 0.33$  mg/g vs  $3.87 \pm 0.96$  mg/g,  $P < 0.01$ ), 显著降低结肠炎大鼠结肠黏膜COX-2和TNF- $\alpha$ 的阳性表达率( $30.6\% \pm 7.0\%$  vs  $67.4\% \pm 1.2\%$ ,  $19.5\% \pm 3.0\%$  vs  $52\% \pm 4.7\%$ ,  $P < 0.01$ ). 9 mg/kg PC407也可以改善以上指数, 只是作用没有18 mg/kg明显.

**结论:** PC407对TNBS/乙醇诱导的大鼠溃疡性结肠炎治疗作用良好, 其机制可能通过下调COX-2及TNF- $\alpha$ 的表达, 从而缓解结肠炎症.

**关键词:** 选择性环氧合酶-2抑制剂; 溃疡性结肠炎; 2,4,6-三硝基苯磺酸; 免疫组织化学; 环氧合酶; 肿瘤坏死因子 $\alpha$

白卉, 张邦乐, 李宇华, 游宇, 郭振军, 孙阳, 梅其炳. 选择性环氧合酶-2抑制剂PC407对TNBS诱导的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1287-1293  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1287.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种主

要累及结肠和直肠的慢性特发性炎症反应, 属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种<sup>[1]</sup>. 诸多研究证实UC以自身免疫系统和内环境因素相互作用的严重失调为主要表现<sup>[2-3]</sup>. 目前, UC的药物疗法首选氨基水杨酸类药物, 对新型非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)的应用正在探索之中. 此类药物通过抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)来减少前列腺素的合成, 缓解肠道炎症反应<sup>[4]</sup>. 然而氨基水杨酸类药物对COX-1和COX-2没有选择性, 因抑制COX-1依赖途径产生的前列腺素, 而引发上消化道不良反应(如肠缩窄、穿孔和出血等), 这已成为限制其使用的主要危险因素<sup>[5]</sup>. 选择性COX-2抑制剂(如塞来昔布、罗非昔布等)通过选择性地抑制炎症期间高表达的COX-2缓解炎症反应, 已引起越来越多的关注. 将选择性COX-2抑制剂引入UC的治疗不仅可以缓解疼痛和炎症反应, 同时亦降低药物引起的消化道不良反应, 但是不同化学类型的COX-2抑制剂对于结肠炎治疗显示的作用不同, 不同抑制强度的选择性COX-2抑制剂的安全性尚待进一步研究<sup>[6-7]</sup>. 本实验室首次合成以1, 5-二芳基吡唑为母环的选择性COX-2抑制剂, 实验表明4-[5-萘基-3-(三氟甲基)-1-氢-吡唑-1-基]苯磺酰胺, 即PC407, 其 $IC_{50, COX-1}/IC_{50, COX-2}$ 为14.4, 是塞来昔布的2倍<sup>[8-9]</sup>. 本实验用PC407 ig治疗TNBS/乙醇诱导的大鼠溃疡性结肠炎, 观察其治疗作用, 初步探讨其药理作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 二级SD大鼠购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心; PC407由本实验室自行合成, 白色晶体, 分子质量为418, HPLC测定纯度为97.5%<sup>[10]</sup>; 塞来昔布和TNBS购于Sigma公司; 兔抗大鼠COX-2多克隆抗体购于Abcom公司; 兔抗大鼠TNF- $\alpha$ 亲和纯化抗体、即用型SABC免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒购于博士德生物工程有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 模型复制及动物分组:** 二级 $\delta$  SD大鼠50只(230-250 g), 随机分为5组, 每组10只, 即正常对照组、模型对照组、塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)和PC407治疗组(9, 18 mg/kg); PC407的给药剂量由塞来昔布推荐人用量(100-200 mg/d)折算. 各组大鼠造模前禁食24 h, 正常饮水, 造模时(除正常对照组)乙醚麻醉大鼠, 用TNBS和400 mL/L乙醇灌肠, 复制实验性结肠炎模型<sup>[11]</sup>, 造模

表 1 PC407对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	剂量(mg/kg)	稀便率(%)	结肠指数(mg/g)	溃疡比(%)	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)
正常组		0	4.95 $\pm$ 0.53	0	3.45 $\pm$ 1.12	2.07 $\pm$ 0.68
模型组		80 <sup>a</sup>	7.60 $\pm$ 2.07 <sup>b</sup>	36.13 $\pm$ 9.64 <sup>b</sup>	3.87 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
塞来昔布治疗组	18	60 <sup>c</sup>	5.38 $\pm$ 3.11 <sup>d</sup>	28.15 $\pm$ 5.98 <sup>c</sup>	3.74 $\pm$ 1.18	1.87 $\pm$ 1.11 <sup>d</sup>
PC407治疗组	9	50 <sup>c</sup>	5.26 $\pm$ 1.08 <sup>d</sup>	30.78 $\pm$ 7.26 <sup>c</sup>	3.52 $\pm$ 1.25 <sup>c</sup>	1.63 $\pm$ 0.87 <sup>d</sup>
	18	30 <sup>d</sup>	5.03 $\pm$ 1.26 <sup>d</sup>	24.69 $\pm$ 2.83 <sup>d</sup>	2.85 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>	1.96 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

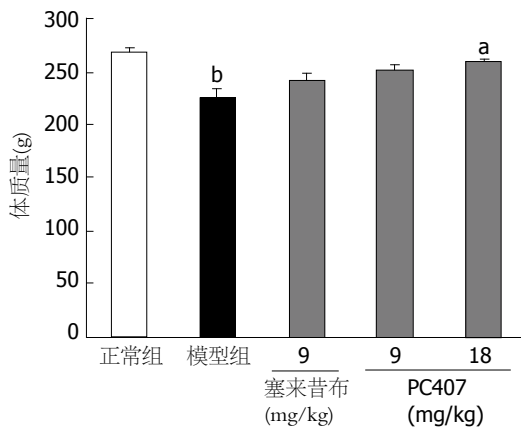


图 1 PC407对溃疡性结肠炎大鼠体质量的影响( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD). <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组.

6 h后, 分别ig给予生理盐水、塞来昔布和PC407, 每天1次, 持续6 d.

1.2.2 大体与组织学观察记录: 实验前后分别称量各组实验大鼠的体质量, 每天观察稀便情况. 给药第7天, 称质量后乙醚麻醉大鼠至死; 打开腹腔从肛门向上截取8 cm结肠, 在冰浴中沿肠系膜缘剪开肠腔, 漂洗内容物, 结肠称质量后, 在冰浴中用透明薄膜画出溃疡面积, 以8 cm结肠质量(mg)比麻醉致死前大鼠体质量(g)为结肠指数, 以8 cm结肠溃疡面积占8 cm结肠总面积的比率为溃疡比(%)进行统计; 肉眼观察结肠外观及肠黏膜的改变, 40 g/L甲醛固定结肠病变部位, 石蜡包埋, 切片, HE染色. 同时取大鼠脾脏、胸腺称量质量, 以大鼠脾脏或胸腺质量(mg)比麻醉致死前大鼠体质量(g)为脾脏或胸腺指数进行统计.

1.2.3 免疫组织化学染色: 运用SABC法进行免疫组化染色. 收集各组石蜡切片常规脱蜡至水, 浸于3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>液中30 min, 去除内源性过氧化物酶; 再置于组织抗原修复液中, 微波加热至沸腾2次, 静置至室温后滴加5% BSA封闭液20 min, 分别滴加兔抗大鼠COX-2、TNF- $\alpha$ 一抗(均按1:200稀释), 4 $^{\circ}$ C过夜; 再滴加生物素化的羊

## ■ 相关报道

对COX-2生理、病理作用及选择性COX-2抑制剂更为广泛和深入的研究发现, COX-2在炎症的不同阶段扮演的角色不同, 且不同结构类型的选择性COX-2抑制剂对于溃疡性结肠炎的治疗显示的作用不同.

抗兔IgG室温孵育20 min, 加SABC复合物室温孵育20 min, 最后用DAB法显微镜下观察显色, 时间控制在30 s-2 min, 以上各步骤之间用0.01 mol/L PBS(pH7.4)充分漂洗. 切片经苏木素复染, 盐酸酒精分化后梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片. 以PBS代替一抗作为阴性对照. COX-2以细胞质染色为主, 细胞膜可有少量染色, 阳性判断标准为该位置出现黄色或棕黄色颗粒. TNF- $\alpha$ 阳性表达为细胞质内呈现棕黄色颗粒. 采用计算机图像系统分析摄片, 光镜( $\times 400$ )下每张切片各取5个视野, 分别计数各视野组织阳性细胞率(阳性细胞/视野内细胞总数 $\times 100\%$ ), 结果以mean  $\pm$  SD表示.

统计学处理 数据用mean  $\pm$  SD表示, 采用SPSS10.0统计软件处理, 两组间比较采用 $t$ 检验.

## 2 结果

2.1 PC407对结肠炎大鼠一般状态的影响 模型对照组大鼠第1天即出现不成形稀便, 大便次数增多, 第2-3天伴有黏液, 症状持续至给药结束; 塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)大鼠第1天即出现不成形稀便, 第5-6天绝大部分大鼠稀便症状消失; PC407治疗组(9, 18 mg/kg)大鼠第1天即出现不成形稀便, 第2-3天稀便症状逐渐消失, 第4-5天完全消失, 此现象显示PC407和塞来昔布能降低结肠炎大鼠稀便发生率(表1). 实验前各组大鼠体质量无显著性差异, TNBS/乙醇诱导大鼠溃疡性结肠炎后, 模型对照组大鼠的体质量较正常对照组明显下降( $P < 0.01$ , 图1); 而PC407治疗组(18 mg/kg)可明显阻止结肠炎大鼠的体质量下降( $P < 0.05$ , 图1).

2.2 PC407对大鼠结肠炎的治疗作用 模型对照组大鼠肠壁增厚、皱褶消失并出现大面积坏死, 肠黏膜广泛充血、水肿并多处可见明显的溃疡灶; 塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)肠壁轻度增厚、皱褶部分消失并出现小面积坏死, 多处可

### ■创新盘点

本实验室首次合成吡唑类选择性COX-2抑制剂PC407,并观察发现其对TNBS/乙醇诱导的治疗作用。

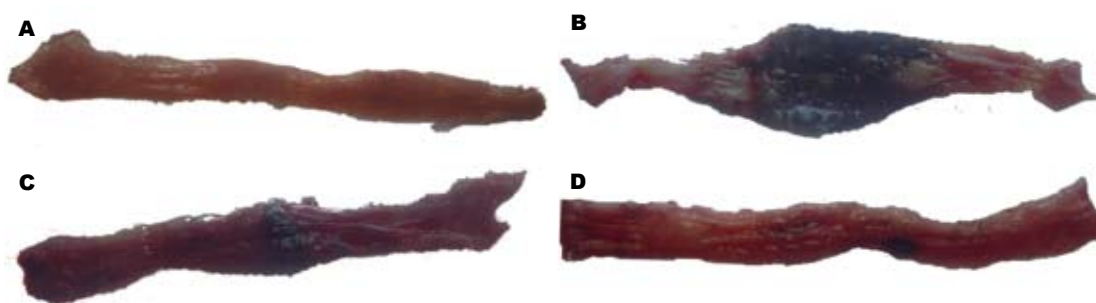


图2 PC407治疗溃疡性结肠炎大鼠的结肠大体照片. A: 正常组; B: 模型组; C: 塞来昔布治疗组(18 mg/kg); D: PC407治疗组(18 mg/kg).

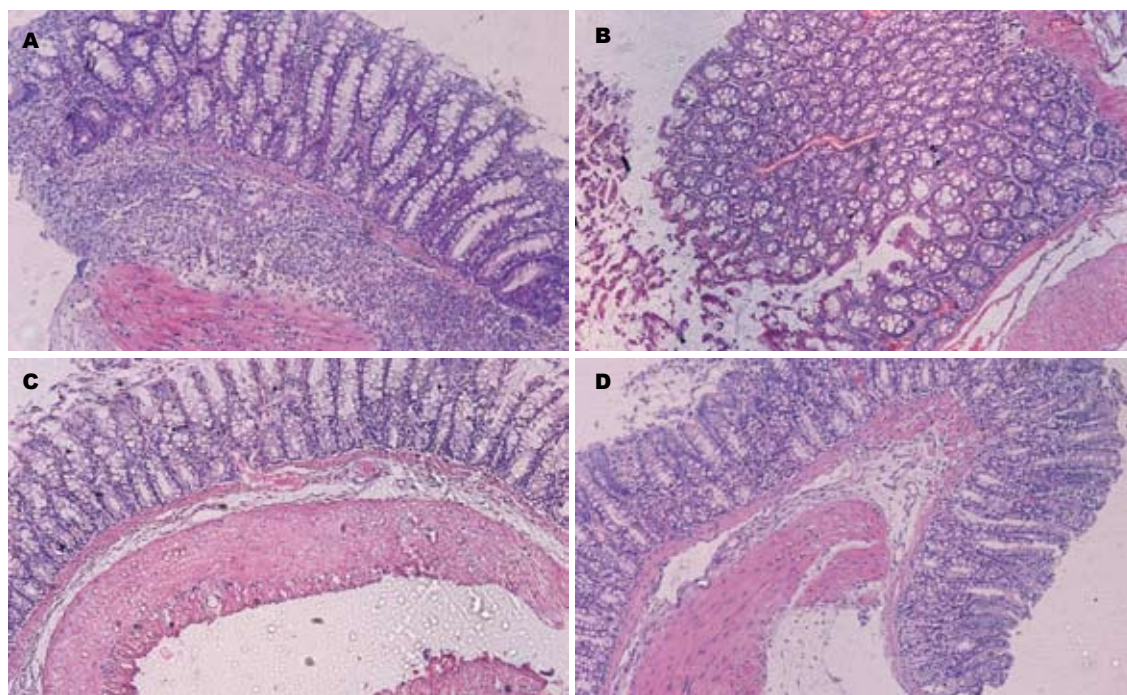
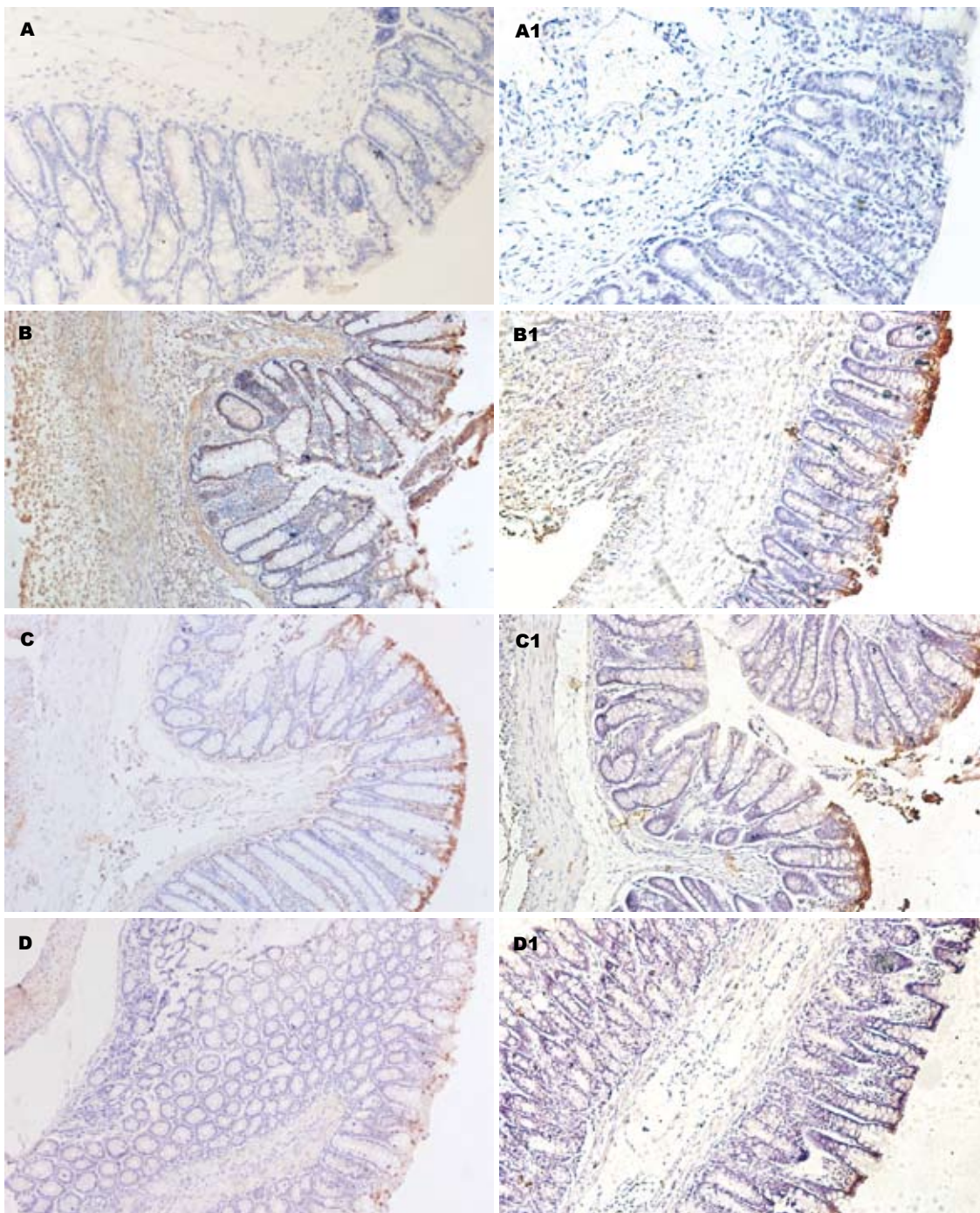


图3 PC407治疗溃疡性结肠炎大鼠的结肠病理组织(HE染色 $\times 200$ ). A: 正常组; B: 模型组; C: 塞来昔布治疗组(18 mg/kg); D: PC407治疗组(18 mg/kg).

见肠黏膜充血、水肿,溃疡面积较模型组有所缩小( $P<0.05$ ); PC407治疗组(18 mg/kg)大鼠结肠病变明显减轻,肠壁无明显增厚,皱褶正常,肠黏膜无明显充血,仅局部可见水肿和极小面积坏死,溃疡面积较模型对照组和塞来昔布阳性对照组有显著性缩小( $P<0.01$ ); PC407治疗组(9 mg/kg)与塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)对大鼠TNBS/乙醇造成的结肠组织大体损伤恢复程度较为一致,未在图中显示;正常对照组肠黏膜未见病变(表1,图2).与模型组相比,塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)和PC407治疗组(9, 18 mg/kg)均可对抗实验性溃疡性结肠炎引起胸腺萎缩( $P<0.01$ ,表1),但仅PC407治疗组(9, 18 mg/kg)可对抗溃疡性结肠炎引起的脾脏肿大,且18 mg/kg PC407治疗组效果更为显著( $P<0.01$ ,表1).

2.3 组织学改变 结肠病变组织HE染色结果显示,模型对照组大鼠黏膜上皮细胞广泛缺失,腺体大多不完整,杯状细胞严重变形,黏膜及黏膜下层炎性细胞广泛浸润,呈典型炎症改变;塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)大鼠结肠黏膜部分缺失,腺体部分不完整,杯状细胞中度变形,黏膜及黏膜下层有炎性细胞浸润;PC407治疗组治疗组(18 mg/kg)大鼠结肠黏膜缺失少见,极小部分腺体不完整,杯状细胞形态大多恢复正常,黏膜及黏膜下层炎症细胞浸润程度较轻,整体炎症程度较模型对照组和塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)明显减轻(图3);PC407治疗组(9 mg/kg)与塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)HE染色结果评价程度较为一致,故未在图中显示。

2.4 溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜COX-2和TNF- $\alpha$ 的



■应用要点  
PC407对TNBS/乙醇诱导的大鼠溃疡性结肠炎治疗作用良好, 其机制可能通过下调COX-2及TNF- $\alpha$ 的表达, 从而缓解结肠炎症。

图4 溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜COX-2和TNF- $\alpha$ 的表达(SABC  $\times 200$ )。A, B, C, D依次为COX-2正常组, 模型组, 塞来昔布治疗组(18 mg/kg)和PC407治疗组(18 mg/kg); A1, B1, C1, D1依次为TNF- $\alpha$ 正常组, 模型组, 塞来昔布治疗组(18 mg/kg)和PC407治疗组(18 mg/kg)。

表达与正常对照组比较, 模型对照组大鼠肠黏膜COX-2、TNF- $\alpha$ 的阳性表达率均升高( $P < 0.01$ , 表2, 图4), 差异具有统计学意义; 与模型对照组比较, 塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)可降低大鼠肠黏膜COX-2、TNF- $\alpha$ 的阳性表达率( $P < 0.05$ , 表2, 图4); PC407治疗组(9 mg/kg)降低大鼠肠黏膜COX-2阳性表达率( $P < 0.05$ ), 但与塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)相当; PC407治疗组(9, 18 mg/kg)对大鼠肠黏膜TNF- $\alpha$ 的阳性表达

率降低效果更为明显( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ , 表2, 图4)。PC407治疗组(9 mg/kg)与塞来昔布阳性对照组(18 mg/kg)阳性表达率比较无显著性差异, 故未在图中显示。

### 3 讨论

UC被世界卫生组织列为现代难治病之一, 其病因探寻和治疗药物发掘一直是研究热点。遗传、环境、饮食、心理等多种因素都可以引发

### 同行评价

本研究选题新颖, 科研设计合理, 实验手段较先进, 对于开发溃疡性结肠炎治疗新药有重要的临床意义。

表 2 PC407对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜COX-2和TNF- $\alpha$ 阳性表达率的影响 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	剂量(mg/kg)	阳性表达率(%)	
		COX-2	TNF- $\alpha$
正常组		9.5 $\pm$ 3.5	7.6 $\pm$ 2.3
模型组	18	67.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	52.0 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>
塞来昔布治疗组	9	39.2 $\pm$ 5.8 <sup>c</sup>	31.6 $\pm$ 6.4 <sup>c</sup>
PC407治疗组	18	41.5 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>	30.7 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>
		30.6 $\pm$ 7.0 <sup>d</sup>	19.5 $\pm$ 3.0 <sup>d</sup>

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

UC, 这些因素可能触发一个连续的慢性免疫过程, 中性粒细胞、巨噬细胞、T和B淋巴细胞等参与了此过程, 这些效应细胞释放的抗体、细胞因子(如TNF- $\alpha$ , IL-1等)和炎症介质(如前列腺素, 白三烯等)引起组织破坏和炎症病变<sup>[12-13]</sup>。COX是花生四烯酸转化为前列腺素代谢过程中的关键酶, 越来越多的证据显示, COX-2与UC的发病密切相关。COX-2为诱生型酶, 在静息状态下不表达, 有研究表明, 炎症结肠黏膜上皮细胞及结肠固有层单核炎性细胞大量表达COX-2, 并且在炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中COX-2 mRNA表达水平明显高于非活动期<sup>[14-15]</sup>。

目前, UC的临床治疗药物主要有三类, 即非甾体抗炎类药物(5-氨基水杨酸, 柳氮磺胺吡啶等)、肾上腺皮质激素类药物(泼尼松龙, 地塞米松等)和免疫抑制剂(6-巯基嘌呤, 氨甲喋呤等), 他们各自引发的不良反应都限制其作为长期有效治愈UC的首选药物, 其中, 应用最为广泛的氨基水杨酸类药物就是因其对COX的非选择性抑制而产生了严重的上、下消化道不良反应。因此, 基于近年来对UC发病机制的进一步研究<sup>[16]</sup>和现有UC治疗药物的安全性评估<sup>[17]</sup>, 选择性COX-2抑制剂开始应用于UC的治疗。我们合成了一系列1, 5-二芳基吡啶类选择性COX-2抑制剂并对其抗炎活性进行筛选, 得到对COX-2选择性优于塞来昔布而不良反应极低的PC407<sup>[8-9]</sup>, 并首次用于实验性UC的治疗。

关于已上市的吡啶类选择性COX-2抑制剂治疗实验性UC的报道一致性不高<sup>[18]</sup>, 如Cuzzocrea *et al*<sup>[19]</sup>的研究结果显示塞来昔布可以通过降低COX-2下游炎性介质的水平减轻UC大鼠的黏膜损伤和炎症程度; 而Reuter *et al*<sup>[20]</sup>用3种不同抑制程度的选择性COX-2抑制剂(包括塞来昔布)进行为期1 wk的大鼠UC的治疗, 结果3种药物均不同程度加重了炎症相关的结肠黏

膜损伤。诸多上述类型的报道<sup>[21-22]</sup>引起人们对选择性COX-2抑制剂治疗UC安全性的质疑。造成这种不一致性的原因有二点: 一是后续研究发现过度抑制前列腺素合成会削弱其保护结肠黏膜的作用<sup>[23-25]</sup>, 二是不同研究中选择性COX-2抑制剂的IC<sub>50.COX-1</sub>/IC<sub>50.COX-2</sub>和给药剂量大不相同。因此, 我们参考文献及塞来昔布治疗人用量(100-200 mg/d)进行折算以确定PC407的给药剂量。实验结果表明, PC407(18 mg/kg)对TNBS/乙醇诱导的UC疗效显著, PC407(9 mg/kg)与塞来昔布(18 mg/kg)治疗效果相当, 提示其对COX-2的选择性抑制是有效治疗UC的基础, 且在治疗剂量范围未引起UC大鼠结肠黏膜损伤加重的不良反应。

细胞因子失衡是UC产生肠道非特异性炎症的关键环节<sup>[26]</sup>, 诸多细胞因子可同时或相继、直接或间接作用于靶细胞, 形成细胞因子网络, 在UC的组织破坏及炎症反应中起着重要作用, 其中与UC关系密切的促炎细胞因子主要有TNF- $\alpha$ <sup>[27-28]</sup>。研究表明, 炎症状态时巨噬细胞COX-2表达呈强阳性, 抑制COX-2表达可以调节巨噬细胞吞噬功能, 同时影响巨噬细胞对TNF- $\alpha$ 等细胞因子的有害刺激的应答反应<sup>[29-30]</sup>。我们的研究显示PC407(9, 18 mg/kg)能显著降低大鼠UC模型促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 的含量, 表明其能抑制促炎细胞因子的分泌, 调节免疫反应, 从而控制肠道炎症反应, 这可能是其治疗UC的机制之一。我们将进一步研究PC407治疗UC的作用机制, 解释其对COX-2作用网络调控的可能方式。

### 4 参考文献

- Goyette P, Labbé C, Trinh TT, Xavier RJ, Rioux JD. Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Ann Med* 2007; 39: 177-199
- Lukas M, Bortlik M, Maratka Z. What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgrad Med J* 2006; 82: 620-625
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- Murphy SJ, Ullman TA, Abreu MT. Gut microbes in Crohn's disease: getting to know you better? *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 397-398
- Stadnicki A, Frysz-Naglak D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and intestinal side effects. *Wiad Lek* 2007; 60: 286-290
- Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. *Curr Med Chem* 2002; 9: 1033-1043
- Lehmann FS, Beglinger C. Impact of COX-2 inhibitors in common clinical practice a gastroenterologist's perspective. *Curr Top Med Chem*

- 2005; 5: 449-464
- 8 张邦乐, 梅其炳, 周四元, 何炜, 陈长生. 1,5-二芳基吡唑类环加氧酶-2选择性抑制剂的定量构效关系. 第四军医大学学报 2003; 24: 1523-1525
  - 9 Lu ZH, Xiong XY, Zhang BL, Lin GC, Shi YX, Liu ZG, Meng JR, Zhou YM, Mei QB. Evaluation of 2 celecoxib derivatives: analgesic effect and selectivity to cyclooxygenase-2/1. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1505-1511
  - 10 Hao LL, Mei QB, Zhang BL, Jia M, Li XQ, Zhang F. PC-407 inhibited proliferation and induced apoptosis in human colon cancer SW-1116 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 1509-1514
  - 11 刘莉, 梅其炳, 周四元, 韩凤华, 龙钢, 刘家云, 李晨, 孟静茹, 王志鹏. 大黄多糖对TNBS诱导大鼠结肠炎的治疗作用. 中国中药杂志 2003; 28: 246-249
  - 12 Bamias G, Cominelli F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 365-369
  - 13 Latinne D, Fiasse R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2006; 69: 393-405
  - 14 Singer IL, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 297-306
  - 15 Roberts PJ, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ. Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48: 468-472
  - 16 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
  - 17 Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Ohno R, Takeuchi K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 1248-1254
  - 18 Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 910-914
  - 19 Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, Sautelin L, Caputi AP. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 91-102
  - 20 Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; 98: 2076-2085
  - 21 Tsubouchi R, Hayashi S, Aoi Y, Nishio H, Terashima S, Kato S, Takeuchi K. Healing impairment effect of cyclooxygenase inhibitors on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Digestion* 2006; 74: 91-100
  - 22 Zamuner SR, Warriner N, Buret AG, MacNaughton WK, Wallace JL. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut* 2003; 52: 1714-1720
  - 23 Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target? *Gut* 2007; 56: 453-455
  - 24 Sasaki S, Hirata I, Maemura K, Hamamoto N, Murano M, Toshina K, Katsu K. Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines. *Scand J Immunol* 2000; 51: 23-28
  - 25 Hatazawa R, Ohno R, Tanigami M, Tanaka A, Takeuchi K. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in healing of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 691-699
  - 26 Nguyen GC, Harris ML, Dassopoulos T. Insights in immunomodulatory therapies for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 499-505
  - 27 Hassan C, Zullo A, De Francesco V, Campo SM, Morini S, Panella C, Ierardi E. Tumor necrosis factor alpha in ulcerative colitis and diverticular disease associated colitis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007; 7: 187-194
  - 28 Valesini G, Iannuccelli C, Marocchi E, Pascoli L, Scalzi V, Di Franco M. Biological and clinical effects of anti-TNF-alpha treatment. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 35-41
  - 29 Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 187-194
  - 30 Ulcar R, Peskar BA, Schuligoi R, Heinemann A, Kessler HH, Santner BI, Amann R. Cyclooxygenase inhibition in human monocytes increases endotoxin-induced TNF alpha without affecting cyclooxygenase-2 expression. *Eur J Pharmacol* 2004; 501: 9-17

编辑 潘伯荣 电编 吴鹏联

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

• 消息 •

## 世界华人消化杂志栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 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. 文稿应具有科学性、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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应

徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良

## ■背景资料

糖尿病胃肠动力障碍的发病机制目前仍不清楚, 临床上缺乏有效的治疗手段。随着对Cajal间质细胞功能的研究日益增多, 人们对该疾病的认识不断深入, Cajal间质细胞有望成为治疗该病新的突破口。

徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029  
徐丽明, 南京医科大学在读硕士, 主要从事胃肠动力性疾病的研究。

国家重点基础研究发展计划资助项目, No. 2006CB503908

作者贡献分布: 此课题由林琳设计并主要负责; 研究过程由徐丽明和汤玉蓉合作完成; 研究所用试剂及分析工具由徐丽明提供; 数据分析由徐丽明和汤玉蓉合作完成; 论文撰写由徐丽明完成; 张红杰、李学良协助课题设计并修改论文。

通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn  
电话: 025-83718836-6920

收稿日期: 2007-12-24 修回日期: 2008-03-12

## Effect of stem cell factor on colon interstitial cells of Cajal in murine with diabetes mellitus

Li-Ming Xu, Lin Lin, Yu-Rong Tang, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li

Li-Ming Xu, Lin Lin, Yu-Rong Tang, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the State Key Development Program for Basic Research of China, No. 2006CB503908

Correspondence to: Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-24 Revised: 2008-03-12

## Abstract

**AIM:** To investigate whether exogenous stem cell factor (SCF) can improve the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal (ICC) in mice with diabetes mellitus (DM).

**METHODS:** DM mice were intraperitoneally injected with streptozocin (STZ) to induce an experimental model. Male C57/BL6 mice were randomly divided into control group, DM group and DM + SCF group. The mice in DM + SCF group were given exogenous SCF (0.2 µg/kg per day, ip) for 6 wk, and the mice in control group and DM group were given the same amount of phosphate buffer (pH = 7.4). All the mice were sacrificed after 6 wk. ICC changes in the distal colon were assessed by immunohistochemistry, transmission electron microscopy and Western

blot, and SCF expression in the distal colon was analyzed by Western blot.

**RESULTS:** The expression of SCF in the distal colon was significantly reduced in DM group as compared with that in the control group ( $178.97 \pm 13.51$  vs  $200.25 \pm 16.48$ ,  $P < 0.05$ ), accompanied with the depletion ( $72 \pm 10$  vs  $102 \pm 12$ ,  $P < 0.05$ ) and microscopic lesions of ICC in the distal colon. The expression of SCF in the distal colon was increased in DM + SCF group ( $210.14 \pm 11.8$ ,  $P < 0.05$ ), along with the dramatic improvement of ICC quantity ( $87 \pm 10$ ,  $P < 0.05$ ) and ultrastructure in the distal colon as compared with those in DM group.

**CONCLUSION:** Exogenous SCF may improve the DM-associated depletion of colon ICC.

**Key Words:** Diabetes mellitus; Stem cell factor; Interstitial cells of Cajal; Colon; Western blot; Immunohistochemistry

Xu LM, Lin L, Tang YR, Zhang HJ, Li XL. Effect of stem cell factor on colon interstitial cells of Cajal in murine with diabetes mellitus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1294-1298

## 摘要

**目的:** 探讨外源性干细胞因子(stem cell factor, SCF)能否改善糖尿病(diabetes mellitus, DM)小鼠结肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的异常病变。

**方法:** DM小鼠一次性ip链脲佐菌素(STZ, 150 mg/kg)造模, 将♂C57/BL6小鼠分为正常对照组(control组)、糖尿病组(DM组)、糖尿病+外源性SCF组(DM+SCF组); DM+SCF组ip SCF 0.2 µg/(kg·d), control组和DM组每天ip等量的磷酸盐缓冲液(pH = 7.4), 干预6 wk后处死所有小鼠, 以Western blot检测远端结肠组织中SCF的表达情况, 以免疫组化、透射电镜和Western blot观察远端结肠ICC的变化。

**结果:** DM小鼠远端结肠组织中SCF水平明显降低( $178.97 \pm 13.51$  vs  $200.25 \pm 16.48$ ,

## ■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

$P < 0.05$ ), 且伴结肠组织中ICC数量减少( $72 \pm 10$  vs  $102 \pm 12$ ,  $P < 0.05$ )、超微结构严重破坏. DM鼠给予外源性SCF干预后, 结肠组织中SCF表达( $210.14 \pm 11.8$ )上调( $P < 0.05$ ), 且ICC的数量( $87 \pm 10$ ,  $P < 0.05$ )和超微结构显著改善.

**结论:** 外源性SCF对糖尿病相关的结肠ICC异常病变有一定改善或逆转作用.

**关键词:** 糖尿病; 干细胞因子; Cajal间质细胞; 结肠; 免疫印迹; 免疫组化

徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1294-1298  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1294.asp>

## 0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者中, 胃肠动力障碍的发病率为25%-76%<sup>[1-2]</sup>, 结肠动力障碍是DM常见并发症之一, 临床上可有便秘与腹泻等症状, 其中便秘在1型DM患者中发病率很高<sup>[3]</sup>, 也是2型DM最常见的胃肠道症状<sup>[4]</sup>, 严重影响患者的生活质量与血糖控制. Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道起搏细胞, 且介导神经递质的产生和作用<sup>[5-6]</sup>, 其数量和结构改变可能是DM结肠动力障碍重要原因<sup>[7-9]</sup>. ICC特异性表达的酪氨酸激酶受体c-Kit, 其配体干细胞因子<sup>[10]</sup>(stem cell factor, SCF)已被证实对ICC具有重要调控作用<sup>[11-12]</sup>. 本研究将初步探讨外源性SCF对DM小鼠结肠ICC的作用或影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 4-6 wk ♂ C57/BL6小鼠(上海斯莱克公司), 链脲佐菌素(streptozocin, STZ, Sigma, USA), SCF抗体(R&D, UK), c-Kit抗体(Santa Cruz, USA), 二抗(Santa Cruz, USA), philips EM-400透射电镜等.

### 1.2 方法

1.2.1 建立DM小鼠模型、分组及干预: DM小鼠予一次性ip STZ(150 mg/kg)造模<sup>[13-14]</sup>, 72 h后及1 wk后尾静脉采血, 两次血糖均 $\geq 12$  mmol/L者为DM小鼠模型建立, 不符合条件者予以剔除. 所有实验小鼠分为正常对照组(control组,  $n = 6$ )、糖尿病组(DM组,  $n = 6$ )和糖尿病+外源性SCF干预组(DM+SCF组,  $n = 6$ ). 干预(共6 wk): DM+SCF组给予SCF ip[0.2  $\mu$ g/(kg·d)], control组和DM组每天ip等量的磷酸盐缓冲液(pH = 7.4),

6 wk结束后, 停止干预3 d后处死各组小鼠. 取小鼠距肛门1 cm左右的远端结肠组织约2 cm.

1.2.2 结肠组织SCF及c-Kit的表达(Western blot法): 取约0.5 g远端结肠研磨提取蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 按50  $\mu$ g蛋白/泳道加样, 恒流40 mA电泳, 恒压100 V转膜2 h, 50 mL/L牛奶封闭1.5 h. 检测SCF时, 加入SCF一抗(1:500), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 4 $^{\circ}$ C过夜, 加入二抗(1:2000), 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 曝光、显影. 检测c-Kit时, 一抗浓度为1:200, 二抗浓度为1:1500, 其余条件同前.

1.2.3 结肠组织c-Kit的表达(免疫组化, SP法): 取远端结肠约0.5 cm, 常规固定、包埋、切片, 脱蜡至水、抗原修复. 加c-Kit一抗(1:100)50  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h后4 $^{\circ}$ C过夜, 加生物素标记的二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶各50  $\mu$ L, 室温孵育各15 min, DAB显色, 复染、脱水、封片. 结果判断: 显微镜下胞质出现棕黄色片状或颗粒状物为阳性.

1.2.4 ICC超微结构观察(电镜): 取远端结肠约0.5 cm, 放入戊二醛固定, 经前固定、后固定、块染、脱水、浸渍后包埋、聚合, 半薄切片定位观察, 确定组织分层后, LKB-II超薄切片机切片, 染色后透射电镜观察.

**统计学处理** 所有数据录入SPSS10.0软件包分析, 以mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析和成组t检验,  $P < 0.05$ 为有统计学差异.

## 2 结果

2.1 远端结肠组织中SCF和c-Kit蛋白表达(Western blot) 干预6 wk后, DM组远端结肠中SCF和c-Kit蛋白分别较正常对照组显著降低( $178.97 \pm 13.51$  vs  $200.25 \pm 16.48$ ,  $146.24 \pm 16.64$  vs  $196.73 \pm 8.48$ ,  $P < 0.05$ ), DM+SCF组较DM组显著增加( $210.14 \pm 11.8$  vs  $178.97 \pm 13.51$ ,  $169.36 \pm 15.8$  vs  $146.24 \pm 16.64$ ,  $P < 0.05$ ). DM+SCF组与正常对照组中SCF蛋白表达无统计学差异( $P > 0.05$ ), 而c-Kit蛋白有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 图1-2).

2.2 远端结肠组织中c-Kit表达(免疫组化) 干预6 wk后, DM组远端结肠c-Kit阳性细胞数较正常对照组明显减少( $72 \pm 10$  vs  $102 \pm 12$ /5个高倍镜视野,  $P < 0.05$ ), DM+SCF组较DM组显著增加( $87 \pm 10$  vs  $72 \pm 10$ /5个高倍镜视野,  $P < 0.05$ ), 但尚未达到正常对照组水平( $87 \pm 10$  vs  $102 \pm 12$ /5个高倍镜视野,  $P < 0.05$ , 图3).

2.3 电镜结果 正常对照组小鼠远端结肠中ICC核膜完整, 胞质内富含细胞器, 如内质网、线粒

## ■ 研发前沿

近来, 干细胞因子在Cajal间质细胞以及胃肠动力障碍中的病理生理机制成为研究热点.

## ■ 创新盘点

本研究首次在体内实验应用外源性干细胞因子对结肠Cajal间质细胞进行干预, 结果验证了干预的有效性及其对糖尿病小鼠Cajal间质细胞产生的显著影响.

### 应用要点

本研究结果可能为临床治疗糖尿病结肠功能障碍提供新的理论依据。

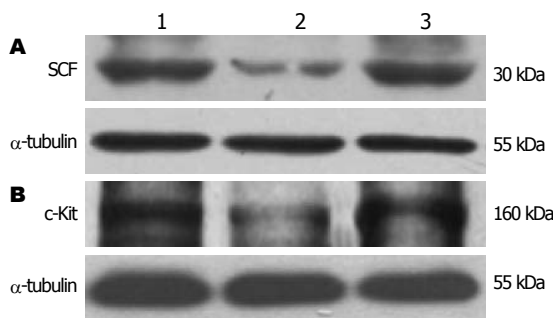


图1 Western blot检测远端结肠SCF和c-Kit蛋白表达. A: SCF; B: c-Kit. 1: 正常组; 2: DM组; 3: DM+SCF组.

体等, 细胞器结构清晰, 发育良好; ICC与周围的ICC、神经纤维以及平滑肌细胞间形成紧密连接. DM组小鼠远端结肠ICC出现基膜溶解, 细胞器破坏、数量减少, 内质网扩张, 线粒体肿胀甚至空泡样变性; ICC与周围细胞之间的紧密连接也被破坏. DM+SCF组结肠ICC的结构病变较DM组有所改善(图4).

### 3 讨论

DM结肠动力障碍的病理生理特点是: 结肠张力和收缩力低下、蠕动减慢、排空延迟<sup>[15]</sup>, 其机制尚不完全清楚, 肠道ICC病变是重要原因之一<sup>[7]</sup>, 临床缺乏有效的治疗手段. ICC是分布在胃肠神经末梢与平滑肌细胞之间的一类特殊细胞群, 他不仅是胃肠道起搏细胞, 产生并传导慢波, 还参与神经信号的传递, 控制胃肠平滑肌运动<sup>[6,16]</sup>. 研究证实ICC网络病变可导致胃肠起搏功能紊乱及电兴奋传导障碍, 胃肠平滑肌发生多种电节律紊乱(如慢波不规则或消失、收缩减弱或不能产生有效的推进性收缩), 临床上出现多种胃肠动力障碍症状; ICC的特异性标志是表达酪氨酸激酶受体c-Kit(CD117), 其胞外部分为SCF受体区, 胞内部分为酪氨酸激酶区, 很多研究已证明, 胃肠道ICC数量及结构的异常与多种胃肠疾病有关, 包括DM胃肠动力障碍、假性肠梗阻、先天性巨结肠、慢传输型便秘、食管失弛缓等<sup>[17-21]</sup>. 目前, 引起DM相关的ICC异常改变的病理生理学机制尚不清楚, 认为可能与胰岛素信号减弱、SCF减少或高糖等因素有关. 本实验结果发现DM 6 wk的小鼠远端结肠中ICC数量明显减少、ICC超微结构严重破坏, 与文献报道一致<sup>[9]</sup>.

SCF是一种重要的多功能生长因子, 是c-Kit受体的天然配体, SCF与Kit结合组成Kit-SCF信号系统, 活化酪氨酸激酶, 导致一系列磷酸化过程. Kit-SCF信号系统参与了机体所有Kit阳性

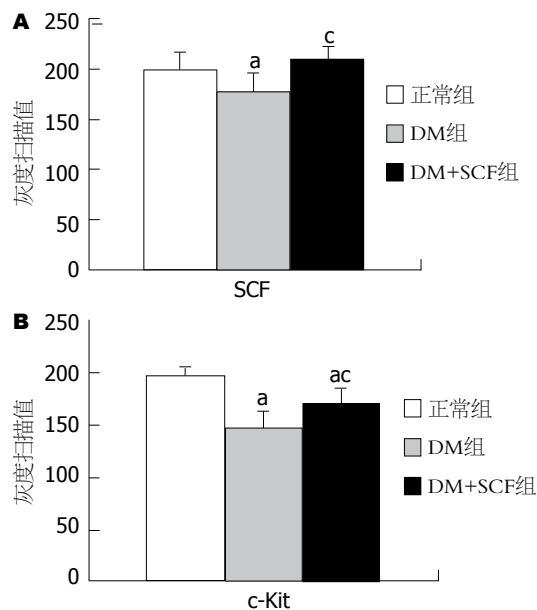


图2 Western blot灰度扫描值. A: SCF; B: c-Kit. \* $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs DM组.

细胞的发育、分化、增殖等过程<sup>[22-23]</sup>, 同样也与ICC的增殖、分化和表型维持密切相关<sup>[11,24]</sup>. 小鼠SCF由10号染色体的steel(SI)位点编码, 该编码序列缺失的成年(出生后20 d)SI/SI<sup>d</sup>小鼠SCF合成严重受损, 胃肠道ICC难以识别<sup>[25]</sup>. Ward通过抑制3-磷脂酰醇激酶(PI3-K), 观察对新生及成年(出生后30 d)BALB/c小鼠空肠ICC的影响, 发现抑制PI3-K途径后新生小鼠和成年小鼠空肠ICC均减少, 认为PI3-K途径是SCF-Kit信号途径可能的作用环节<sup>[26]</sup>. 本实验中, DM小鼠远端结肠组织中SCF表达明显下调, 同时结肠ICC数量减少、超微结构被破坏; 而DM小鼠予以外源性SCF干预后, 结肠组织中SCF水平上调, 同时ICC数量及超微结构得到明显改善, 虽然未完全恢复到正常水平, 但该结果提示外源性SCF可以改善或逆转DM相关的结肠ICC病变; 异常的ICC未能完全恢复, 是否与干预时间、给药途径、剂量和/或信号通路等有关, 尚待验证.

SCF以两种形式存在, 即可溶性干细胞因子(soluble stem cell factor, s-SCF)(分子量约24 kDa)和膜结合型干细胞因子(membrane-bound stem cell factor, m-SCF)(分子量约27 kDa), 两者都有生物学活性. Rich *et al*<sup>[27]</sup>对BALB/c小鼠空肠ICC体外实验研究发现m-SCF对ICC有更大作用; 本实验采用的外源性SCF为重组小鼠SCF(分子量约18 kDa), 对DM小鼠干预6 wk后, 测得结肠组织中SCF分子量约30 kDa, 提示m-SCF表达增高, 同时使DM相关的结肠ICC



图 3 远端结肠c-Kit阳性细胞( $\times 400$ )。A: 正常组; B: DM组; C: DM+SCF组。

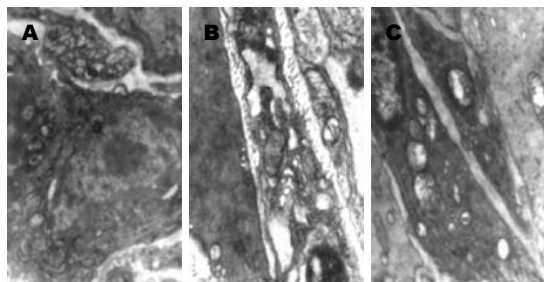


图 4 电镜结果。A: 正常组; B: DM组; C: DM+SCF组。

病变得以改善, 提示外源性SCF可能为临床治疗DM胃肠动力障碍提供新的理论依据。

#### 4 参考文献

- Feldman M, Schiller LR. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1983; 98: 378-384
- Icks A, Haastert B, Rathmann W, Wareham N. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with type 2 diabetes: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1067-1069; author reply 1069
- Maleki D, Locke GR 3rd, Camilleri M, Zinsmeister AR, Yawn BP, Leibson C, Melton LJ 3rd. Gastrointestinal tract symptoms among persons with diabetes mellitus in the community. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2808-2816
- Ko GT, Chan WB, Chan JC, Tsang LW, Cockram CS. Gastrointestinal symptoms in Chinese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 670-674
- Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-C720
- Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 666-670
- Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 102-108
- Long QL, Fang DC, Shi HT, Luo YH. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1227-1230
- Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. *J Neurosci Res* 2000; 59: 384-401
- Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726
- Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 1999; 117: 140-148
- Kitayama J, Faraci FM, Gunneth CA, Heistad DD. Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase. *Stroke* 2006; 37: 2129-2133
- Yu X, Tesiram YA, Towner RA, Abbott A, Patterson E, Huang S, Garrett MW, Chandrasekaran S, Matsuzaki S, Szweda LI, Gordon BE, Kem DC. Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI). *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 6
- Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS. Colonic transit time in diabetic patients--comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J* 2003; 44: 265-272
- Ito-Dufros Y, Funakoshi Y, Uehara A, Oishi K. In vitro development of gut-like tissue demonstrating rhythmic contractions from embryonic mouse intestinal cells. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 288-300
- He CL, Soffer EE, Ferris CD, Walsh RM, Szurszewski JH, Farrugia G. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology* 2001; 121: 427-434
- Streutker CJ, Huizinga JD, Campbell F, Ho J, Riddell RH. Loss of CD117 (c-kit)- and CD34-positive ICC and associated CD34-positive fibroblasts defines a subpopulation of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 228-235
- Taguchi T, Suita S, Masumoto K, Nagasaki A. An abnormal distribution of C-kit positive cells in the normoganglionic segment can predict a poor clinical outcome in patients with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg* 2005; 15: 153-158
- Wedel T, Bottner M, Krammer HJ. The enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. Changes in chronic constipation in adults. *Pathologie* 2007; 28: 143-148
- Watanabe Y, Ando H, Seo T, Katsuno S, Marui Y, Ono Y, Torihashi S. Attenuated nitrergic inhibitory neurotransmission to interstitial cells of Cajal in

#### ■名词解释

c-Kit蛋白: 是已发现的Cajal间质细胞表面特异性标志物, 即酪氨酸激酶受体, 检测其含量可作为消化系Cajal间质细胞的定量指标, 干细胞因子是c-Kit的天然配基。

### ■同行评价

本课题设计及研究方法合理, 结果与结论相符, 讨论条理清晰, 具有一定的科学性和可靠性, 也具有科研和临床实用价值.

- the lower esophageal sphincter with esophageal achalasia in children. *Pediatr Int* 2002; 44: 145-148
- 22 Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 961-972
- 23 Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, Panthier JJ, Whetton AD, Forrester LM. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway. *J Cell Sci* 2006; 119: 3039-3046
- 24 Horvath VJ, Vittal H, Lorincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordog T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770
- 25 Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Harney SC, Sanders KM. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol* 1995; 269: C1577-C1585
- 26 Ward SM, Brennan MF, Jackson VM, Sanders KM. Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaking in murine gastrointestinal smooth muscle. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 3): 835-846
- 27 Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G313-G320

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 •

### 世界华人消化杂志计量单位标准

**本刊讯** 本刊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30 kDa( $M$ 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 $A_r$ ( $A$ 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 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\times$ 6 cm $\times$ 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、CO<sub>2</sub>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B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、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B<sub>12</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 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 $\cdot$ 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% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 血清MUC1、MUC2及MUC5AC表达与胃癌的关系

黄晓辉, 徐迎新, 李荣, 刘洪一, 张敏丽

黄晓辉, 徐迎新, 李荣, 刘洪一, 中国人民解放军总医院普通外科研究所 北京市 100853  
张敏丽, 中国人民解放军军事医学科学院 北京市 100850  
黄晓辉, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的诊断及治疗的研究。国家自然科学基金面上资助项目, No. 30070736  
作者贡献分布: 黄晓辉与徐迎新对此文所做贡献均等; 此课题设计由徐迎新, 李荣, 黄晓辉及刘洪一完成; 研究过程由徐迎新, 李荣, 黄晓辉, 刘洪一及张敏丽完成; 研究所用试剂及分析工具由徐迎新及张敏丽提供; 数据分析由黄晓辉及刘洪一完成; 本论文写作由黄晓辉及徐迎新完成。  
通讯作者: 徐迎新, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院普通外科研究所。xuyingx@126.com  
电话: 010-66937217  
收稿日期: 2007-12-24 修回日期: 2008-03-20

## Relationship between serum expression of MUC1, MUC2 and MUC5AC and gastric cancer

Xiao-Hui Huang, Ying-Xin Xu, Rong Li, Hong-Yi Liu, Min-Li Zhang

Xiao-Hui Huang, Ying-Xin Xu, Rong Li, Hong-Yi Liu, Institute of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Min-Li Zhang, Academy of Military Medical Sciences of Chinese, Beijing 100850, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30070736  
Correspondence to: Ying-Xin Xu, Institute of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. xuyingx@126.com  
Received: 2007-12-24 Revised: 2008-03-20

### Abstract

**AIM:** To explore the association of mucins (MUC1, MUC2 and MUC5AC) expression in serum with gastric cancer.

**METHODS:** Mucin protein chip was made using monoclonal and multiclinal antibodies and then applied to measure the levels of serum MUC1, MUC2 and MUC5AC in 30 gastric cancer patients and 30 healthy adults using the method of immunofluorescence (carcinoembryonic antigen as an indicator).

**RESULTS:** The levels of serum mucins and CEA in gastric cancer patients were significantly higher than those in the healthy controls. The positive expression of MUC1 was related with the TNM staging for gastric cancer ( $P = 0.0047$ ),

but the positive rates of MUC2 and MUC5AC expression had no relationship with the TNM staging ( $P = 0.136$ ,  $P = 0.201$ ). The positive rates of mucins expression were increased with the descending of cancer differentiation degree. Single mucin or either two mucins were sensitive and specific in the diagnosis of gastric cancer. For single mucin detection, MUC1 was the most sensitive and specific, with a sensibility of 81.5% and a specificity of 75.8%, respectively. Mucins in combination (at least 2 positive) had a sensibility of 96.0% and a specificity of 82.9%, respectively.

**CONCLUSION:** Serum mucins detection has higher sensibility and specificity in the diagnosis of gastric cancer, which may provide a new approach to early diagnose and prognose gastric cancer.

**Key Words:** Mucin; Protein chip; Gastric cancer

Huang XH, Xu YX, Li R, Liu HY, Zhang ML. Relationship between serum expression of MUC1, MUC2 and MUC5AC and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1299-1303

### 摘要

**目的:** 探讨胃癌血清中MUC1、MUC2及MUC5AC与胃癌的关系。

**方法:** 利用黏蛋白MUC1、MUC2及MUC5AC的单抗及多抗, 制备黏蛋白芯片, 用免疫荧光原理进行检测, 并用CEA作为指示指标, 对30例胃癌患者及30例健康人进行黏蛋白血清水平的检测。

**结果:** 胃癌组与对照组相比, 3种黏蛋白血清水平均增高, 两组间差异显著。MUC1的阳性表达与胃癌TNM分期相关( $P = 0.0047$ ), MUC2和MUC5AC的阳性表达与TNM分期无关( $P = 0.136$ ,  $P = 0.201$ )。3种黏蛋白的表达均随胃癌分化程度降低而阳性表达增高的趋势。各单一黏蛋白以及黏蛋白两两之间联合用于胃癌诊断的敏感性及其特异性均较高, 其中单一黏蛋白中, MUC1的敏感性和特异性最好, 分别

### 背景资料

胃癌是我国主要恶性肿瘤之一, 每年死亡约16万人, 占恶性肿瘤死亡的23.03%。从20世纪初开始, 人们不断研究新的诊断手段, 希望达到早期性、普查性、无创性的诊断目的, 但是单一肿瘤标志物, 因其特异性差和较高的漏诊率, 决定了它只能作为辅助诊断和术后复发的指标。应用蛋白芯片技术, 进行多种黏蛋白表达谱的联合研究, 用于胃癌的诊断指标, 具有较高的研究和临床应用价值。

### 同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

## ■ 研发前沿

应用蛋白芯片技术同时检测胃癌患者和健康志愿者血清中MUC1、MUC2、MUC5AC的含量,探讨其用于针对胃癌筛查和特异性诊断指标的可行性成为研究热点和重点。

达到81.5%、75.8%,联合诊断(3种黏蛋白中至少2种阳性)的敏感性和特异性达到96.0%、82.9%。

**结论:**检测血清黏蛋白MUC1、MUC2及MUC5AC水平,可以提高胃癌诊断的敏感性及特异性,为早期诊断提供新的思路,并对判断分期及预后提供帮助。

**关键词:**黏蛋白;胃癌;蛋白芯片

黄晓辉,徐迎新,李荣,刘洪一,张敏丽.血清MUC1、MUC2及MUC5AC表达与胃癌的关系.世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1299-1303

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1299.asp>

## 0 引言

黏蛋白是黏液凝胶的主要成分,是一组高度糖基化的不同糖蛋白的总称,主要起细胞保护、黏性维持、细胞识别等作用<sup>[1]</sup>,在肿瘤的进程中扮演着重要的角色<sup>[2]</sup>。我们应用蛋白芯片技术,对胃癌患者及正常人的血清标本进行黏蛋白MUC1、MUC2、MUC5AC表达的研究,以揭示黏蛋白MUC在胃癌患者血清中的表达规律及可能预示的临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究实验组的血清标本30例均收集2006-01/2006-10我院经手术、病理证实的胃癌患者,男21例,女9例,年龄在35-68(中位年龄54)岁;病理分期: I期: 5例, II期: 5例, III期: 7例, IV期: 13例;病理分期采用美国癌症联合委员会(AJCC)TNM分期方法。对照组30例血清标本均取自住院非肿瘤患者或正常献血者,实验组及对照组的血液标本均于晨起空腹时采取,自然凝固后,3000 r/min离心,取上清, -70℃冻存备用。MUC1、MUC2的单抗及多抗和MUC5AC的多抗均购自美国Santa Cruz公司,CEA的单抗、多抗和MUC5AC的单抗均购自美国的Neo2marker公司,芯片片基(环氧基化玻璃片)购自美国CEL Associates公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗及免疫荧光底物购自美国的Amersham公司。肿瘤标志物定标液(含CEA 400 μg/L, Ca153 267 kU/L)由本院生化科惠赠。洗涤液: 0.1 mol/L磷酸盐,缓冲液(PBS): 0.1% Tween220, pH7.4, 封闭液: 0.1 mol/L PBS, pH7.4, 2% BSA。免疫荧光分析仪为军事医学科学院二所提供应用。

## 1.2 方法

**1.2.1 芯片设计及制备:**将环氧基化玻璃片分隔成10个正方形的凹槽,将捕获抗体(多抗)以200 mg/L的浓度,点于片基上,每点0.25 μL,其中每个方格内分别点MUC1、MUC2、MUC5AC及CEA的多克隆抗体,湿盒中室温、轻振1 h,用封闭液室温封闭1 h,备用。

**1.2.2 免疫反应:**将芯片用洗涤液洗涤2 min×3次后,将待检样品加入芯片上(每孔20 μL),湿盒中室温、轻振1 h,洗涤液洗涤5 min×3次后,加入黏蛋白的单抗(包括MUC1、MUC2、MUC5AC及CEA的单抗,各浓度均为2 mg/L),湿盒中室温、轻振1 h,洗涤液洗涤5 min×3次,加入HRP标记的二抗(浓度为1 mg/L),湿盒中室温、轻振1 h,洗涤液洗涤5 min×3次。

**1.2.3 检测和标准曲线的绘制:**加入免疫荧光底物,通过荧光分析仪检测,使用GenePixPro4.0分析软件进行分析。采用CEA的浓度荧光强度曲线作为标准曲线间接地用于黏蛋白的浓度荧光强度曲线(图1)。由于每份肿瘤定标液中各抗原的荧光强度相同,也就是400 μg/L的CEA与267 kU/L的CA153有相同的荧光强度,而CA153和MUC1是同一黏蛋白的不同片段<sup>[3]</sup>,因此测出标本中MUC1的荧光强度,就可以对应地计算出标本中MUC1的浓度。同样方法计算出各血清标本的MUC2及MUC5AC的浓度。对每种黏蛋白的血清浓度进行统计分析,找到临界值,也就是检测敏感度+特异度为最大时所对应的血清值(因本实验的设计基于普查性应用,因此可以适当增加敏感度),并分别计算出各自的阳性例数,以及每两种黏蛋白中,至少有一种黏蛋白阳性的例数和三种黏蛋白中,至少有两种黏蛋白阳性例数。

**统计学处理** 数据采用SPSS10.0, *t*检验及 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

**2.1 胃癌组及对照组各种黏蛋白及CEA浓度** 胃癌患者血清中黏蛋白MUC1、MUC2、MUC5AC和CEA的浓度分别为5.85±2.57 kU/L、4.46±2.47 kU/L、5.07±3.24 kU/L、8.52±3.36 μg/L;对照组血清中黏蛋白MUC1、MUC2、MUC5AC和CEA的浓度分别为3.65±1.82 kU/L、2.73±1.63 kU/L、3.16±1.57 kU/L、5.36±2.58 μg/L;经*t*检验两组之间差异有统计学意义。

**2.2 3种黏蛋白(MUC1、MUC2、MUC5AC)在胃癌不同分期中的阳性分布及与胃癌不同分化程**

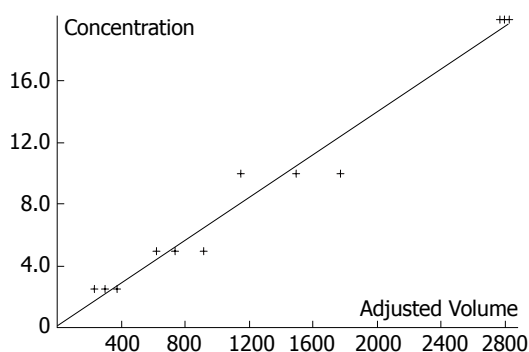


图 1 CEA的浓度-荧光强度曲线.

表 1 各种黏蛋白在胃癌分期和分化程度的表达

胃癌	MUC1		MUC2		MUC5AC		总计
	+	-	+	-	+	-	
I	1	4	2	3	3	2	5
II	4	1	3	2	2	3	5
III	5	2	6	1	4	3	7
IV	12	1	11	2	11	2	13
高分化与中分化	7	3	6	4	5	5	10
低分化与未分化	17	3	15	5	16	4	20

度的关系 经统计学分析( $\chi^2$ 检验), MUC1与胃癌分期相关, 中晚期胃癌中阳性率高( $P = 0.0047$ ), MUC2、MUC5AC与胃癌分期无明显相关( $P = 0.136, P = 0.201$ ). 3种黏蛋白(MUC1、MUC2、MUC5AC)在患者血清中的表达与胃癌不同分化程度相关( $P = 0.017, P = 0.036, P = 0.022$ ), 均有随分化程度降低而阳性表达增高的趋势(表1).

2.3 胃癌组及对照组三种黏蛋白(MUC1、MUC2、MUC5AC)、CEA的阳性表达分布及各黏蛋白、CEA在胃癌诊断中的特异度及敏感度 胃癌组中各种黏蛋白的阳性率分别为MUC1 73.3%、MUC2 73.3%、MUC5AC 66.6%, 各单一黏蛋白以及黏蛋白两两之间(每两种黏蛋白中, 至少有一种黏蛋白阳性)和联合诊(3种黏蛋白中, 至少有两种黏蛋白阳性)用于胃癌诊断的敏感性及特异性均较高, 其中单一黏蛋白中, MUC1的敏感性和特异性最好, 分别达到81.5%、75.8%, 联合诊断的敏感性和特异性更是达到96.0%、82.9%(表2).

### 3 讨论

自1990年以来, 黏蛋白基因不断地被发现, 关于其核心蛋白特性的研究近来亦倍受关注. 当机体发生病理改变时, 黏蛋白也随着病理变化而变化, 这种改变在肿瘤发生的早期和癌前病变中就可以表现出来. 研究这些黏蛋白的改变有

表 2 各黏蛋白、CEA以及两两之间和联合在胃癌诊断的特异度及敏感度

	敏感度(%)	特异度(%)	P
MUC1	81.5	75.8	0.000
MUC2	78.6	75.0	0.000
MUC5AC	74.1	69.7	0.001
CEA	71.4	68.8	0.002
MUC1+MUC2	73.0	87.0	0.000
MUC1+MUC5AC	70.3	82.6	0.000
MUC2+MUC5AC	67.6	78.3	0.001
联合	96.0	82.9	0.000

可能在肿瘤的筛查和早期诊断及判断预后中发挥重要作用.

MUC1<sup>[4]</sup>是一种 I 型跨膜蛋白, 高度糖基化(糖基化大于50%), 正常情况下主要表达于多种组织、器官中的上皮细胞近管腺腔面, 呈顶端表达, 极性分布, MUC1在肿瘤组织中多出现异常表达. MUC1基因在胃癌中的阳性表达率约为82.6%<sup>[4-5]</sup>. 有研究表明MUC1的阳性表达与胃癌病理类型相关<sup>[6]</sup>, 而与分化程度及Lauren氏分型无关<sup>[7]</sup>. 多数研究认为MUC1的阳性表达率与胃癌TNM分期相关<sup>[8-9]</sup>, MUC1的高表达多提示预后不良. 陈锡美 *et al*<sup>[10]</sup>应用RT-PCR方法对胃癌患者血清进行半定量检测, 结果胃癌患者外周血中MUC1阳性率44.6%; 其中具有淋巴结转移的阳性率73%, 其阳性率与TNM分期及淋巴结转移率正相关. 本实验通过蛋白芯片技术定量检测胃癌患者及正常对照组血清MUC1水平, 结果显示两者之间差异显著, 胃癌组阳性率达到73%, 且MUC1的阳性表达与TNM分期相关, 中晚期胃癌MUC1阳性率较早期胃癌升高, 这与多数研究结果相似. 本实验还发现MUC1的表达与分化程度相关( $P < 0.01$ ), 分化程度差的肿瘤高表达. 这些结果表明血清MUC1高含量可能预示该患者预后不佳. 以血清MUC1作为肿瘤标志物用于胃癌诊断, 灵敏度为81.5%, 特异度为75.8%, 对于胃癌诊断有一定的临床应用价值.

MUC2基因是1989年由美国学者Aubert *et al*<sup>[11]</sup>从人小肠cDNA文库中克隆到的一种黏蛋白核心肽基因, 编码一种分泌型黏液基因蛋白, 正常胃黏膜无MUC2表达. 王立顺 *et al*<sup>[12]</sup>研究证实MUC2的表达与胃癌病理类型明显相关, 在腺癌及肠型恶性程度较低的组织中呈强阳性表达, 在黏液癌及弥漫性恶性程度较高的癌组织中呈弱表达. 且MUC2表达与胃癌分化程度负相关, 即中高分化强表达, 低分化弱表达, 但与TNM分期

### ■ 相关报道

国内外对MUC1、MUC2、MUC5AC在胃癌组织中表达的规律及意义研究比较集中, 但定量检测血清中各种黏蛋白浓度用于恶性肿瘤诊断的研究尚不多见, 刘洪一对定量检测血清中各种黏蛋白浓度用于胰腺癌的诊进行了研究, 认为3种黏蛋白(MUC1、MUC2、MUC5AC)联合检测可以提高胰腺癌诊断的敏感性

### ■应用要点

应用蛋白芯片技术检测血清中多种黏蛋白含量用于胃癌诊断的肿瘤标志物,可以克服单一肿瘤标志物特异性差和漏诊率高的缺点,有利于提高临床中胃癌的早期诊断率,有较好的临床应用前景。

无明显关系<sup>[13]</sup>。MUC2的高阳性表达率与胃癌好的预后相关,这可能是由于MUC2中富含半胱氨酸区域,在控制细胞增生中起作用并导致MUC2阳性表达患者具有低度恶性潜在性<sup>[14]</sup>。但血清MUC2水平与胃癌关系尚不清楚,本研究结果显示胃癌组与正常对照组血清MUC2水平之间差异显著,胃癌组血清MUC2水平高于对照组( $P<0.01$ ),MUC2水平与胃癌分期无明显关系( $P>0.05$ ),这与文献报道相似,但本实验结果却发现MUC2表达在低未分化时高表达,提示不良预后,并未表现出高表达时预后好,可能与样本数量较少有关。本研究显示血清MUC2用于胃癌诊断时,灵敏度为78.6%,特异度为75.0%,在诊断中具有重要参考价值。

MUC5AC是一种分泌型黏蛋白,最早由法国学者Crepin从人支气管cDNA文库克隆成功<sup>[11]</sup>,后又在人胃cDNA文库克隆到该基因。他在正常胃黏膜浅表1/3范围内广泛表达,在不典型增生及胃癌组织中表达率下降<sup>[15-16]</sup>,在胃癌演进过程中下调表达,说明黏蛋白表达的大量丧失与胃癌发生相关。冯美燕 *et al*<sup>[17]</sup>报道在胃癌的癌前病变及癌症发生早期MUC5AC的异常表达就已经发生,可以考虑应用其抗体或与其他因子联合检测用于胃癌的早期诊断。Machado *et al*<sup>[18]</sup>研究发现,胃癌组织中MUC5AC的表达与肿瘤的组织学类型、TNM分期无关,而与Lauren分型有关<sup>[19]</sup>。黄文斌 *et al*<sup>[20]</sup>报道MUC5AC在早期胃癌的阳性率要明显高于进展期胃癌( $P<0.01$ )。我们的研究结果显示胃癌组血清MUC5AC含量高于正常对照组( $P<0.05$ ),但与胃癌TNM分期无关( $P>0.05$ ),早晚期胃癌之间MUC5AC的阳性率无明显差异,但随分化程度降低MUC5AC的表达有增高趋势,表明MUC5AC的高表达预示着胃癌的分化程度较好,可能有较好预后。

目前已经有多种肿瘤标志物在临床诊断中得到广泛应用,比如常用的对腺癌较为特异性的标志物为CA19-9、CA15-3、CA-125、CA72-4等。CEA在胃癌患者血清中的灵敏度为13%-35.7%,CA72-4的敏感性为31.3%-45.1%,CA19-9的敏感性为31.5%-68%<sup>[21-23]</sup>。但是同一种肿瘤可能产生多种肿瘤标志物,单一指标检测似乎始终存在特异性不强、阳性率较低等不足,合理地选择多种肿瘤标志物进行联合检测可以提高诊断的准确性。在我们的实验中,单一黏蛋白标志物在胃癌诊断中虽有不错的灵敏度及特异度,但考虑到同一胃癌患者血清中不同黏蛋

白表达的差异性,联合检测多种黏蛋白的血清水平用于联合诊断中可望提高诊断的灵敏度及特异度,有望在胃癌的筛查及早期诊断中发挥重要作用。

蛋白质芯片技术的应用使得对数以千计的蛋白质进行高通量、平行分析成为可能。我们应用蛋白芯片技术,成功对MUC1、MUC2、MUC5AC 3种黏蛋白在胃癌中的表达谱进行了研究,取得了一定结果,为进一步阐明有关问题,应继续研究更多的黏蛋白在血清中的表达谱,这样可以适当提高各黏蛋白的诊断标准,以降低误诊率,同时通过联合诊断降低漏诊率。另外,应监测黏蛋白在手术前后和放、化疗中的动态变化,以探讨其作为检测指标在判定手术及放、化疗效果中的意义。从临床应用的角度来说,由于蛋白芯片技术尚处于发展的初级阶段,仍有很多环节需要突破性进展,在检测技术方面还需要进一步完善。

### 4 参考文献

- 1 Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 2001; 6: D1321-D1357
- 2 Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001; 6: D1192-D1206
- 3 Sternberg LR, Byrd JC, Yunker CK, Dudas S, Hoon VK, Bresalier RS. Liver colonization by human colon cancer cells is reduced by antisense inhibition of MUC2 mucin synthesis. *Gastroenterology* 1999; 116: 363-371
- 4 汪荣泉, 房殿春, 罗元辉, 刘为纹. 用BC2单抗检测胃癌及癌前病变组织中MUC1基因表达及其意义. *肿瘤防治研究* 2000; 27: 13-15
- 5 汪荣泉, 房殿春, 刘为纹. 胃癌及癌前病变组织中MUC2基因的表达. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 285-288
- 6 Taylor KL, Mall AS, Barnard RA, Ho SB, Cruse JP. Immunohistochemical detection of gastric mucin in normal and disease states. *Oncol Res* 1998; 10: 465-473
- 7 Tajima Y, Shimoda T, Nakanishi Y, Yokoyama N, Tanaka T, Shimizu K, Saito T, Kawamura M, Kusano M, Kumagai K. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 136 lesions. *Oncology* 2001; 61: 212-220
- 8 Baldus, ZirbesTK, Engel S, Hanish FG, Lorenzen J, Glossmann J, Fromm S, Thiele J, Pichlmaier H, Dienes HP. Correlation of the immunohistochemical reactivity of mucin peptide cores MUC1 and MUC2 with the histopathological subtype and prognosis of gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 79: 133-138
- 9 von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 343-356
- 10 陈锡美, 王志荣, 朱风尚, 陈国裕, 冯久贤. MUC1基因在胃癌和外周血中的表达及临床意义. *浙江中西医结合*

- 合杂志 2003; 13: 211-212
- 11 Aubert JP, Porchet N, Crepin M, Duterque-Coquillaud M, Vergnes G, Mazzuca M, Debuire B, Petitprez D, Degand P. Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 178-185
  - 12 王立顺, 朱讯. MUC1和MUC2 mRNA在不同肿瘤组织的表达及其意义. *中国肿瘤临床* 2000; 27: 258-260
  - 13 Akyurek N, Akyol G, Dursun A, Yamac D, Guenl N. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: their relationship with clinicopathologic parameters and prognosis. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 665-674
  - 14 Cornberg M, Enss ML, Wagner S. Differential mucin expression in the gastrointestinal tract. *Z Gastroenterol* 2001; 39: 369-376, 378
  - 15 Rens CA, David L, Carvalbo F, Mandel U, Mirgorodskaya E, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 377-388
  - 16 Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 1995; 55: 2681-2690
  - 17 冯美燕, 程慧, 王静芬, 李春梅. MUC5AC核粘蛋白在早期胃癌中的表达和意义. *中国肿瘤临床* 2003; 17: 4-6
  - 18 Machado JC, Nogucira AM, Carneiro F, Reis CA, Sobrinho-Simoes M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol* 2000; 190: 437-443
  - 19 Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 61-69
  - 20 黄文斌, 袁平, 林鸿民, 徐国祥, 齐琼. 胃癌组织中黏蛋白MUC2和MUC5AC的表达及其临床意义. *实用肿瘤杂志* 2003; 18: 38-39
  - 21 田学智, 安梅, 张岩. 消化道恶性肿瘤患者CA19-9、CEA联合检测的价值及意义. *肿瘤研究与临床* 2000; 12: 17-18
  - 22 Nakajima K, Ochiai T, Suzuki T, Shimada H, Hayashi H, Yasumoto A, Takeda A, Hishikawa E, Isono K. Impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and alpha fetoprotein levels in gastric cancer patients. *Tumour Biol* 1998; 19: 464-469
  - 23 Ychou M, Duffour J, Kramar A, Gourgou S, Grenier J. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Dis Markers* 2000; 16: 105-110

#### ■同行评价

本文引言包括了该研究的目的和其他相关研究的关系, 科学结论较明确, 实验证据充足, 讨论条理分明, 参考文献恰当充分. 文章有一定的科学性、创新性和可读性, 较好地反映了我国或国际胃肠病学临床和基础研究水平.

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 •

## 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

**本刊讯** 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对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. (2)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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# 胃癌组织中eIF4E、VEGF和Cyclin D1的表达及其意义

方向明, 胡继军

## ■背景资料

目前我国胃癌死亡率在所有恶性肿瘤中位居首位。近年来,不少学者对胃癌的防治进行了研究,并取得一些进展,但由于对其发病机制尚未阐明,因而胃癌的发病率与死亡率并未得到根本改善。因此,深入研究胃癌的发生机制,尤其是寻找和发现与胃癌发生密切相关的新基因变异,对提高胃癌的防治水平具有重要意义。

方向明, 胡继军, 武汉大学医学院同仁医院消化科 湖北省武汉市 430060

方向明, 2002年武汉大学博士, 主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由方向明和胡继军设计; 研究过程由方向明和胡继军操作完成; 数据分析由方向明完成; 本论文写作由方向明和胡继军完成。

通讯作者: 方向明, 430060, 湖北省武汉市武昌区彭刘杨路241号, 武汉大学医学院同仁医院消化科, fxmzk@sina.com

电话: 027-68894659 传真: 027-88873219

收稿日期: 2007-11-06 修回日期: 2008-03-11

## Expression of eukaryotic initiation factor 4E, vascular endothelial growth factor and Cyclin D1 in gastric carcinoma and their significances

Xiang-Ming Fang, Ji-Jun Hu

Xiang-Ming Fang, Ji-Jun Hu, Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiang-Ming Fang, Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University, 241 Pengliuyang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. fxmzk@sina.com

Received: 2007-11-06 Revised: 2008-03-11

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), vascular endothelial growth factor (VEGF) and Cyclin D1 in gastric cancerous tissues and their correlations with the clinical pathology.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of eIF4E, VEGF and Cyclin D1 in 91 specimens of gastric cancer and 30 specimens of normal gastric tissues. The corresponding clinical data were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** In comparison with those in normal gastric mucosa, the expression of eIF4E, VEGF and Cyclin D1 were significantly increased (95.6%, 68.1%, 84.6% vs 0.0%, all  $P < 0.01$ ), which were significantly correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis and clinical stages ( $P < 0.05$ ), but not with the age, sex of patients and tumor differentiation. There was a positive

correlation between eIF4E and VEGF expression ( $r = 0.407, P < 0.05$ ) as well as between eIF4E and Cyclin D1 expression ( $r = 0.780, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expression of eIF4E, VEGF and Cyclin D1 are closely correlated with the invasion and metastasis of gastric carcinoma, and moreover, eIF4E expression is positively correlated with VEGF and Cyclin D1 expression.

**Key Words:** Gastric carcinoma; Eukaryotic initiation factor 4E; Vascular endothelial growth factor; Cyclin D1; Immunohistochemistry

Fang XM, Hu JJ. Expression of eukaryotic initiation factor 4E, vascular endothelial growth factor and Cyclin D1 in gastric carcinoma and their significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1304-1308

## 摘要

**目的:** 研究胃癌组织中真核细胞起始因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E), 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和细胞周期素D1(Cyclin D1)蛋白的表达水平及其与临床病理的关系。

**方法:** 胃癌组织91例和正常胃黏膜组织30例采用免疫组织化学方法检测eIF4E, VEGF和Cyclin D1的表达, 分析其表达差异, 并结合其临床病理资料进行综合分析。

**结果:** 与正常胃组织相比, eIF4E, VEGF和Cyclin D1蛋白在胃癌组织中均呈高表达(95.6%, 68.1%, 84.6% vs 0.0%, 均 $P < 0.01$ )。eIF4E, VEGF和Cyclin D1的阳性表达率与患者的年龄、性别以及肿瘤分化程度均无明显相关性, 但随着肿瘤浸润深度加深、淋巴转移产生、临床分期提高而升高( $P < 0.05$ )。eIF4E与VEGF, eIF4E与Cyclin D1的表达呈正相关( $r = 0.407, P < 0.05; r = 0.780, P < 0.01$ )。

**结论:** eIF4E, VEGF和Cyclin D1的表达与胃癌的侵袭、转移密切相关, eIF4E表达与VEGF以及Cyclin D1显著相关。

**关键词:** 胃癌; 真核细胞起始因子4E; 血管内皮生

## ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

## 长因子; 细胞周期素D1

方向明, 胡继军. 胃癌组织中eIF4E, VEGF和Cyclin D1的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1304-1308  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1304.asp

## 0 引言

胃癌是危害人类健康的常见恶性肿瘤. 我国属胃癌高发国家, 目前我国胃癌死亡率在所有恶性肿瘤中居第1位<sup>[1]</sup>. 胃癌的发生发展尽管存在着基因变异的复杂性和多样性, 但现有的研究认为, 任何形式的基因变异均在蛋白质水平上发挥功能<sup>[2-3]</sup>, 因此, 真核细胞(蛋白翻译)起始因子与肿瘤的关系日益受到重视, 其中尤以真核细胞起始因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E)与肿瘤的关系最为密切<sup>[4-8]</sup>. 有资料显示, eIF4E能使一些肿瘤恶性相关基因的表达量发生变化, 是肿瘤恶性表型产生的决定子; 通过调节一些特异的恶性相关分子的翻译表达量, 促使细胞跃过正常生长限制而发生癌变<sup>[9-10]</sup>. 我们对胃癌组织中eIF4E, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 细胞周期素D1(Cyclin D1)的表达进行研究, 并结合临床病理情况进行分析, 以探讨其在胃癌发生发展过程中的意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2002-10/2004-10我院经手术切除并经病理学证实的胃癌组织标本91例, 术前均未接受化放疗. 男61例, 女30例, 年龄37-79(平均51.2)岁; 肿瘤高分化31例, 中分化18例, 低分化39例, 未分化3例; 侵犯浆膜者58例, 未侵犯浆膜者33例; 有淋巴结转移53例, 无淋巴结转移38例; TNM分期: I期14例, II期22例, III期45例, IV期10例. 另选择同期经胃镜及病理组织学检查正常的胃黏膜标本30例作为研究对照. 男20例, 10例, 年龄35-74(平均48.4)岁. 鼠抗人eIF4E mAb, 鼠抗人VEGF mAb, 鼠抗人Cyclin D1 mAb均购自美国Santa Cruz公司. 免疫组化二步法试剂盒购自美国Antibody Diagnostic公司. DAB显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司.

**1.2 方法** 采用免疫组织化学二步法检测上述抗体对应抗原, 所有实验操作均按说明书操作规范进行, 实验中同时采用PBS代替一抗作为阴性对照, 以已知阳性反应的组织切片作为阳性对照. eIF4E阳性细胞为细胞质出现棕黄色颗粒, VEGF阳性细胞亦为细胞质出现棕黄色颗粒, Cyclin D1阳性细胞为细胞核出现棕黄色颗粒.

表1 eIF4E, VEGF, Cyclin D1阳性表达与胃癌临床病理因素之间的关系  $n(\%)$

临床病理	<i>n</i>	eIF4E	VEGF	Cyclin D1
肿瘤分化				
高中	49	46(93.9)	30(61.2)	41(83.7)
低未	42	41(97.6)	32(76.2)	36(85.7)
浸润深度				
未及浆膜	33	29(87.9)	15(45.5)	24(72.7)
浆膜及以外	58	58(100.0) <sup>a</sup>	47(81.0) <sup>a</sup>	53(91.4) <sup>a</sup>
淋巴结转移				
无	38	34(89.5)	18(47.4)	28(73.7)
有	53	53(100.0) <sup>a</sup>	44(83.0) <sup>a</sup>	49(92.5) <sup>a</sup>
TNM分期				
I + II	36	32(88.9)	16(44.4)	26(72.2)
III + IV	55	55(100.0) <sup>a</sup>	46(83.6) <sup>a</sup>	51(92.7) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

显微镜下随机选取5个高倍镜视野(>500个细胞), 分别计数阳性细胞数和总细胞数, 以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性表达<sup>[11-12]</sup>.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件包进行统计学分析. 各指标之间相关因素的差异性比较采用 $\chi^2$ 检验, 各指标间的相关性研究采用Spearman相关分析, 检验水准为 $P < 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 胃癌eIF4E, VEGF, Cyclin D1表达** 胃癌组eIF4E, VEGF, Cyclin D1阳性表达率分别为95.6%(87/91), 68.1%(62/91)和84.6%(77/91), 均明显高于正常胃黏膜组织(均未见eIF4E, VEGF或Cyclin D1阳性表达;  $\chi^2 = 102.072, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 41.921, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 69.813, P < 0.01$ , 图1-3).

**2.2 eIF4E, VEGF, Cyclin D1表达与胃癌临床病理因素的关系** eIF4E, VEGF, Cyclin D1的阳性表达率与患者的年龄、性别以及肿瘤分化程度均无明显相关性( $P > 0.05$ ). 而与肿瘤的浸润深度、淋巴转移及临床分期有关( $P < 0.05$ ). 即: eIF4E, VEGF, Cyclin D1的阳性表达率随着肿瘤浸润深度加深、淋巴转移产生、临床分期提高而升高( $P < 0.05$ , 表1).

**2.3 胃癌组织eIF4E, VEGF, Cyclin D1表达的相关性** 胃癌组织eIF4E与VEGF的表达呈正相关( $r = 0.407, P < 0.05$ ). eIF4E与Cyclin D1的表达亦呈正相关( $r = 0.780, P < 0.01$ ). 而VEGF与Cyclin D1的表达无明显相关( $r = 0.143, P > 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

1996年Jones *et al*<sup>[13]</sup>使用人小鼠体细胞杂交体分

## ■ 研发前沿

真核细胞(蛋白翻译)起始因子与肿瘤的关系日益受到重视, 其中尤以真核细胞起始因子4E(eIF4E)与肿瘤的关系最为密切.

## ■ 相关报道

有资料显示, eIF4E能使一些肿瘤恶性相关基因的表达量发生变化, 是肿瘤恶性表型产生的决定子, 其通过调节一些特异的恶性相关分子的翻译表达量, 促使细胞跃过正常生长限制而发生癌变.

■应用要点

本研究为通过抑制或降低eIF4E表达水平来降低VEGF和Cyclin D1表达,从而抑制胃癌细胞增殖提供了一定的依据。

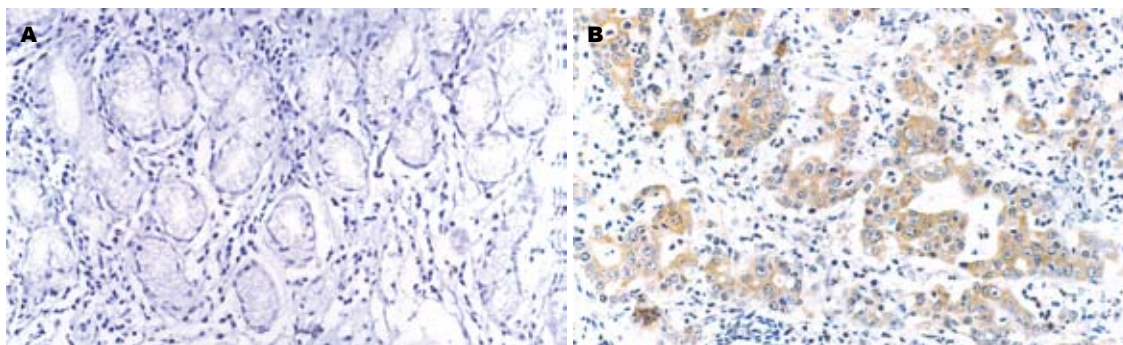


图 1 eIF4E在组织中的表达(EnVision × 200). A: 正常胃黏膜; B: 胃癌组织.

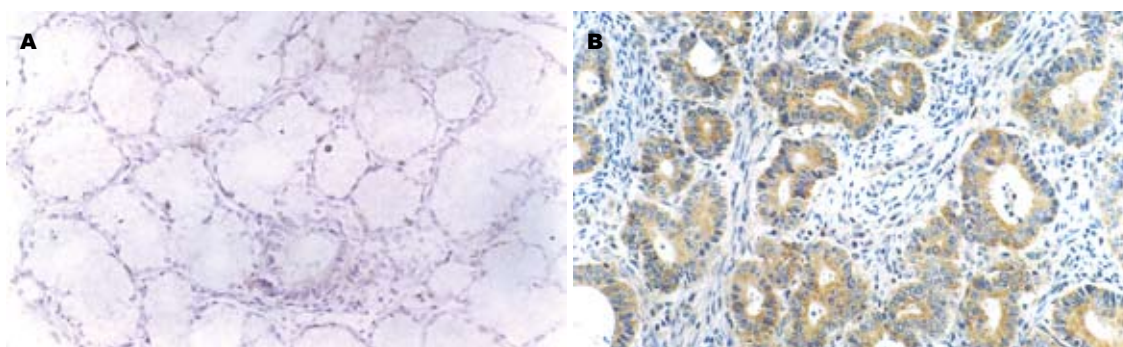


图 2 VEGF在组织中的表达(EnVision × 200). A: 正常胃黏膜; B:胃癌组织.

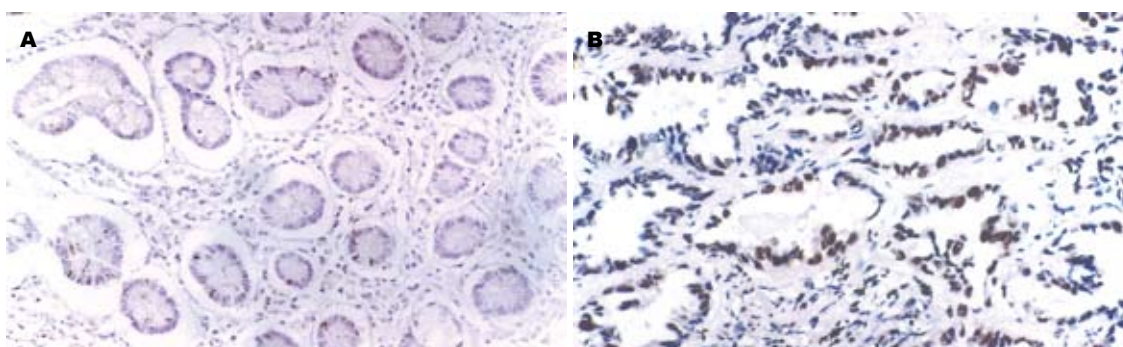


图 3 Cyclin D1在组织中的表达(EnVision × 200). A: 正常胃黏膜; B:胃癌组织.

析技术将人eIF4E基因定位于染色体4q21-q25. eIF4E基因编码25 kDa的多肽eIF4E可特异性地与真核细胞mRNA的5'末端帽结构结合,参与mRNA的翻译,在帽依赖的翻译起始阶段起限制调控作用<sup>[14-15]</sup>. eIF4E的作用一般认为是通过增强某些生长因子或重要的细胞生长调节因子的翻译而发挥的<sup>[16-17]</sup>. 在恶性肿瘤形成过程中,细胞的增殖需要大量的蛋白合成, eIF4E的表达增高是一个必然的事件<sup>[18-19]</sup>. eIF4E的过度表达不仅能促进细胞的增殖反应,而且更能促进细胞的恶性转化<sup>[20-22]</sup>. Kerekatte *et al*<sup>[23]</sup>首先在乳腺癌中发现eIF4E的过度表达,且不存在于乳房良性组织. Li *et al*<sup>[24]</sup>进一步发现,在乳腺癌 I -III期

表 2 胃癌组织中eIF4E与VEGF, Cyclin D1表达的相关性

eIF4E	n	VEGF		Cyclin D1	
		阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	87	61 <sup>a</sup>	26	77 <sup>b</sup>	10
阴性	4	1	3	0	4

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

患者中,当肿块标本中eIF4E的含量超过正常对照7倍时,肿瘤复发率、癌症致死率在统计学上有显著意义. 乳腺癌eIF4E的过度表达与肿瘤的复发、肿瘤的死亡有关,可作为独立的预后因子. 我们发现,胃癌中有95.6%的标本有eIF4E的

阳性表达, 而正常胃组织中无1例阳性表达, 两者相比差异有显著性( $P < 0.01$ ), 且eIF4E阳性表达率与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及TNM分期有关( $P < 0.05$ )。提示eIF4E基因表达上调与胃癌的形成密切相关, 并随着本病恶化程度的增加而持续增加, 其表达水平对评价胃癌的恶性程度有一定价值。

VEGF是一种非常重要的血管形成因子, 他在肿瘤新生血管形成以及肿瘤的生长、浸润及转移中起重要作用<sup>[25-26]</sup>。Cyclin D1是一种重要的细胞周期调控蛋白, 当Cyclin D1表达失控时, 则将引起细胞增殖失调, 进而导致肿瘤形成及发展<sup>[27-28]</sup>。从本研究结果来看, 胃癌中VEGF, Cyclin D1阳性表达率分别为68.1%和84.6%, 而正常胃组织中均未见阳性表达, 同时随着胃癌浸润深度的增加、有淋巴结转移以及TNM分期愈晚者Cyclin D1表达水平明显升高, 表明Cyclin D1可能参与促进胃黏膜细胞恶性转化, 其过度表达预示肿瘤有较高的侵袭性、容易发生转移和不良预后。目前认为, 在正常的eIF4E极低水平情况下, 肩负有“看家”功能的大多数拥有短5'非翻译区(UTR)的Strong mRNA, 他们在翻译时与含有长5'-UTR的Weak mRNA竞争中处于优势, 所以细胞功能得以维持; 然而, 在eIF4E过度表达情况下, 这些正常情况下不被翻译的含长5'-UTR mRNA的基因产物上调。这些基因产物中包括一些原癌基因及一些重要的细胞生长调节因子, 如c-Myc, Cyclin D1, VEGF, bFGF等<sup>[29-30]</sup>。上述所提到的基因产物对细胞恶性转化和分裂有重要影响。本研究通过检测eIF4E与VEGF及Cyclin D1在胃癌中表达, 分析他们之间的相关性, 结果表明, eIF4E分别与VEGF及Cyclin D1呈非常显著正相关, 提示胃癌中eIF4E高表达可能导致VEGF以及Cyclin D1表达水平增高。这不仅有助于深入认识eIF4E致癌的分子机制, 而且有鉴于此, 可通过抑制或降低eIF4E表达水平来降低VEGF和Cyclin D1表达, 从而抑制胃癌细胞增殖, 这将是很好的抗肿瘤策略, 可能具有良好的应用前景。

#### 4 参考文献

- 1 肖炜明, 施瑞华, 丁岩冰, 龚卫娟, 丁永玲, 薛艳. 胃癌组织中EGFR和COX-2表达的意义及其相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 123-128
- 2 Rosenwald IB. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* 2004; 23: 3230-3247
- 3 Barnhart BC, Simon MC. Taking aim at translation for tumor therapy. *J Clin Invest* 2007; 117: 2385-2388
- 4 Parker A, Anderson C, Weiss KL, Grimley M,

- Sorrells D. Eukaryotic initiation factor 4E staining as a clinical marker in pediatric neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 484-487
- 5 Matthews-Greer J, Caldito G, de Benedetti A, Herrera GA, Dominguez-Malagon H, Chanona-Vilchis J, Turbat-Herrera EA. eIF4E as a marker for cervical neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 367-370
- 6 Gu X, Jones L, Lowery-Norberg M, Fowler M. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in astrocytic tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 178-183
- 7 Zhou S, Wang GP, Liu C, Zhou M. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 231
- 8 Salehi Z, Mashayekhi F, Shahosseini F. Significance of eIF4E expression in skin squamous cell carcinoma. *Cell Biol Int* 2007; 31: 1400-1404
- 9 Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 2004; 23: 3172-3179
- 10 Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 2006; 175: 415-426
- 11 Nathan CO, Sanders K, Abreo FW, Nassar R, Glass J. Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications. *Cancer Res* 2000; 60: 3599-3604
- 12 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. Helicobacter pylori infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 54-58
- 13 Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M, Rustgi A, Callanan L, Schmidt EV. An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4754-4764
- 14 Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005; 433: 477-480
- 15 Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 2007; 6: 65-69
- 16 Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 2004; 10: 484-486
- 17 Wolfort R, de Benedetti A, Nuthalapaty S, Yu H, Chu QD, Li BD. Up-regulation of TLK1B by eIF4E overexpression predicts cancer recurrence in irradiated patients with breast cancer. *Surgery* 2006; 140: 161-169
- 18 McClusky DR, Chu Q, Yu H, Debenedetti A, Johnson LW, Meschonat C, Turnage R, McDonald JC, Abreo F, Li BD. A prospective trial on initiation factor 4E (eIF4E) overexpression and cancer recurrence in node-positive breast cancer. *Ann Surg* 2005; 242: 584-590; discussion 590-592
- 19 Salehi Z, Mashayekhi F. Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer. *Clin Biochem* 2006; 39: 404-409
- 20 Larsson O, Li S, Issaenko OA, Avdulov S, Peterson M, Smith K, Bitterman PB, Polunovsky VA. Eukaryotic

#### ■名词解释

真核细胞起始因子: 指参与真核细胞蛋白质生物合成起始阶段作用的蛋白因子。目前已发现包括eIF2A、eIF2B、eIF4A、eIF4B和eIF4E在内的多种真核细胞起始因子, 其中以eIF4E与肿瘤的关系最为密切。

### ■同行评价

本研究具有一定的先进性,设计规范,讨论切题,具有一定的参考价值.

- translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. *Cancer Res* 2007; 67: 6814-6824
- 21 Byrnes K, White S, Chu Q, Meschonat C, Yu H, Johnson LW, DeBenedetti A, Abreo F, Turnage RH, McDonald JC, Li BD. High eIF4E, VEGF, and microvessel density in stage I to III breast cancer. *Ann Surg* 2006; 243: 684-690; discussion 691-692
- 22 Defatta RJ, De Benedetti A. Translational upregulation of yes accompanies eIF4E-mediated oncogenic transformation. *Int J Oncol* 2003; 23: 1709-1713
- 23 Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, De Benedetti A. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 1995; 64: 27-31
- 24 Li BD, Liu L, Dawson M, De Benedetti A. Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 2385-2390
- 25 Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer* 2007; 14: 163-173
- 26 Lazăr D, Raica M, Sporea I, Tăban S, Goldiș A, Cornianu M, Cornianu M. Tumor angiogenesis in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47: 5-13
- 27 Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007; 98: 629-635
- 28 Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 2006; 24: 13-19
- 29 Schmidt EV. The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* 2004; 23: 3217-3121
- 30 Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 265-273

编辑 潘伯荣 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 •

## 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《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, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》,是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志,旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,使其成为一种公众资源,同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文,了解其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外,《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾,即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲,包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤,食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学,以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章,为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台,更新知识,为患者康复服务.(常务副总编辑:张海宁 2008-04-28)

## IQGAP2在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义

孙玉琳, 刘芳, 鲁海珍, 吕宁, 周兰萍, 蔡建强, 刘尚梅, 赵晓航

孙玉琳, 刘芳, 周兰萍, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室北京市 100021  
鲁海珍, 吕宁, 刘尚梅, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科北京市 100021

蔡建强, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院腹部外科北京市 100021

孙玉琳, 博士, 主要从事肝癌和食管癌的功能基因组和蛋白质组学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572126, No. 30772507, No. 30721001

高技术发展计划“863”资助项目, No. 2006AA02A308, No. 2006AA02Z19B

作者贡献分布: 此课题设计由孙玉琳, 蔡建强及赵晓航完成; 研究过程由孙玉琳, 刘芳及周兰萍操作完成; 组织病理评价由鲁海珍, 吕宁及刘尚梅完成; 数据分析由孙玉琳完成; 本论文写作由孙玉琳及赵晓航完成。

通讯作者: 赵晓航, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, zhaoxh@cicams.ac.cn

电话: 010-67709015 传真: 010-87778360

收稿日期: 2008-01-26 修回日期: 2008-03-17

### Expression of IQGAP2 and its clinical significance in hepatocellular carcinoma

Yu-Lin Sun, Fang Liu, Hai-Zhen Lu, Ning Lv, Lan-Ping Zhou, Jian-Qiang Cai, Shang-Mei Liu, Xiao-Hang Zhao

Yu-Lin Sun, Fang Liu, Lan-Ping Zhou, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China  
Hai-Zhen Lu, Ning Lv, Shang-Mei Liu, Department of Pathology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Jian-Qiang Cai, Department of Abdominal Surgery, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572126, No. 30772507, No. 30721001; and the High-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A308, No. 2006AA02Z19B

Correspondence to: Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. zhaoxh@cicams.ac.cn

Received: 2008-01-26 Revised: 2008-03-17

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of IQ motif containing GTPase activating protein 2 (IQGAP2) and its correlation with the

clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma (HCC), and to reveal the potential mechanisms of IQGAP2 underlying human hepatocarcinogenesis.

**METHODS:** Western blot, immunofluorescence staining and immunohistochemical staining (IHC) were used to detect the expression and subcellular localization of IQGAP2 in 7 liver cancer and normal liver cell lines, as well as in 51 HCC tissue specimens. Meanwhile, the corresponding clinical data were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Only two liver cancer cell lines, HepG2 and Hep3B, expressed IQGAP2 at the protein level. In addition, immunofluorescence results revealed that IQGAP2 was localized in cytoplasm and nuclei. Apparent nucleolus and karyotheca staining was observed in HepG2 cells. Furthermore, histological validation of clinical samples showed that IQGAP2 expression was significantly down-regulated in tumor tissues (56.9%, 29/51). Meanwhile, the expression of IQGAP2 was associated with tumor size, AJCC staging and alpha-fetoprotein (AFP) expression level ( $P = 0.020$ ;  $P = 0.017$ ;  $P = 0.002$ ). The immunohistochemical staining results from 38 HCC specimens showed that IQGAP2 was mainly localized at cytoplasm in the tumor and adjacent normal liver cells. In addition, partial cells had cell membrane and nuclear localization. However, definite association was not observed between IQGAP2 levels and tumor size, histological degree, AJCC staging or AFP expression status.

**CONCLUSION:** IQGAP2 expression is down-regulated in tumor tissues of HCC cases, and IQGAP2 may be a potential marker and tumor suppressor gene involved in HCC. These novel findings may provide a basis for the determination of mechanism(s) underlying human hepatocarcinogenesis.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; IQ motif containing GTPase activating protein 2; Alpha-fetoprotein; Tumorigenesis; Immunofluorescence; Immunohistochemistry; Western blot

### ■背景资料

肝细胞肝癌(HCC)的恶性程度高、预后不良, 5年生存率不足10%。虽然甲胎蛋白(AFP)是目前公认的HCC标志物, 但至少20%的患者血清AFP水平并不高, 因此, 发现新的HCC相关肿瘤标志分子, 与AFP联用提高HCC诊断准确率以及深入理解HCC的分子癌变机制十分必要。

### ■同行评议者

刘成海, 研究员, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

## ■ 研发前沿

含IQ模体的GTP酶活化蛋白2(IQGAP2)是近几年新发现的Ras GTPase超家族成员,目前发现其参与细胞黏附、吞噬和信号转导过程。基因敲除小鼠的研究结果认为他是一种新的抑癌基因。

Sun YL, Liu F, Lu HZ, Lv N, Zhou LP, Cai JQ, Liu SM, Zhao XH. Expression of IQGAP2 and its clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1309-1316

## 摘要

**目的:** 认识肝细胞肝癌中含IQ模体的GTP酶活化蛋白2(IQ motif containing GTPase activating protein 2, IQGAP2)的亚细胞定位和表达,及其在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的作用。

**方法:** 分别通过Western blot、免疫荧光和免疫组织化学染色分析IQGAP2在7种人肝癌细胞与正常肝细胞系中的表达、定位,及其在HCC组织样本中的表达与分布。

**结果:** IQGAP2在Bel-7402、Bel-7404、SMMC-7721、SK-HEP-1、HLE和HL-7702等肝癌和正常成人肝细胞系中不表达,仅在HepG2和Hep3B等2种甲胎蛋白(AFP)表达阳性的人肝癌细胞系中表达。IQGAP2主要分布于细胞质,此外,在HepG2细胞中还具有明显的核膜和核仁定位。IQGAP2在HCC组织中表达降低(56.9%, 29/51)。其中,19例配对HCC组织的IQGAP2表达与肿瘤大小、AJCC分期和血清AFP水平相关( $P = 0.020$ ,  $P = 0.017$ ,  $P = 0.002$ ); 38例配对组织IQGAP2在肿瘤和癌旁正常肝组织中主要定位于胞质,部分细胞伴有胞核和胞膜定位。但是, IQGAP2的表达与肿瘤大小、分化程度、AJCC分期以及血清AFP表达水平无相关性。

**结论:** IQGAP2蛋白可能参与细胞黏附、信号转导等过程,在肝癌的发生发展中发挥重要作用,是一种潜在的抑癌基因。

**关键词:** 肝细胞肝癌; 含IQ模体的GTP酶活化蛋白2; 甲胎蛋白; 癌变机制; 免疫荧光; 免疫组化; 免疫印迹

孙玉琳, 刘芳, 鲁海珍, 吕宁, 周兰萍, 蔡建强, 刘尚梅, 赵晓航. IQGAP2在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1309-1316

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1309.asp>

## 0 引言

肝癌是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,2000年全世界新发病例约564 000人,位居所有恶性肿瘤第5位。由于其恶性程度高、预后不良,5年生存率不足10%。中国是肝癌的高发区,集中了全世界约54%的新发病例,其中肝细胞

肝癌(hepatocellular carcinomas, HCC)占原发性肝癌的90%以上<sup>[1-2]</sup>。据1991-2000年169 871人口的死因抽样调查显示, HCC死亡率排在全部恶性肿瘤的第2位,年死亡率为54.7/100 000(男81.2,女29.0)<sup>[3]</sup>。由于他具有很多生物学和化学性致癌因素,因此他的分子癌变进展通路并不像结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤那样明确。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是目前公认的HCC血清标志,约60%-70%的HCC患者伴随血清AFP水平升高。但是,大约20%的慢性肝炎、20%-60%的肝炎肝硬化和某些胚胎性肿瘤时血清AFP水平也会升高<sup>[4-5]</sup>。更重要的是,大约20%-30%的HCC患者血清AFP水平不高,而使AFP在辅助HCC诊断中的作用受限。因此,发现新的HCC相关肿瘤标志分子,与AFP联用提高HCC诊断准确率以及揭示肝癌的分子癌变机制十分必要。

本实验室在前期工作中,利用细胞培养的稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acid in cell culture, SILAC)结合高精度nanoLTQ-FT-MS/MS,分析了肝癌细胞系HepG2和SK-HEP-1与正常成人肝细胞系HL-7702之间的差异蛋白表达谱,发现含IQ模体的GTP酶活化蛋白2(IQ motif containing GTPase activating protein 2, IQGAP2)在肝癌细胞中表达水平明显改变。IQGAP2是Ras GTPase超家族成员,分子量约180 ku,是一种肝脏特异表达蛋白,近年发现IQGAP2还可以在活化血小板的丝状伪足和胃腺细胞canalicular membranes处表达<sup>[6-8]</sup>。目前,尚无IQGAP2在人类肝癌组织中表达情况的相关报道。本研究通过观察IQGAP2在多个肝癌细胞系和51例临床标本中的表达状况,初步探讨了IQGAP2在HCC发生发展中的潜在作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取中国医学科学院肿瘤医院腹部外科2003-10/2006-11接受手术治疗的HCC新鲜组织标本19例和石蜡包埋标本(两者有6例重合病例)38例。新鲜组织标本中包括18例男性和1例女性(均为HBV阳性),年龄范围32-69(平均年龄52,中位年龄50)岁。其中AFP阳性( $\geq 20 \mu\text{g/L}$ )12例,AFP正常或表达阴性( $< 20 \mu\text{g/L}$ )7例。组织学Edmondson分级为I-II级3例、II级10例、II-III级4例和III级2例。石蜡包埋样本38例,含34例男性和4例女性,除1例以外,均为HBV感染阳性,2例为HBV和HCV双重感染。患者年龄30-71(平均年龄52,中位年龄51)岁。其中,血

清AFP阳性18例、AFP正常20例。Edmondson分级 I 级2例、I - II 级4例、II 级21例、II - III 级6例和III 级4例、不明1例。所有病例取材得到知情同意, 术前未行放化疗。人肝癌细胞系HepG2、Hep3B和SK-HEP-1购自美国细胞中心(american type culture collection, ATCC, Rockville, MD)。培养于100 mL/L胎牛血清、1 mmol/L丙酮酸钠和2 mmol/L-谷氨酰氨的MEM培养基中。Bel-7402、Bel-7404、SMMC-7721和正常成人肝细胞系HL-7702购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所细胞库, 培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中。HLE细胞购自日本科学研究资源库(Human Science Research Resources Bank, Osaka, Japan), 培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中。以上细胞均在37°C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养。MEM、RPMI 1640和DMEM培养基购自美国GIBCO/BRL公司; 胎牛血清购自PAA公司; 丙酮酸钠、L-谷氨酰氨、1 g/L(w/v)的poly-L-lysine原液, DAPI和蛋白酶抑制剂AEBSF、Leupeptin,  $\beta$ -actin mAb购自Sigma-Aldrich公司, Aprotinin购自Roche公司; Coomassie Plus Protein Assay蛋白定量试剂盒购自Pierce公司; 预染Bench Mark购自Invitrogen公司; 聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自Amersham Pharmacia Biotech公司; ECL试剂购自Santa Cruz公司; 免疫组织化学S-P试剂盒购自福州迈新公司; DAB试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。IQGAP2 mAb购自Upstates公司。

**1.2 方法** 新鲜组织标本一经分离, 迅速去除坏死的组织以及血管、系膜等结缔组织, 分别切取癌和远端切缘的正常肝组织, 放入预冷的生理盐水内, 洗3-4次。称质量, 分装, 放入液氮速冻后转入-80°C冰箱保存。用于免疫组化分析的标本经40 g/L甲醛固定。

**1.2.1 蛋白提取和Western blot分析:** 配对的肝癌和癌旁正常肝组织样品, 各取100 mg, 砸碎后于液氮中研磨成粉末状, 收集于Eppendorf管后, 置于冰上。加入蛋白裂解液(50 mmol/L Tris-HCl(pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 g/L NP-40, 10 g/L SDS, 1 mmol/L AEBSF, 20 mg/L aprotinin, 20 mg/L leupeptin, 1 mmol/L EDTA), 并用pellet motor(Sigma-Aldrich公司)匀浆, 冰上放置30 min, 使蛋白充分溶解。冰上超声后, 4°C, 12000 g, 离心15 min, 收集上清并分装, 保存于-80°C。蛋白浓度经由Coomassie Plus Protein Assay试剂盒测定。

培养的正常肝及肝癌细胞待长到80%-90%融合时, 用4°C预冷的PBS洗3次后, 加入适量蛋白裂解液, 用细胞刮子将细胞刮下, 收集于Eppendorf管中, 蛋白获取方法同前述。

蛋白上样量为15  $\mu$ g, 样品经100 g/L的SDS-PAGE分离以后, 湿转法转印至PVDF膜上。50 g/L的脱脂牛奶室温封闭3 h后, 与鼠抗人IQGAP2(1:1000稀释)或 $\beta$ -actin(1:5000稀释)mAb室温反应3 h, 用含1 g/L Tween-20的TBS(TBST)溶液洗膜, 3 min $\times$ 5次, 与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体(1:3000), 室温孵育1 h。再次经TBST溶液洗膜, 3 min $\times$ 8次后, ECL化学发光检测。结果经ChampGel 3000(Sage Creation公司)灰度扫描后, 进行半定量分析。

**1.2.2 间接免疫荧光分析:** 首先用0.1 g/L的poly-L-lysine处理灭菌盖玻片的细胞接触面30 min, 而后弃去溶液, 将其置于6孔板中。将3 $\times$ 10<sup>5</sup>的HepG2、Hep3B和SK-HEP-1细胞接种于6孔板中, 37°C培养, 至细胞融合达60%-70%。弃去培养基, 用4°C预冷的PBS洗3次, 吸干液体, 用甲醇室温固定30 min, PBS洗涤3 min $\times$ 3次, 浸入30 mL/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中10 min, PBS洗涤3 min $\times$ 3次, 0.06% Triton-X 100处理10 min后, PBS洗3 min $\times$ 3次。山羊非免疫血清室温封闭10 min, 加入1:50稀释的IQGAP2单抗, 4°C孵育过夜。采用PBS作为阴性对照。PBS洗涤3 min $\times$ 3次以后, 加入FITC标记的二抗室温避光孵育30 min, PBS洗涤3 min $\times$ 3次, 1:1000 DAPI染核, 500 mL/L甘油-PBS封片, Nikon E400荧光显微镜观察并照相。

**1.2.3 免疫组织化学染色及其结果评分:** IQGAP2的免疫组织化学染色, 采用S-P法。包含肝癌和癌旁正常组织的组织切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化后, 浸入30 mL/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性。切片经PBS冲洗后, 将其置入0.01 mol/L, pH6.0的柠檬酸缓冲液沸水浴10 min, 以充分暴露抗原。切片室温冷却30 min后, PBS冲洗, 滴加山羊非免疫血清, 室温封闭15 min, 然后滴加小鼠抗人IQGAP2 mAb(1:50稀释), 4°C孵育过夜。阴性对照采用小鼠的非免疫血清替代一抗。切片经PBS冲洗后, 滴加生物素标记的第二抗体, 室温孵育10 min, PBS冲洗, 而后滴加辣根过氧化物酶标记的链亲和素抗体, 室温孵育10 min, PBS冲洗。切片组织经DAB溶液显色约2-3 min后, PBS终止反应, 再经苏木素复染、自来水冲洗返蓝。经梯度乙醇脱水、二

#### ■ 相关报道

在对非洲爪蟾胚胎的研究中发现, IQGAP2对于cadherin中介的细胞-细胞黏接和早期胚胎发育是必须的。最近, 在胃癌和基因敲除小鼠模型中的研究结果表明, 他可能是一种新的抑癌基因。

### ■创新盘点

本研究结果显示, IQGAP2还可以定位于胞核和胞膜. 核内的IQGAP2可能参与基因的表达调控, 胞膜和胞质内的该蛋白影响细胞间黏附和信号转导过程. IQGAP2在HCC组织中表达下调, 可能在肝癌的发生发展中发挥重要作用.

表 1 IQGAP2表达与肝癌临床特征之间的关系

分组	Western blot分析			免疫组织化学染色			两者综合		
	<i>n</i>	下调(%)	<i>P</i>	<i>n</i>	下调(%)	<i>P</i>	<i>n</i>	下调(%)	<i>P</i>
性别									
男	18	61.1(11/18)	1.000	34	55.9(19/34)	1.000	47	57.4(27/47)	1.000
女	1	100.0(1/1)		4	50.0(2/4)		4	50.0(2/4)	
年龄									
≥60	5	40.0(2/5)	0.305	11	36.4(4/11)	0.167	16	37.5(6/16)	0.074
<60	14	71.4(10/14)		27	63.0(17/27)		35	65.7(23/35)	
肿瘤长径									
≥5 cm	10	90.0(9/10)	0.020	17	52.9(9/17)	1.000	23	65.2(15/23)	0.395
<5 cm	9	33.3(3/9)		21	57.1(12/21)		28	50.0(14/28)	
肿瘤分化									
中高分化	13	53.8(7/13)	0.333	27	51.9(14/27)	0.528	37	51.4(19/37)	0.339
中低分化	6	83.3(5/6)		10	60.0(6/10)		13	69.2(9/13)	
N/A	0			1	100.0(1/1)		1	100.0(1/1)	
AJCC分期									
I-II	12	41.7(5/12)	0.017	31	74.2(23/31)	1.000	39	59.0(26/39)	0.470
III-IV	7	100.0(7/7)		7	71.4(5/7)		12	83.3(10/12)	
AFP表达									
≥20 μg/L	12	91.7(11/12)	0.002	18	44.4(8/18)	0.328	27	59.3(16/27)	0.782
<20 μg/L	7	14.3(1/7)		20	65.0(13/20)		24	54.2(13/24)	

甲苯透明后, 中性树脂封片.

以细胞膜和细胞质出现均匀分布的棕黄色颗粒为表达阳性, 并用以下标准评价表达程度. 着色强度评分: 未着色(0分)、浅黄色(1分)、浅棕色(2分)和深棕色(3分); 观察结果评分, 即阳性细胞占病变细胞的百分比: <5%(0分); 5%-25%(1分); 26%-50%(2分); 51%-75%(3分)和>75%(4分). 染色强度评分和观察结果评分的乘积为表达程度, ≥2分认为是表达阳性.

**统计学处理** 数据采用SigmaStat3.5软件进行统计学处理. 计数资料根据适用情况选择Student's *t*检验或Mann-Whitney秩和检验, 计量资料采用Fisher's精确概率法或 $\chi^2$ 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

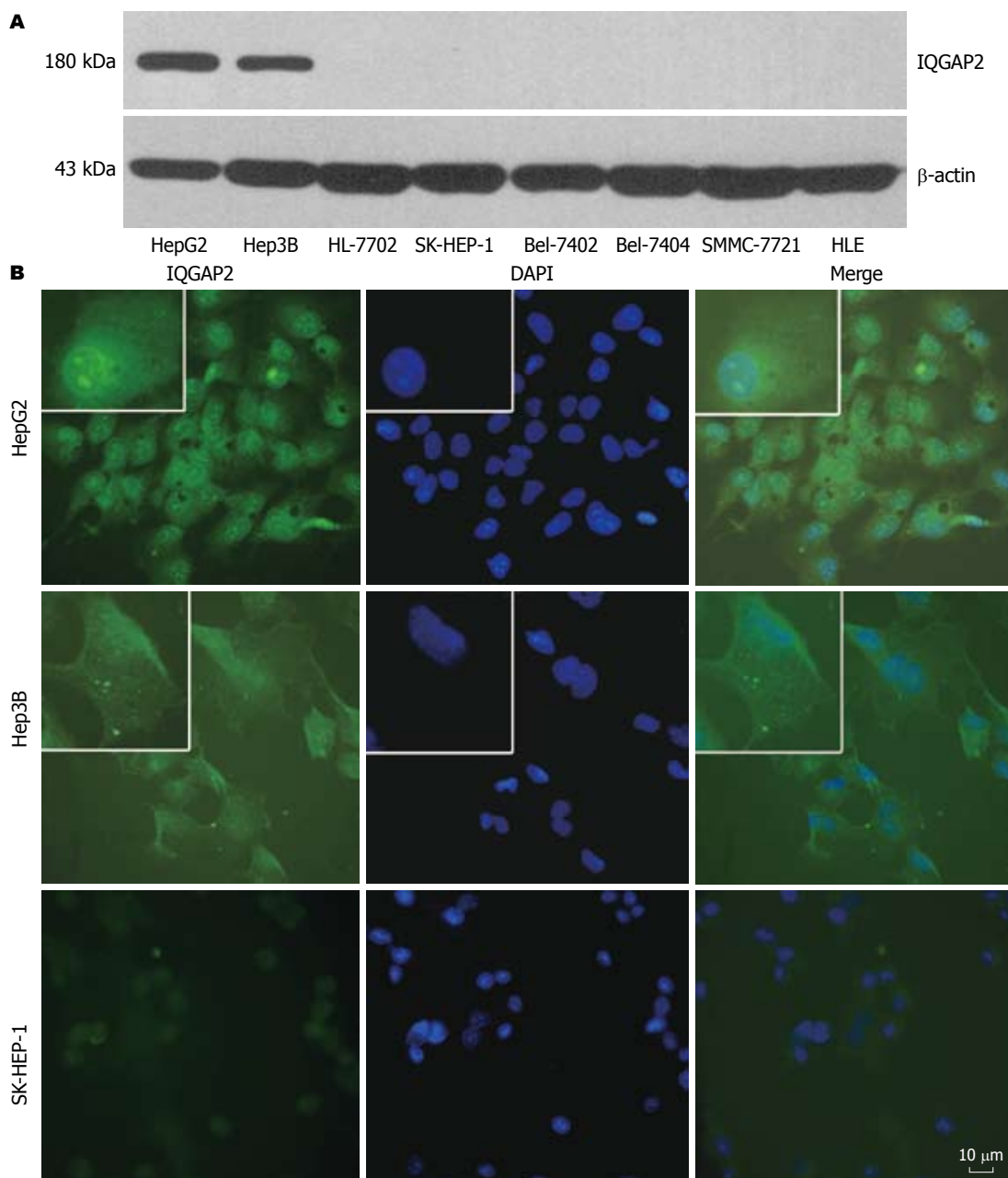
## 2 结果

**2.1 IQGAP2在肝癌和正常肝细胞系中的表达** IQGAP2蛋白仅在HepG2和Hep3B肝癌细胞中表达, 在SK-HEP-1、Bel-7402、Bel-7404、SMMC-7721、HLE和正常成人肝细胞系HL-7702中均不表达(图1A). 选择IQGAP2表达与不表达的肝癌细胞系HepG2、Hep3B和SK-HEP-1经免疫荧光分析IQGAP2在肝癌细胞中的定位特征. 在HepG2细胞中, IQGAP2主要定位于胞质和胞核, 伴有明显的核膜与核仁定位;

Hep3B中IQGAP2定位于胞质, 胞核有少量定位, 未见明显的核膜和核仁定位; SK-HEP-1细胞中基本不表达IQGAP2(图1B).

**2.2 IQGAP2在配对肝癌组织中的表达与临床病理分型的关系** Western blot结果显示, 在19对肝癌配对样本中, 与癌旁正常肝组织相比, IQGAP2在12例肿瘤组织中表达降低, 在7例肿瘤组织中表达升高(图2). 灰度扫描结果显示, IQGAP2在癌旁正常组织中的表达灰度值中位数为1.52, 在肿瘤组织中的中位值为0.98, 经过Mann-Whitney秩和检验, 差异具有显著性( $P = 0.044$ ), 表明IQGAP2是一种在肝癌组织中表达下调的蛋白质. Fisher's精确概率检验发现, IQGAP2的表达与性别、年龄、肿瘤分化程度无关, 而与肿瘤大小、AJCC分期和血清AFP表达水平具有明显相关性( $P<0.05$ , 表1), 表明肿瘤长径越大, 肿瘤分期越晚, AFP表达水平越高, IQGAP2越倾向于在肿瘤组织中表达降低.

**2.3 IQGAP2在肝癌组织中的免疫组织化学染色与肝癌临床特征的关系** 免疫组织化学染色结果显示, IQGAP2在肝癌及其癌旁组织中主要定位于细胞质, 部分细胞伴有胞核和胞膜定位. 呈弥漫性颗粒状分布, 癌旁正常组织中肝细胞染色强度明显高于肝癌细胞(图3). 在38例配对肝癌组织样本中, IQGAP2在肝癌组织表达阳性



**应用要点**  
 本研究为深入理解HCC的癌变机制,发现新的肿瘤标志分子及阐明IQGAP2的功能提供借鉴。

图 1 IQGAP2在肝癌和正常肝细胞系中的表达. A: Western blot检测IQGAP2在7个肝癌细胞系和正常肝细胞系HL-7702中的表达.  $\beta$ -actin: 上样量对照. B: 免疫荧光分析结果, IQGAP2在肝癌细胞系HepG2、Hep3B和SK-HEP-1中的表达( $\times 200$ ). 左上角小图为相应细胞的放大图像( $\times 400$ ).

率为34.2%(13/38), 在癌旁正常肝组织表达阳性率为71.1%(27/38), 经 $\chi^2$ 检验, 差异具有显著性( $P = 0.003$ ). 部分HCC样本( $n = 12$ )肿瘤组织和癌旁正常组织IQGAP2均表达很弱, 无差异. 经过Fisher's精确概率检验, IQGAP2在肝癌组织中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、AJCC分期和血清AFP水平间均没有明显相关性( $P > 0.05$ , 表1).

2.4 IQGAP2的表达与HCC临床病理参数之间的关系 综合Western blot和免疫组织化学染色的结果, IQGAP2在肝癌组织中表达下调(56.9%,

29/51), 但与患者年龄、肿瘤大小、分化程度和血清AFP水平没有明显的相关性(表1).

### 3 讨论

IQGAPs蛋白是真核细胞内一个相对保守的蛋白家族, 从酵母、蠕虫到哺乳动物均有表达, 目前在人类至少发现了3个家族成员, 即IQGAP1、IQGAP2和IQGAP3. IQGAP1和IQGAP2由不同的基因编码, 两者具有62%的序列同源性<sup>[6]</sup>. 因为具有IQ和Ras GTPase激活蛋白相关(Ras GTPase-activating protein(GAP)-related domain,

### 同行评价

本研究临床资料重要,方法可靠,证据可信,写作规范,是一篇优秀应用基础论文。

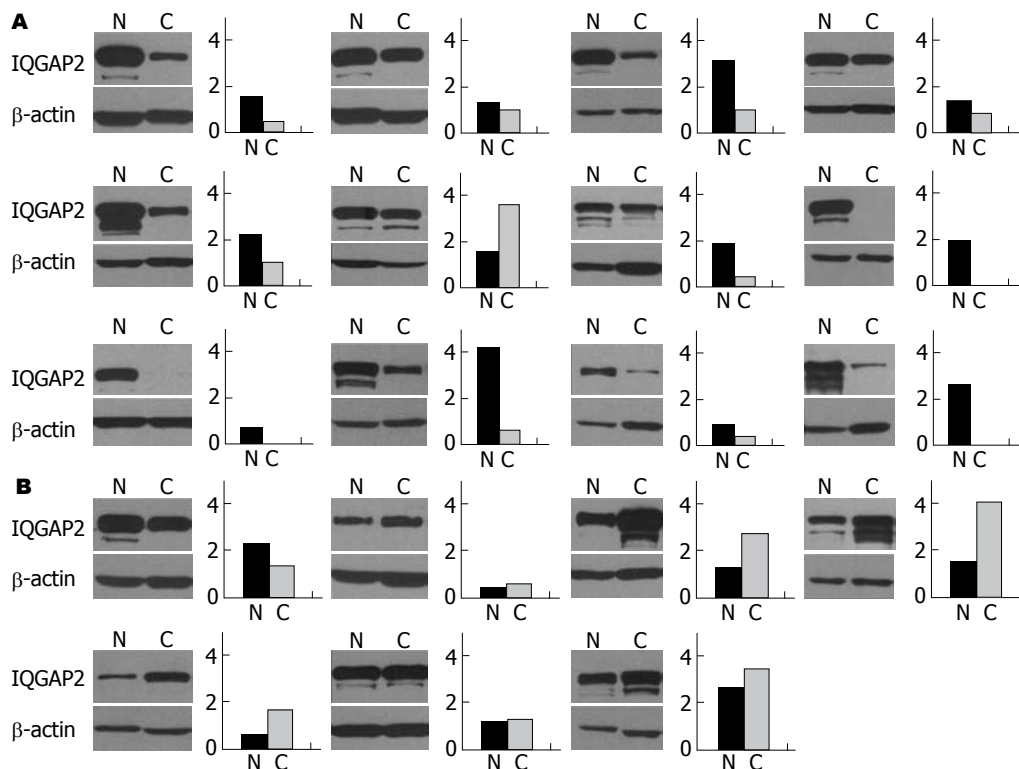


图2 IQGAP2在肝癌组织中的表达。A: AFP+HCC; B: AFP-HCC。19例肝癌样本(12例AFP+7例AFP-的HCC)的Western blot分析, N: 癌旁正常组织; C: HCC肿瘤组织。右图表示每一例样本中, IQGAP2在癌旁正常组织和肿瘤组织中的相对表达量(IQGAP2与 $\beta$ -actin的灰度值之比)。

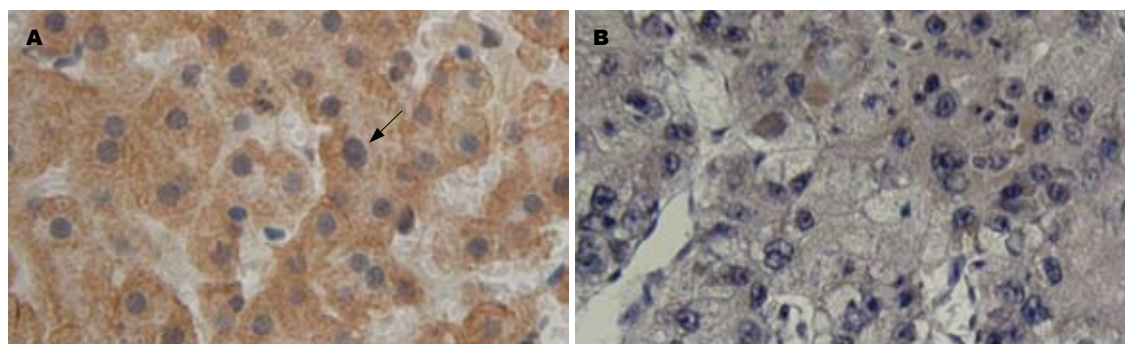


图3 IQGAP2在肝癌组织中的免疫组化染色。A: 癌旁正常肝脏组织, IQGAP2表达强阳性, 呈现胞质内的颗粒状着色, 部分细胞存在细胞膜定位(下方的部分细胞), 箭头所示的细胞具有细胞核定位; B: IQGAP2在HCC肿瘤组织表达为阴性( $\times 200$ )。

GRD)结构域, 这类蛋白被命名为IQGAPs。IQ结构域由4个串联排列的IQ模体组成, 能与钙调蛋白、肌球蛋白轻链和S100B结合。GRD结构域可以和Rho GTPase、CDC42、Rac1结合<sup>[9]</sup>。此外, IQGAP2的N端还有1个CH(calponin homology)结构域, 其与F-actin结合蛋白结构域高度相似, 可能具有actin结合活性<sup>[6]</sup>。CH结构域的下游还具有1个WW, 能够结合多聚脯氨酸, 与SH3结构域具有功能相似性。

目前对IQGAP2同源蛋白IQGAP1的功能研究认为该蛋白的主要功能为参与细胞骨架调节作用。IQGAP1可直接结合actin, 另一方面, 他

和其他的蛋白分子, 如Ras GTPase, CDC42结合, 间接调节细胞骨架组装<sup>[6,10]</sup>。IQGAP1可以和E-cadherin和 $\beta$ -catenin相互作用, 减少cadherin分子和细胞骨架系统间的相互作用, 削弱上皮细胞间的黏附。而CDC42和Rac1可以抑制IQGAP1的这一效应<sup>[11-12]</sup>。因此, IQGAP1有可能参与肿瘤的侵袭、转移过程。而且, IQGAP1是多条信号转导通路的“脚手架”蛋白, 如与MEK1、MEK2、ERK2和B-Raf等蛋白间发生相互作用, 调节EGF刺激的MAPK/ERK信号转导<sup>[13-15]</sup>。此外, 他还可以结合VEGF2型受体, 参与组织ROS依赖的VEGF信号转导<sup>[16]</sup>。研究发现, IQGAP1在

多种肿瘤中过表达. IQGAP1基因敲除小鼠产生胃腺体肥大和息肉<sup>[17]</sup>. 一些弥散型胃癌病例伴有IQGAP1基因扩增和过表达现象<sup>[18]</sup>. IQGAP1在结肠癌中表达上调, 特别是肿瘤侵袭前沿, 在高侵袭性的进展期肿瘤尤为明显<sup>[19]</sup>. Jadeski *et al*<sup>[20]</sup>报道, IQGAP1在乳腺癌细胞中高表达, 尤其是高转移细胞系, 高表达的IQGAP1可以促进乳腺癌细胞MCF-7的增生、侵袭和小鼠移植瘤模型中肿瘤血管生成能力. Dong *et al*<sup>[21]</sup>发现, 过表达IQGAP1及其肿瘤侵袭前沿的弥漫性表达模式与卵巢腺癌患者不良预后相关.

目前对IQGAP2的功能研究较少, 现有结果显示IQGAP2可以抑制Cdc42和Rac1内源性及RhoGAP活化的GTP水解率, 参与GTPase信号转导. 而且, 作为一种磷酸化蛋白质, 他还可能被 $[Ca^{2+}]$ /PKC和cAMP信号调节<sup>[6]</sup>. 另外, IQGAP2可以中介体内溶酶体/吞噬体的结合过程<sup>[22]</sup>. 在对非洲爪蟾胚胎的研究发现, IQGAP2对于cadherin中介的细胞-细胞黏接和早期胚胎发育是必须的<sup>[23]</sup>. Jin *et al*<sup>[24]</sup>报道, IQGAP2在9种胃癌细胞系中的5个表达缺失, 而且47%的原发性胃癌组织中存在IQGAP2基因的甲基化, 其与IQGAP2蛋白的失表达高度相关, 敲除IQGAP2增加胃癌细胞系的侵袭能力. IQGAP2基因敲除小鼠表现为年龄依赖性的细胞凋亡和HCC发生. 同时, HCC细胞表现为IQGAP1高表达, 膜E-cadherin表达缺失,  $\beta$ -catenin的细胞质转位和激活等. 这一结果表明, IQGAP2可能是一种潜在的抑癌基因, 通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路而促进肝癌的发生发展<sup>[25]</sup>. 尚无IQGAP2在人类肝细胞肝癌中表达情况的相关性报道.

本研究显示, IQGAP2蛋白在两个AFP<sup>+</sup>的肝癌细胞系中高表达, 在几个AFP正常或阴性的肝细胞系不表达, 这一趋势与Brill *et al*报道的mRNA水平检测结果基本一致<sup>[6]</sup>. 免疫荧光染色结果显示, IQGAP2主要定位于细胞质, 伴随部分细胞核染色以及在HepG2中还有明显的核膜和核定位, Hep3B和部分肝组织具有细胞膜定位信号. 已有研究认为, IQGAP2是一种胞质和胞膜定位蛋白质, 尚无细胞核定位的报道. 通过生物信息学预测软件PSORT II分析(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)发现, IQGAP2具有DNA结合模体Leucine zipper pattern和Myb DNA-binding domain repeat signature 1, 是一种潜在的核蛋白<sup>[26]</sup>. NucPred软件(<http://sbcweb.pdc.kth.se/cgi-bin/maccallr/nucpred/single.pl>)分析

结果也同样提示, IQGAP2可能是一种高可信的核蛋白<sup>[27]</sup>. 因而, 核内的IQGAP2可能参与基因的表达调控, 定位于细胞膜的IQGAP2则可能具有与IQGAP1相似的作用, 即影响上皮细胞间的黏附过程, 而胞质内的该蛋白则可能参与多条信号转导通路.

本研究利用Western blot和免疫组织化学染色分析了IQGAP2在肝细胞肝癌组织中的表达. 发现与癌旁正常组织相比, IQGAP2在肝癌组织中表达下调(56.9%, 29/51), 部分病例表达缺失. 这一结果与IQGAP2在胃癌组织中的表达趋势一致, 支持他可能是一种新的抑癌基因. Western blot结果还显示, 随着肿瘤长径的增加, AJCC分期的增高, IQGAP2的正常表达明显降低. 并且, 其表达与血清AFP水平明显负相关, AFP阳性病例表现为更明显的表达下调. 已知, AFP除了结合转运特性以外, 在胚胎期和成人肿瘤发生过程中, 还具有生长分化和细胞凋亡调节作用, 表明他可能是一种癌胚抗原<sup>[28-31]</sup>. 由于IQGAP2是一种潜在的抑癌基因, 因此可能造成了其与AFP的负相关关系. 但是, 免疫组织化学染色分析没有获得相关性结果, 这可能与免疫组化染色技术较Western blot敏感度低、组织芯片取材范围有限、病例数相对较少有关. 此外, 我们发现部分病例的肿瘤和癌旁正常组织IQGAP2表达均为阴性, 导致其整体下调率不高, 这也可能与上述原因有关. 研究结果提示IQGAP2参与正常肝细胞的细胞间通讯、细胞内信号转导与表达调控作用, 可能是一种新的抑癌基因, 对维持肝细胞正常形态与功能具有重要的作用. 因此, IQGAP2表达降低可能与肝细胞肝癌的发生发展相关, 其精确作用机制尚待阐明.

总之, 本研究探讨了IQGAP2在肝细胞肝癌中的表达和亚细胞定位特征, 发现IQGAP2在肝细胞肝癌组织中表达水平降低与肿瘤长径和血清AFP水平相关. IQGAP2可能在肝癌的发生发展过程中发挥重要作用. 该研究为深入理解肝细胞肝癌的癌变机制, 发现新的肿瘤标志分子以及阐明IQGAP2的功能提供借鉴.

#### 4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-687
- 3 He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, Wang J, Chen CS, Chen J, Wildman RP, Klag MJ, Whelton PK. Major causes of death among men

- and women in China. *N Engl J Med* 2005; 353: 1124-1134
- 4 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
- 5 Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 385-390
- 6 Brill S, Li S, Lyman CW, Church DM, Wasmuth JJ, Weissbach L, Bernards A, Snijders AJ. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4869-4878
- 7 Schmidt VA, Scudder L, Devoe CE, Bernards A, Cupit LD, Bahou WF. IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization. *Blood* 2003; 101: 3021-3028
- 8 Chew CS, Okamoto CT, Chen X, Qin HY. IQGAPs are differentially expressed and regulated in polarized gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G376-G387
- 9 Briggs MW, Sacks DB. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 2003; 4: 571-574
- 10 Swart-Mataraza JM, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002; 277: 24753-24763
- 11 Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Kaibuchi K. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* 1998; 281: 832-835
- 12 Li Z, Kim SH, Higgins JM, Brenner MB, Sacks DB. IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. *J Biol Chem* 1999; 274: 37885-37892
- 13 Roy M, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7940-7952
- 14 Roy M, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 17329-17337
- 15 Ren JG, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10465-10469
- 16 Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, Fukai T, Fujimoto M, Patrushev NA, Wang N, Kontos CD, Bloom GS, Alexander RW. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species-dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 2004; 95: 276-283
- 17 Li S, Wang Q, Chakladar A, Bronson RT, Bernards A. Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 697-701
- 18 Sugimoto N, Imoto I, Fukuda Y, Kurihara N, Kuroda S, Tanigami A, Kaibuchi K, Kamiyama R, Inazawa J. IQGAP1, a negative regulator of cell-cell adhesion, is upregulated by gene amplification at 15q26 in gastric cancer cell lines HSC39 and 40A. *J Hum Genet* 2001; 46: 21-25
- 19 Nabeshima K, Shima Y, Inoue T, Koono M. Immunohistochemical analysis of IQGAP1 expression in human colorectal carcinomas: its overexpression in carcinomas and association with invasion fronts. *Cancer Lett* 2002; 176: 101-109
- 20 Jadeski L, Mataraza JM, Jeong HW, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 1008-1017
- 21 Dong P, Nabeshima K, Nishimura N, Kawakami T, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Iwasaki H. Overexpression and diffuse expression pattern of IQGAP1 at invasion fronts are independent prognostic parameters in ovarian carcinomas. *Cancer Lett* 2006; 243: 120-127
- 22 Stockinger W, Zhang SC, Trivedi V, Jarzylo LA, Shieh EC, Lane WS, Castoreno AB, Nohturfft A. Differential requirements for actin polymerization, calmodulin, and Ca<sup>2+</sup> define distinct stages of lysosome/phagosome targeting. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1697-1710
- 23 Yamashiro S, Abe H, Mabuchi I. IQGAP2 is required for the cadherin-mediated cell-to-cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 2007; 308: 485-493
- 24 Jin SH, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Akashi T, Yuasa Y. IQGAP2 inactivation through aberrant promoter methylation and promotion of invasion in gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 1040-1046
- 25 Schmidt VA, Chiariello CS, Capilla E, Miller F, Bahou WF. Development of hepatocellular carcinoma in Iqgap2-deficient mice is IQGAP1 dependent. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 1489-1502
- 26 Horton P, Nakai K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1997; 5: 147-152
- 27 Brameier M, Krings A, MacCallum RM. NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* 2007; 23: 1159-1160
- 28 Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 377-408
- 29 Mizejewski GJ. Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2: 709-735
- 30 Mizejewski GJ. Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet Gynecol Surv* 2003; 58: 804-826
- 31 Terentiev AA, Moldogazieva NT. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry (Mosc)* 2006; 71: 120-132

# 重症急性胰腺炎与胃肠动力障碍的研究进展

何志宇, 陈光远

何志宇, 陈光远, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041  
通讯作者: 陈光远, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院  
中西医结合科. cgy@medmail.com.cn  
电话: 028-81812728  
收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2008-02-30

## Advances in study of severe acute pancreatitis and gastrointestinal dysmotility

Zhi-Yu He, Guang-Yuan Chen

Zhi-Yu He, Guang-Yuan Chen, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Guang-Yuan Chen, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cgy@medmail.com.cn  
Received: 2007-11-15 Revised: 2008-02-30

### Abstract

Gastrointestinal dysmotility often occurs in patients with severe acute pancreatitis. This article reviews the effect of nerve, hormone, inflammatory factors and ischemia-reperfusion injury on gastrointestinal dysmotility. It elucidates that the gastrointestinal dysmotility is significantly relieved after treatment of acute pancreatitis.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Gastrointestinal dysmotility

He ZY, Chen GY. Advances in study of severe acute pancreatitis and gastrointestinal dysmotility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1317-1322

### 摘要

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常伴有胃肠动力障碍。本文就神经、激素、炎症因子、缺血再灌注损伤对胃肠动力的影响的研究进展等方面进行综述, 阐明了改善胃肠动力在SAP治疗中的意义。

关键词: 重症急性胰腺炎; 胃肠动力

何志宇, 陈光远. 重症急性胰腺炎与胃肠动力障碍研究进展. *世*

界华人消化杂志 2008; 16(12): 1317-1322  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1317.asp>

### 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者常伴有胃肠动力障碍, 早期可表现为胃潴留、十二指肠运动迟缓和麻痹性肠梗阻等<sup>[1-2]</sup>。动物实验证实急性坏死性胰腺炎(acute necrosis pancreatitis, ANP)发生胃排空和肠转运明显减慢<sup>[3]</sup>。但相关机制仍不清楚。本文就SAP发生胃肠动力障碍研究进展, 改善胃肠动力对治疗SAP意义进行了探讨。

### 1 SAP胃肠动力障碍机制研究进展

一般说来, 胃肠动力主要受神经和内分泌两方面调节。此外, 炎症状态下免疫系统激活, 释放大量炎症介质参与了胃肠动力障碍的发生、发展过程。缺血、缺氧及缺血再灌注、氧自由基的损伤也使胃肠运动障碍加剧。

#### 1.1 神经系统功能对胃肠运动的影响

1.1.1 肠神经系统: 肠神经系统(enteric nervous system, ENS)是控制与协调胃肠运动、血供、分泌的独立神经系统, 贯穿整个胃肠道, 两个主要的神经丛(黏膜下丛位于固有层中, 肌间神经丛位于纵行肌及环形肌之间)包含约 $10^8$ 个神经元。他有独立的感觉、运动(兴奋与抑制)及中间神经元。包括肾上腺、胆碱能、非肾上腺非胆碱能(non-adrenergic and non-cholinergic, NANC)神经元。反射功能独立于中枢神经之外, 也可以通过传入、传出神经与(central nervous system, CNS)建立联系<sup>[4]</sup>。

近年来较为引人注目的是肽能神经(属非肾上腺非胆碱能)及一氧化氮(NO)的研究<sup>[5]</sup>。特别是NO, 作为一种抑制性NANC神经元的传递介质, 在NO合成酶(nitric oxide synthase, NOS)介导下形成的, 人体胃肠道组织中均有NOS的分布, 在胃排空的肠壁机械感受器和化学感受器的反馈调控中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。NO能神经的紊乱可能造成正常兴奋与抑制的失衡, 导致胃肠动力

### ■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)常伴有胃肠动力障碍, 临床观察发现胃肠功能恢复早的SAP患者, 病情很快得到控制。此前大多数研究多停留在神经、激素水平。胃肠动力主要受神经和内分泌两方面调节。此外, 炎症状态下免疫系统激活, 释放大量炎症介质参与了胃肠动力障碍的发生、发展过程。缺血、缺氧及缺血再灌注、氧自由基的损伤也使胃肠运动障碍加剧。

### ■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

## ■ 研发前沿

近年来,炎症因子与胃肠动力的关系成为研究热点.

异常<sup>[7]</sup>,应用NOS抑制剂可清除压力诱导的胃容受性舒张,说明NO能诱导胃肠道舒张,抑制胃的运动<sup>[8]</sup>.近来的研究还进一步论证了NO在消化间期移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)调控中也起到极其重要作用<sup>[9]</sup>.SAP时胰腺组织周围大量消化酶、血管活性物质、坏死组织及其崩解产物,直接刺激肠系膜根部神经及胃肠道组织,引起水肿、麻痹.胰腺炎相关腹水(pancreatitis associated ascitic fluid, PAAF)注射入健康大鼠24 h后,小肠肌间神经丛和黏膜下层NANC神经元中一氧化氮合酶(nNOS)表达增加、活性增强进而产生大量NO,引起胃肠电生理紊乱,抑制胃肠运动<sup>[10]</sup>.但是NOS抑制剂并不能完全逆转PAAF引起的胃肠动力抑制,推测与NANC能神经释放的另一种抑制神经递质血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)升高有关<sup>[1]</sup>.现已发现神经型的一氧化氮合酶(nNOS)在神经末梢中与VIP共存肌间神经丛和黏膜下神经丛<sup>[11-13]</sup>,有学者认为神经活动中神经末梢释放的NO刺激VIP的释放,表明VIP的释放有赖于NO的形成<sup>[14-16]</sup>.Ljung *et al*认为VIP抑制肠动力作用与NO无关<sup>[17]</sup>.所以共染的意义目前尚不能完全解释.二者对消化道的抑制性调节是各自独立的作用还是互为因果目前还存在分歧.

1.1.2 迷走神经:迷走神经是胃肠道主要外来神经,主要协调ENS功能.SAP时,应急反应明显,表现为交感神经兴奋和迷走神经抑制,导致消化道功能的普遍抑制,运动减弱,分泌、吸收减少.近年来“神经-内分泌”抗炎通路成为研究的热点,其中迷走神经及其递质乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)具有重要的抗炎作用.解除迷走神经抑制,使Ach的合成增多能减轻SAP机体炎性反应<sup>[18-20]</sup>.Monroe *et al*<sup>[21]</sup>发现刺激中枢的迷走神经能减轻胃容量,加速胃排空.

### 1.2 内分泌因素对胃肠运动的影响

1.2.1 胃肠肽对胃肠运动的调节:胃肠肽大约有30多种,主要由肠神经系统、胃肠道内分泌细胞自分泌和旁分泌产生,主要在局部发挥作用,其中胃动素(motilin, MTL),血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP),生长抑素(somatostatin, SS),P物质(substance P, SP)是与胃肠动力密切相关的胃肠激素<sup>[22-23]</sup>.在SAP时,血液中MTL、SP浓度降低,VIP浓度升高.这些激素与胃肠道动力障碍有密切的关系<sup>[22]</sup>.MTL:由小肠上部的Mo细胞释放,研究表明血浆MTL在MMC不同时相呈周期性变化,血浆MTL峰值出

现在MMCIII相<sup>[24-26]</sup>.Jonsson *et al*报道胃动力障碍者胃排空延迟,MMCIII期减少或缺失;同时各时相血中胃动素浓度均低于正常水平,缺乏胃动素分泌高峰<sup>[27]</sup>.给清醒狗局部空肠动脉灌注MTL,可引起MMCIII相收缩,MTL抗血清可阻断这一作用<sup>[28]</sup>;胃壁和十二指肠壁的肌间神经丛内有MTL阳性神经元和神经纤维存在<sup>[29]</sup>.证明MTL是MMC的启动因素.SS:是一种典型的脑肠肽,主要分布于胃、十二指肠、结肠和胰腺,对多种生理功能具有抑制作用,包括:抑制几乎所有生理性内、外分泌反应,抑制胃MMC和胃排空,抑制肠道内容物转运.SS直接引起胃平滑肌细胞的舒张作用很弱,但可以明显抑制五肽胃泌素对胃肌细胞的收缩作用,这种抑制作用不通过cAMP途径,可被生长抑素抗血清所阻断,表明胃平滑肌细胞生长抑素受体的特异性<sup>[30-31]</sup>.Tack *et al*发现十二指肠腔内的SS浓度在MMCIII相达到高峰<sup>[32]</sup>,推测可能是SS通过腔内释放来调节MMC.以往多认为生长抑素类似物-奥曲肽也可使胃肠动力减弱,抑制胃肠蠕动<sup>[31,33-34]</sup>.李立 *et al*临床观察却提示:治疗剂量奥曲肽对SAP患者胃排空无抑制作用,对SAP患者肠蠕动起促进作用.其机制可能是:刺激十二指肠MMC的产生,抑制了VIP的活性,NO排出减少<sup>[35]</sup>.而SS-14引起豚鼠的胃及小肠的环行平滑肌收缩<sup>[36]</sup>.以上研究表明SS对胃肠运动的确切作用有待进一步研究.SP:是兴奋性神经递质之一,可刺激平滑肌收缩,特别是对空肠、回肠和结肠的平滑肌.SP对胃肠道的纵肌和环肌有双重的收缩效应:直接的短时作用和紧接着由胆碱能神经释放Ach引起的长时作用,阿托品可抑制注射SP引起胃体和胃窦收缩,六甲胺加速SP引起的胃窦收缩,并接受迷走神经调控<sup>[37]</sup>.脑室内注射SP能使动物胃肠运动由餐后型变为消化间期型MMC<sup>[38-40]</sup>.Seerden *et al*研究证明SP能促进SAP大鼠小肠平滑肌收缩<sup>[3]</sup>.VIP:主要胰腺、肠道NANC神经元释放,为抑制性神经递质之一,VIP可减慢胃排空,参与结肠扩张和疼痛刺激引起的胃的反射性舒张<sup>[41]</sup>.VIP浓度在500 pmol/(Kg·min)以上可以明显抑制MMC<sup>[17]</sup>.而VIP抗体能阻断电刺激和迷走神经反射所引起的胃肌条收缩.

近10年新发现的胃肠激素,如瘦素(leptin)、饥饿激素(ghrelin)、甘丙素样肽(galanin-like peptide)、增食欲素(orexin).他们的一个共同特点是与摄食及胃肠运动有关,其中瘦素对MMC

II相有重要作用<sup>[42]</sup>. Chey *et al*报道在急性胰腺炎AP的急性期血浆内皮素-1(endothelin; ET-1)升高,可能是肠道动力紊乱的机制之一<sup>[43]</sup>.这些激素与SAP肠动力障碍的关系需要进一步证实.

1.2.2 胃肠肽受体对胃肠动力的影响:胃肠肽作用的靶位是胃肠平滑肌细胞表面的特异性受体.这些受体多属于G蛋白偶联受体族,由一条多肽链组成,有7个跨膜区,一个N端胞外区和一个C端胞质区.受体的重要特征就是高特异地识别和结合胃肠肽,通过不同信号途径进行转录和翻译.受体表达的多少及受体的亲和力大小对胃肠肽发挥生理作用有重要影响.炎症可以改变使胃肠肽受体量的表达及受体亲和力,势必影响胃肠动力.如SS-R(somatostatin receptor)各亚型均和G蛋白偶联<sup>[44-46]</sup>,SS-R3介导胃平滑肌松弛<sup>[47]</sup>,而在肠平滑肌则介导收缩<sup>[44]</sup>.胃肠平滑肌细胞膜上既有兴奋型受体也有抑制型受体,同一细胞上还有同一受体多个亚型的共存现象<sup>[48]</sup>.

最近研究证明,激素作用除了与受体作用外,还通过神经途径起作用.胃动素受体在人十二指肠和结肠肠神经元的广泛表达就是有力的证据<sup>[49]</sup>.激素等体液信号首先作用于迷走神经的MTL受体<sup>[29]</sup>,由迷走传入神经传送到下丘脑进行翻译和整合,然后发出指令,通过迷走传出神经实现对各种生理活动的调节作用.

1.3 缺血、缺氧、缺血再灌注和氧自由基损伤SAP时胃肠道组织水肿、麻痹,肠腔内压升高,肠壁微循环障碍,组织缺血、缺氧.胃肠平滑肌能量生成不足,蠕动减弱;缺血再灌注后,黄嘌呤氧化酶氧化次黄嘌呤产生大量氧自由基,进一步损伤肠壁,加重胃肠运动障碍<sup>[50]</sup>.SAP时系统性炎症反应(systemic inflammatory reaction syndrome, SIRS)明显,中性粒细胞被激活,呼吸爆发后产生大量的活性氧.全身及肠道自由基,加重胃肠组织损伤的免疫功能下降,使肠道细菌容易突破受损的黏膜,形成肠道菌群易位及内毒素血症<sup>[51]</sup>,毒素及代谢产物对肠道的直接损伤导致代谢障碍,平滑肌收缩能力降低.

1.4 炎症因子对胃肠动力的影响 近来发现炎症因子对胃肠动力有重要的影响.白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )可能是通过脂氧化酶引起大鼠胃底松弛<sup>[52]</sup>.第四脑室注射肿瘤坏死因子受体-Fc(TNFR-Fc)能逆转脂多糖内毒素(lipopolysaccharide, LPS)引起的胃肠动力障碍,证明TNF- $\alpha$ 在胃肠动力障碍中起重要介导作

用<sup>[53]</sup>.Sarna *et al*通过人离体结肠进一步研究证实LPS及炎症因子如TNF- $\alpha$ 可激活平滑肌细胞转录因子核因子NF- $\kappa$ B,进而通过NF- $\kappa$ B亚单位p50和p65促进ICAM-1的表达,而抑制平滑肌细胞膜L型Ca<sup>2+</sup>通道1C亚单位表达,从而抑制平滑肌收缩.提示炎症参与了胃肠动力障碍过程.急性胰腺炎特别重症急性胰腺炎,常常伴有严重的炎症反应,从局部炎症反应阶段发展到全身播散的SIRS阶段时,体内炎症细胞活化产生大量炎症介质,同时胰腺无菌坏死和感染也可激活胰腺组织中的巨噬细胞,合成和释放多种细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-8<sup>[56-59]</sup>等,这些细胞因子可能与SAP胃肠动力障碍有关.

另外,神经、内分泌、炎症因子的相互作用:(1)促炎症介质与激素具有双向调节作用,常进行交叉对话,正常情况下,激素与前炎症介质处于恰当的平衡中.他们之间的平衡在炎症状况下被打破,导致激素水平异常,激素与炎症因子比率发生变化,进而产生内分泌的抵抗,势必进一步改变激素水平.同时激素变化也可以改变炎症因子水平<sup>[60]</sup>,如Ghrelin能抑制IL-1的表达而减轻炎症反应,SS能抑制实验性胰腺炎的炎症反应,VIP能抑制巨噬产生IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达,降低实验性胰腺炎胰酶水平、改善胰腺病理损害<sup>[61]</sup>.胃肠激素如SS-R、VIP-R、SP-R等激素受体存在于肥大细胞、单核巨噬细胞等免疫细胞中.SP能刺激巨噬细胞活性,影响细胞因子产生、吞噬功能的增强、溶酶体酶的合成等;还可触发肥大细胞蛋白酶释放和颗粒形成.SS则抑制肥大细胞分泌.VIP能抑制多种细胞因子,如IL-2、IL-4、IL-5、IL-6和INF- $\gamma$ 等的合成与分泌,这些细胞因子主要是由CD4<sup>+</sup>的Th细胞产生<sup>[62]</sup>.VIP可通过激活T细胞受体,降低IL-2 mRNA的转录及其稳定性,使IL-2在mRNA和蛋白质水平下调;而IL-2的降低又可减少T细胞的增殖,继而影响T细胞的功能,使IL-4的合成降低.SP诱导单核细胞IL和TNF的释放,刺激单核细胞TNF- $\alpha$ 的分泌<sup>[63]</sup>.(2)神经和免疫系统之间是密切配合、相互协调的.肠神经不仅支配肌肉、上皮细胞,也调控肥大细胞、浆细胞等免疫细胞和神经内分泌细胞<sup>[64]</sup>.同时神经和免疫系统相互作用的分子基础是两系统共用的一些肽类激素、细胞因子、递质及其受体.这些共用的因子起着双向的信息传递作用.如降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)可能是神经-免疫系统相互调节的介导物质之一<sup>[65]</sup>.迷走

#### ■ 相关报道

Hermann *et al*使用TNFR-Fc第四脑室注射能逆转LPS引起的胃肠动力障碍;Sarna *et al*通过离体研究证实胃肠道炎症可影响平滑肌收缩功能.

### ■应用要点

神经、激素与炎症因子的相互作用对SAP引起的胃肠动力障碍的影响还没有相关研究,加强这方面的研究有助深入了解SAP胃肠动力障碍的机制。

神经-胆碱能抗炎通路能调节炎症反应,减少细胞因子的表达<sup>[20]</sup>。既然神经、胃肠肽、炎症因子之间关系密切,那么他们之间的相互作用就可能影响胃肠动力。但这方面的研究比较少,还不明确他们与胃肠动力之间的具体联系。

## 2 改善胃肠动力对治疗SAP的意义

胃肠道各种功能与胃肠动力密切相关,正常的胃肠动力是维持其他功能的关键。临床观察发现胃肠功能恢复早的SAP患者,病情很快得到控制。改善胃肠动力:可以降低肠腔内压,增加胃肠道供血,改善组织微循环,减轻缺血、缺氧对胃肠壁黏膜的机械性损伤,同时减少了缺血再灌注时产生的大量氧自由基的损伤;可以抑制菌群失调,维持正常的肠道内微生态环境<sup>[66-67]</sup>;保持良好的血液、淋巴循环,促进肠道IgA的合成和S-IgA的释放,黏膜免疫力增强;通过上述机制改善了胃肠道屏障功能,防止了细菌及毒素移位,预防SAP合并的胰腺、胰周感染<sup>[68-70]</sup>。因此改善胃肠动力对SAP有积极的治疗意义<sup>[71]</sup>。

## 3 结论

目前有关SAP发生胃肠动力障碍机制还不明确。由于在基础研究方面取得长足的进步,胃肠动力研究已从器官、组织水平进入到单个细胞和遗传基因的分子阶段,范围涉及神经系统、胃肠肽类激素、受体及受体后转导、炎症因子如TNF- $\alpha$ 、IL-6、LPS、NO等分子对胃肠动力的调节,另外,免疫组化、PCR、Western blot、基因克隆、基因敲除和基因芯片等技术的开发和应用,也为胃肠动力性疾病的深入研究,开辟了新的途径<sup>[72]</sup>。也为SAP胃肠动力障碍研究提供了丰富的理论基础和科学的研究手段。相信这方面的研究会越来越深入,并深入揭示SAP胃肠动力障碍的本质。

另外,中医药在促进胃肠动力方面疗效确切,有很多促进胃肠动力的经典方剂如大承气汤、柴芩承气汤、清胰汤等<sup>[73-74]</sup>。清胰汤能提高AP患者血清MTL水平,改善胃肠动力,清胰汤中白芍、木香、延胡索和大黄对结肠平滑肌有直接兴奋作用,其中白芍最为显著<sup>[74]</sup>。但具体机制未能明确阐述,加强这方面的研究有助于让中医药走向世界,同时提高对SAP的治疗效果。

## 4 参考文献

- 1 Wang X, Gong Z, Wu K, Wang B, Yuang Y. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute

- 2 pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 57-62
- 3 Uhl W, Isenmann R, Curti G, Vogel R, Beger HG, Buchler MW. Influence of etiology on the course and outcome of acute pancreatitis. *Pancreas* 1996; 13: 335-343
- 4 Seerden TC, De Winter BY, Van Den Bossche RM, Herman AG, Pelckmans PA, De Man JG. Regional differences in gastrointestinal motility disturbances during acute necrotising pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 671-679
- 5 Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 102-110
- 6 Wiedner EB, Bao X, Altschuler SM. Localization of nitric oxide synthase in the brain stem neural circuit controlling esophageal peristalsis in rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 367-375
- 7 Jing H, Lin KW. Inhibition of gastric myoelectric activity and gastric motility induced by microinjection of substance P into caudate nucleus in mouse. *Sheng Li Xue Bao* 1994; 46: 17-22
- 8 王晓,尹朝礼,胡道松,茹立强. 肠动力疾病结肠壁内NOS、AChE及SP阳性神经的分布. *中华消化杂志* 1997; 17: 195-198
- 9 黄颖秋,张德中,萧树东. 一氧化氮与消化道动力. *国外医学·消化系疾病分册* 1997; 17: 23-27
- 10 Russo A, Fraser R, Adachi K, Horowitz M, Boeckxstaens G. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *Gut* 1999; 44: 72-76
- 11 刘殿刚,孙家邦,张淑文,李非,朱斌,王伟,曲瑞瑶. 胰腺炎相关腹水对空肠运动和肠组织含nNOS神经的影响. *首都医科大学学报* 2005; 26: 482-485
- 12 Singaram C, Sengupta A, Sweet MA, Sugarbaker DJ, Goyal RK. Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. *Gut* 1994; 35: 1690-1696
- 13 施斌,张忠兵. 血管活性肠肽与消化道运动. *国外医学·消化系疾病分册* 2000; 20: 146-149
- 14 Grider JR, Jin JG. Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience* 1993; 54: 521-526
- 15 吴红金,林传友,曹福元,胡道松,殷光甫,茹立强. 大鼠肠道内NOS与AChE、VIP阳性神经元的分布关系研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2000; 9: 187-190
- 16 Grider JR. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol* 1993; 264: G334-G340
- 17 陆英杰,连至诚. 胃肠激素对胃肠动力的影响. *免疫学杂志* 2006; 22: 94-96
- 18 Ljung T, Hellstrom PM. Vasoactive intestinal peptide suppresses migrating myoelectric complex of rat small intestine independent of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 1999; 165: 225-231
- 19 Tracey KJ, Czura CJ, Ivanova S. Mind over immunity. *FASEB J* 2001; 15: 1575-1576
- 20 Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci* 2000; 85: 141-147
- 21 薛平,黄宗文,张鸿彦,夏庆,李永红,王忠朝,游真,郭佳. 柴芩承气汤对重症急性胰腺炎大鼠胆碱能抗炎通路的影响. *四川大学学报(医学版)* 2006; 37: 66-68
- 22 Monroe MJ, Hornby PJ, Partosoedarso ER. Central vagal stimulation evokes gastric volume changes in mice: a novel technique using a miniaturized

- barostat. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 5-11
- 22 沈晓燕, 沈卫星. 大黄治疗急性胰腺炎作用机理的实验研究. *吉林中医药* 2002; 22: 55-56
- 23 杨正安, 陆宏伟. 大黄对重症急性胰腺炎的治疗价值研究. *中国急救医学* 2001; 21: 717
- 24 周吕. 消化间期移行性复合运动的重要性及其临床意义. *基础医学与临床* 1999; 19: 97-101
- 25 张建忠, 王雁, 袁申元. 消化间期移行性复合运动的发生机制. *胃肠病学与肝病学杂志* 1999; 8: 30-32
- 26 Siadati M, Sarr MG. Role of extrinsic innervation in release of motilin and patterns of upper gut canine motility. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 363-372
- 27 Jonsson BH, Uvnas-Moberg K, Theorell T, Gotthard R. Gastrin, cholecystokinin, and somatostatin in a laboratory experiment of patients with functional dyspepsia. *Psychosom Med* 1998; 60: 331-337
- 28 周吕, 王礼建, 云天佑, 王玲. 电针胃经穴对狗胃肠移行性复合运动及脑肠肽释放的作用. *科学通报* 2000; 45: 2419-2426
- 29 柳力公, 周吕, 王玲. 肠神经系统脑肠肽神经元的免疫组化研究. *基础医学与临床* 2003; 23: 348-349
- 30 秦新裕, 雷勇. 胃肠肽类激素与胃肠动力. *中国实用外科杂志* 2001; 21: 329-331
- 31 王文颖, 周吕, 郝维, 罗洁新. 胞内cAMP在促胰液素和生长抑素引起胃平滑肌细胞舒张中的作用. *基础医学与临床* 1996; 16: 44-48
- 32 Tack J, Coulie B, Wilmer A, Peeters T, Janssens J. Actions of the 5-hydroxytryptamine 1 receptor agonist sumatriptan on interdigestive gastrointestinal motility in man. *Gut* 1998; 42: 36-41
- 33 张宗英, 侯振江, 郭金英. 胃肠激素及临床应用. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 447-448
- 34 姜若兰. 胃肠激素与胃肠运动. *中华消化杂志* 1996; 16: 353-355
- 35 李立, 董齐, 崔建春, 刘承训, 戴显伟, 邱芳. 奥曲肽影响重症急性胰腺炎胃肠动力的临床观察. *临床荟萃* 2002; 17: 6
- 36 Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* 1996; 271: 23458-23463
- 37 周吕. 肠神经系统脑肠肽. *中华消化杂志* 1996; 16: 287-289
- 38 Shibata C, Sasaki I, Naito H, Ohtani N, Matsuno S, Mizumoto A, Iwanaga Y, Itoh Z. Effects of substance P on gastric motility differ depending on the sites and vagal innervation in conscious dogs. *Tohoku J Exp Med* 1994; 174: 119-128
- 39 万小平, 张建忠, 陈波, 丁燕, 张彤彦, 袁申元, 王凝, 王雁. 幽门螺杆菌感染对消化性溃疡患者胃肠动力及胃肠激素的影响. *基础医学与临床* 2001; 21: 347-350
- 40 Tache Y, Garrick T, Raybould H. Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function. *Gastroenterology* 1990; 98: 517-528
- 41 Bojo L, Lefebvre RA, Nelligard P, Cassuto J. Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in gastric reflex relaxation. *Eur J Pharmacol* 1993; 236: 443-448
- 42 周吕. 胃肠激素与胃肠动力. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 733-736
- 43 Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1499-1506
- 44 Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* 1996; 271: 23458-23463
- 45 Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchysbyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci* 1995; 57: 1249-1265
- 46 Reisine T. Somatostatin receptors. *Am J Physiol* 1995; 269: G813-G820
- 47 Gu ZF, Corleto VD, Mantey SA, Coy DH, Maton PN, Jensi RT. Somatostatin receptor subtype 3 mediates the inhibitory action of somatostatin on gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995; 268: G739-G748
- 48 刘凯, 齐清会. 胃肠肽受体及受体后信号传导与胃肠动力. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1445-1449
- 49 Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R, Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LH, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 1999; 284: 2184-2188
- 50 Gue M, Junien JL, Bueno L. Conditioned emotional response in rats enhances colonic motility through the central release of corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology* 1991; 100: 964-970
- 51 吴承堂, 黎洁良. 急性坏死性胰腺炎并发感染的机理研究. *中华外科杂志* 1998; 36: 230-233
- 52 Montuschi P, Tringali G, Parente L, Preziosi P, Navarra P. Interleukin-1 beta- and tumour-necrosis-factor-induced inhibition of rat gastric fundus motility in vitro. *Pharmacol Res* 1994; 30: 25-33
- 53 Hermann GE, Tovar CA, Rogers RC. LPS-induced suppression of gastric motility relieved by TNFR: Fc construct in dorsal vagal complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G634-G639
- 54 Pazdrak K, Shi XZ, Sarna SK. TNFalpha suppresses human colonic circular smooth muscle cell contractility by SP1- and NF-kappaB-mediated induction of ICAM-1. *Gastroenterology* 2004; 127: 1096-1109
- 55 Shi XZ, Pazdrak K, Saada N, Dai B, Palade P, Sarna SK. Negative transcriptional regulation of human colonic smooth muscle Cav1.2 channels by p50 and p65 subunits of nuclear factor-kappaB. *Gastroenterology* 2005; 129: 1518-1532
- 56 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
- 57 Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 522-530
- 58 Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993; 34: 41-45
- 59 Gross V, Andreesen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, Farthmann EH, Scholmerich J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 200-203
- 60 Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun* 2007;

#### 同行评价

本文就重症急性胰腺炎与胃肠动力障碍研究进展进行综述, 具有一定的前沿性。

- 21: 384-392
- 61 Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H. VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* 2005; 30: 62-70
- 62 徐伟, 赵亚华, 孔洁. 血管活性肠肽研究进展. *药物生物技术* 2002; 9: 364-368
- 63 李艳梅, 黄裕新. 脑肠肽及细胞因子在针刺调控胃肠免疫机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 329-332
- 64 王歧宏, 郑珊. 肠神经系统与先天性肛肠畸形. *临床小儿外科杂志* 2004; 3: 363-365
- 65 王宪. 降钙素基因相关肽是神经-免疫系统相互调节的介导物质之一. *北京医科大学学报* 1999; 31: 485-488
- 66 Chia YW, Lee TK, Kour NW, Tung KH, Tan ES. Microchip implants on the anterior sacral roots in patients with spinal trauma: does it improve bowel function? *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 690-694
- 67 Speakman CT, Madden MV, Nicholls RJ, Kamm MA. Lateral ligament division during rectopexy causes constipation but prevents recurrence: results of a prospective randomized study. *Br J Surg* 1991; 78: 1431-1433
- 68 钱立元, 蔡立峰. 改善胃肠动力在重症急性胰腺炎治疗中的作用. *肝胆外科杂志* 1999; 7: 336-337
- 69 黎介寿. 肠功能障碍. *中国胃肠外科杂志* 1998; 1: 1-3
- 70 Isenmann R, Rau B, Beger HG. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1999; 86: 1020-1024
- 71 李立, 董齐, 戴显伟. 改善胃肠动力对重症急性胰腺炎病情转归的影响. *中国现代普通外科进展* 2001; 4: 78, 81
- 72 秦新裕, 雷勇. 胃肠动力的研究现状和进展. *中国实用外科杂志* 2002; 22: 27-28
- 73 裴红红, 封英群, 杨正安, 李小珍, 刘瑛. 大黄对重症胰腺炎胃肠激素的影响. *中国急救医学* 2004; 24: 523
- 74 魏睦新, 李建军, 汪幼学, 轩原清史. 急性胰腺炎大鼠清胰汤治疗的肠动力作用机制. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1369-1372

编辑 李军亮 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 •

## 世界华人消化杂志参考文献要求

**本刊讯** 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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.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SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).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.(常务副总编辑:张海宁 2008-04-28)

# 持续血液净化疗法在重症急性胰腺炎中的作用

郭佳, 黄宗文

郭佳, 黄宗文, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041  
通讯作者: 黄宗文, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院  
中西医结合科, huangzongwen@medmail.com.cn  
收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2008-02-23

## Effect of continuous blood purification on serve acute pancreatitis

Jia Guo, Zong-Wen Huang

Jia Guo, Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province China

Correspondence to: Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. huangzongwen@medmail.com.cn  
Received: 2007-11-15 Revised: 2008-02-23

## Abstract

Serve acute pancreatitis (SAP) is a common acute abdomen characterized by sudden occurrence, complications and a high mortality rate. The mortality rate of SAP treated in our hospital with combined traditional Chinese and Western medicine over the past 20 years has decreased to 10.77%, which is the lowest in our country. However, no breakthrough has been made in decreasing the death rate of SAP. Continuous blood purification is a series of treatment modality which can slowly and continuously remove water and solute from the body. It is one of the achievements made in blood purification over the past 20 years and the important advance made in emergency medicine in the past few years. Continuous blood purification is used not only in treatment of acute and chronic renal failure but also in treatment of non-renal diseases. This paper describes the pathogenesis of acute pancreatitis and the therapeutic effect of continuous blood purification and its mechanism.

Key Words: Serve acute pancreatitis; Continuous blood purification

Guo J, Huang ZW. Effect of continuous blood purification

on serve acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1323-1326

## 摘要

重症急性胰腺炎(serve acute pancreatitis, SAP)是常见的急腹症,其发病急、并发症高、病死率高。我院中西医结合治疗SAP二十多年,死亡率降到10.77%,居全国最低,但近几年死亡率没有突破性进展。连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)是指所有缓慢、连续清除体内水和溶质的一组治疗方式。这是近20年来血液净化领域的新成就之一,也是近年来急救医学的重要进展。他不但应用在急慢性肾功能衰竭患者的治疗中,而且已被广泛地应用于非肾脏疾患。本文将总结急性胰腺炎发病机制及连续性血液净化对该机制的治疗作用和机制。

关键词: 重症急性胰腺炎; 连续性血液净化法

郭佳, 黄宗文. 持续血液净化疗法在重症急性胰腺炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1323-1326  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1323.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(serve acute pancreatitis, SAP)是常见的急腹症,其发病急、并发症高、病死率高。我院中西医结合治疗SAP 20多年,死亡率降到10.77%,居全国最低,但近几年死亡率没有突破性进展。连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)是指所有缓慢、连续清除体内水和溶质的一组治疗方式。自从1977年, Kramer提出了连续动静脉血液滤过(CAVH)概念后, 1979年Bam-bauer-Bichoff又提出了采用静脉-静脉血管通路(CVVH)。此后,为提高对溶质的清除率,把血滤的对流原理与血透的弥散原理相结合。Kunitomo、Geronemus和Schneider *et al*相继提出了连续动-静脉血液透析(CAVHD),连续动-静脉血液透析滤过(CAVHDF)。以后又发展了连续静-静脉血液透析(CHHVD)、连续静-静脉血液透析滤过(CVVHDF)、动-静脉缓

## ■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是常见的急腹症,其发病急、并发症多、病死率高。但近几年死亡率没有突破性进展。连续性血液净化(CBP)是近20年来血液净化领域的新成就之一,也是近年来急救医学的重要进展。其不但应用在急慢性肾功能衰竭患者的治疗中,而且已被广泛地应用于非肾脏疾患,特别是在一些危重病领域的应用越来越受到人们的关注正逐渐成为抢救危重患者的一种有效手段。

## ■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

## ■应用要点

本文总结胰腺炎发病机制及CBP治疗急性胰腺炎的可能机制,为深入研究提供一定方向。

慢连续超滤(AVSCUF)、静-静脉缓慢连续超滤(VVSCUF)及连续高通量血液滤过(CHVHF),这些方式形成了系列的CBP治疗系统<sup>[1]</sup>。这是近20年来血液净化领域的新成就之一,也是近年来急救医学的重要进展。他不但应用在急慢性肾功能衰竭患者的治疗中,而且已被广泛地应用于非肾脏疾患,特别是在一些危重病领域的应用越来越受到人们的关注正逐渐成为抢救危重患者的一种有效手段<sup>[2]</sup>。目前不少研究报告<sup>[3,4]</sup>常规治疗加CBP治疗重症急性胰腺炎,那他治疗前景在哪里呢?

## 1 急性胰腺炎发病机制

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由胰酶激活后引起胰腺组织自身消化所致的急性化学性炎症。实践及研究表明, AP的发病机制是一个复杂的、多因素参与的病理生理过程,至今尚未完全阐明。早期提出的“自身消化学说”<sup>[5]</sup>指无论是胆源性的、胆汁逆流、胰管内高压或酒精性胰腺炎等病因的,都有嗜中性白细胞激活。在胰液排放受阻、胰腺缺血或大量饮酒等致病因素的作用下,胰蛋白酶大量激活,还激活糜蛋白酶、弹力蛋白酶、舒血管素和磷脂酶A2等,造成胰腺自身消化,后者尤起关键性作用,他可使胆汁中的卵磷脂和脑磷脂变为具有细胞毒性的溶血卵磷脂和脑磷脂,导致胰腺组织破坏。但传统的“自身消化学说”已不能全面阐明急性胰腺炎的发病机制及其复杂的进程。近年的研究提出了许多新学说<sup>[6]</sup>,以炎症介质学说尤为突出。他指出胰腺腺泡受损时活性胰酶释放和单核巨噬细胞的激活,刺激中性粒细胞产生大量炎症介质,这些炎症介质可以使胰腺血管通透性增高和微循环障碍,导致胰腺炎症、坏死,发生肠道屏障功能失调、内毒素血症,内毒素再次激活巨噬细胞、中性粒细胞释放大量炎症介质,形成恶性循环,激发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)<sup>[7]</sup>,致使多脏器衰竭(multiple organ failure, MOF)。参与AP发生发展过程中的主要炎症介质有:肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白介素(interleukin, IL)、氧自由基、血小板活化因子、前列腺素、白细胞三烯、一氧化氮、血栓素等。研究较多的有TNF、IL、血小板活化因子、血栓素和一氧化氮等。其中TNF- $\alpha$ 、IL-1是AP发展过程中最为重要的细胞因子,能作为始发因子诱导其他炎症介质的产生,这对认识该疾病的发展过程和指

导临床治疗起着重要的作用。

## 2 CBP治疗重症急性胰腺炎的可能机制

2.1 清除细胞因子、内毒素和炎症介质 1990年代初,人们在动物实验研究中发现导致胰腺炎加重和其他脏器受损的主要原因是过度炎症反应,而其本质是由炎症介质瀑布样反应引起复杂的、相互关联的炎性介质体系。而他的启动是由胰腺组织内单核-巨噬细胞系统被激活后释放的促炎细胞因子开始的,其中TNF- $\alpha$ 、IL-1是早期启动炎症反应的起始因子。而CBP可通过合成膜纤维的吸附、对流、弥散、超滤和减少介质生成等机制使循环血内的细胞因子和炎症介质浓度下降。为机体主动平衡其体内和靶器官组织细胞中的细胞因子、炎症介质和各种其他体液因子创造条件<sup>[8]</sup>。季大玺 *et al*<sup>[9]</sup>通过3年的时间发现CBP可以显著降低猪血清TNF- $\alpha$ 、磷脂酶、激肽水平,能降低TNF- $\alpha$ 的早期高峰水平,预防脓毒症相关的免疫麻痹状态,改善单核细胞表MHC-II和CD14表达被抑制的现象,多形核白细胞的呼吸爆发和吞噬能力也明显改善,减少了细菌易位和内毒素血症的发生率,提高急性胰腺炎猪模型的生存时间。国内不少研究<sup>[10-13]</sup>也提示CBP可以清除SAP时周围血清中的TNF- $\alpha$ 和IL-1等炎症介质,显著改善预后。内毒素属高分子物质,单纯透析不能有效清除。不少研究将多黏菌素B、活性炭或抗脂多糖抗体结合在血滤器表面,使循环血往复通过滤器而吸附清除内毒素。Ikeda<sup>[14]</sup>实验证明,多黏菌素B多化合价纤维(PMX-F)可吸附内毒素。

2.2 调整容量负荷和维持酸碱电解质等内环境稳定 CBP是连续、缓慢、等渗地清除水分和溶质,能不断的调节体液平衡,清除过多的体液量,也能增加不足的液体量,更符合生理状态。等渗的超滤可以有利于血浆的再充盈,肾素-血管紧张素系统稳定和细胞外液渗透压稳定。因此能较好的维持液体平衡和血液动力学稳定<sup>[15-18]</sup>。重症急性胰腺炎患者常常存在电解质紊乱和酸碱失衡,而常用的内科方法有以下不足<sup>[19]</sup>:(1)可能纠正的效果不理想;(2)可能出现矫枉过正的情况;(3)纠正速度无法控制。CRRT时根据患者电解质和血气分析情况,配制个体化置换液,可较好地解决水、电解质<sup>[20-21]</sup>和酸碱平衡等内环境紊乱问题。重症急性胰腺炎患者常需胃肠外高营养,CBP可以清除因静脉营养输入的多余液体,为营养支持提供条件。CBP可以不

断的清除体内的代谢产物, 使代谢产物清除更彻底<sup>[22]</sup>.

**2.3 改善组织氧代谢** SAP发病早期可以出现肺、肾、肝和炎性细胞浸润等组织学改变, “第三间隙异常”引起组织间隙水肿, 加重器官功能损害. 通过清除第三间隙过多积液, 改善微循环和实质细胞携氧能力, 同时可能清除了抑制组织细胞携氧介质, 改善组织的氧利用<sup>[18]</sup>. 另外CBP可以使能量摄取效率提高. 有研究<sup>[8]</sup>显示CBP治疗组与对照组在接受静脉营养时, 能量摄入消耗率分别为73.3%±14.7%和111.2%±16.3%( $P<0.05$ ). 付荣国 *et al*<sup>[23]</sup>报道血液透析加血液透析滤过能明显改善患者的透析充分性和营养状态.

**2.4 改善各脏器功能** CBP能有效清除循环中心肌抑制因子, 使Staling曲线恢复正常, 改善心肌功能. CBP可以清除某些影响血管舒缩功能及血管内皮细胞的毒素及炎症介质, 如NO、TNF- $\alpha$ 等. 王浩 *et al*<sup>[24]</sup>报道CBP能明显纠正胰腺炎引起的低血压( $P<0.01$ ). 同时出现的高排低阻型循环障碍也得到改善, 表现在限制心排血量的过分增高、减少全身血管阻力的下降以及氧摄取率的提高. 万建新 *et al*<sup>[25]</sup>报道在CRRT治疗中, 患者心血管功能稳定, 血液滤过后患者的平均动脉压、心脏指数、心输出量均会升高, 平均肺动脉压降低, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>上升, 动脉血氧分压得到改善. Ronco *et al*<sup>[26]</sup>认为CBP还有助于清除肺间质中过多的水分, 并可提高动脉血氧分压, 减少CO<sub>2</sub>潴留, 改善肺功能. Su *et al*<sup>[27]</sup>用急性肺损伤模型狗进行的研究也证实, 血液滤过可降低血浆促炎细胞因子的浓度, 减轻肺部局部炎症反应, 降低肺毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞的通透性, 缓解肺水肿, 改善心肺功能. 国内不少学者<sup>[28-30]</sup>研究也发现CBP可以改善急性呼吸窘迫综合征, 提高血氧饱和度. 另外体外循环所致的低体温可降低氧耗和气体交换, 减少CO<sub>2</sub>的产生, 以避免由换气装置导致的肺损伤. 患者发热、心动过速、呼吸急促和神志异常、腹痛腹胀等症状也可以明显改善<sup>[31-37]</sup>. 另外对肝肾功能也有改善作用<sup>[38]</sup>.

**2.5 改善免疫功能** 余晨 *et al*<sup>[39]</sup>观察了CBP对SAP患者机体免疫功能的影响, 结果证明CBP能明显改善SAP患者的单核细胞功能, 重建机体免疫系统的内稳状态. 季大玺 *et al*<sup>[9]</sup>研究发现CBP能明显改善SAP免疫调节功能紊乱, 重建机体免疫系统内稳状态, CBP疗效机制已不局限于“清除细

胞因子效应”, 而是在调节免疫功能失常中起重要作用<sup>[40]</sup>.

### 3 结论

随着SAP研究的深入和血液净化技术的发展, 已经有多种血液净化技术用于SAP的治疗, 并取得了一定的疗效. 但是, (1)血液净化治疗时机如何选择尚无定论, 目前倾向于早期连续性高容量血滤<sup>[41]</sup>. 但毛恩强 *et al*<sup>[42]</sup>认为连续性血滤并不能改善SAP患者的预后, 提出早期(发病后72 h内)短时的血滤过和暴发性胰腺炎急诊手术引流腹腔、后腹膜加持续血液液滤过可提高总体生存率. 王冰 *et al*<sup>[43]</sup>也指出早期应用CBP可以降低创伤引起的血清IL-6及肺组织IL-6 mRNA表达升高, 并使淋巴细胞凋亡率下降, 降低肺衰竭发生率. 因此采用何种方式血滤, 血滤持续时间的长短, 值得进一步研究; (2)适合的置换液剂量尚未统一, 王质刚<sup>[44]</sup>提出置换量至少为75 L/d, 重症可达10 075 L/d; (3)CBP疗效的评估, 目前缺乏大规模、多中心、前瞻性的临床验证, CBP对预后的影响还需探索. 因此需通过严格设计的动物实验及临床研究, 才能证实和进一步完善CBP对SAP的治疗.

由于SAP发病原因多样, 病理机制复杂, 病情变化多端, 目前任何一种治疗都不能完全解决SAP治疗这个医学难题, 血液净化也不例外. 多种方法联合的综合治疗是目前SAP治疗的趋势. 虽然血液净化疗法治疗SAP还有许多问题有待进一步研究, 但相信随着血液净化技术的不断完善发展, 其必将对攻克SAP这个世界性医学难题发挥重要作用.

### 4 参考文献

- 1 史玉波, 司忠义. 连续性血液净化在危重病治疗中的临床应用进展. 中国心血管病研究 2007; 5: 615-617
- 2 赵钗, 胡振杰, 武新慧. 连续性血液净化救治多器官功能障碍综合征10例分析. 中国综合临床 2005; 21: 157-158
- 3 杨斌, 李莎, 王平. CVVH治疗重症急性胰腺炎疗效观察. 现代临床医学 2007; 33: 267-269
- 4 刘艳红, 王昱, 邓莹沛. 连续性血液净化在多脏器衰竭中的应用评价. 中国基层医药 2006; 13: 1286-1288
- 5 陈其奎. 急性胰腺炎的病因和发病机制. 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 160-162
- 6 姚玮艳, 袁耀宗. 急性胰腺炎发病机制的新进展. 现代实用医学 2005; 17: 525-527
- 7 李文龙, 苏纪荣. 急性胰腺炎发病机制研究进展. 基层医学论坛 2007; 11: 749-751
- 8 陈贤楠, 沈颖. 血液净化疗法对多器官功能障碍综合征的治疗作用. 中国实用儿科杂志 2004; 19: 513-515
- 9 季大玺, 龚德华. 连续性血液净化在重症急性胰腺炎中的应用. 肾脏病与透析肾移植杂志 2003; 12:

### ■名词解释

连续性血液净化(CBP): 是指所有缓慢、连续清除体内水和溶质的一组治疗方式. 其包括连续动静脉血液滤过(CAVH)、静脉-静脉血管通路(CVVH)、连续动-静脉血液透析(CAVHD)、连续动-静脉血液透析滤过(CAVHDF)、连续静-静脉血液透析(CHHVD)、连续静-静脉血液透析滤过(CVVHDF)、动-静脉缓慢连续超滤(AVSCUF)、静-静脉缓慢连续超滤(VVSCUF)和连续高通量血液滤过(CHVHF).

### ■同行评价

连续性血液净化是治疗重症急性胰腺炎的一种新的有效方法,有必要深入研究其可能作用机制,本文选题准确,论据充分,具有较强的临床参考价值。

- 181-185
- 28 宋雪霞,王英.连续性血液净化在重症急性胰腺炎治疗中的应用.右江民族医学院学报 2007; 29: 177-178
- 29 陈嘉屿,张方信,吴红梅,刘丽华,赵丽.连续血液滤过对重症急性胰腺炎的治疗作用.第四军医大学学报 2006; 27: 1496-1498
- 30 彭玥,杨明施,欧好.联合早期短时血液滤过治疗重症急性胰腺炎并发急性肺损伤临床分析.医学研究杂志 2007; 36: 36-38
- 31 李维勤,季大玺,全竹富,王浩,龚德华,何长生,谢红浪,虞文魁,叶向红,刘芸,汪志明,赵允召,李为苏,李宁,黎介寿.持续高流量血液滤过对重症急性胰腺炎伴多器官功能障碍综合征的治疗作用.中国实用外科杂志 2003; 23: 549-551
- 32 张奕威,林志滔,苏月南.连续性血液滤过在全身炎症反应综合征中的应用.广东医学院学报 2006; 24: 360-361
- 33 杨朝晖.连续性血液滤过在全身炎症反应综合征治疗中的应用.中国医学杂志 2006; 8: 365-366
- 34 陈玮玲,蔡迅,黄成文,黄仲良,刘滢,钟家浩.连续性血液滤过治疗多器官功能障碍综合征的疗效观察.海南医学 2006; 17: 8-9
- 35 阳素景,谢建云,龙玉,彭晖,王海燕,谭文保,江平,龙华,张云秀,王莉清.血液灌流联合连续性血液滤过救治多器官功能障碍综合征15例疗效观察.现代医药卫生 2007; 23: 3408
- 36 王小毅,谭金祥,任国胜.血液滤过治疗重症急性胰腺炎的疗效观察.重庆医学 2005; 34: 1823-1824
- 37 杨自力,林材元,吴恒义,白涛.血液滤过治疗重症胰腺炎全身炎症反应的效果.广东医学 2006; 27: 1541-1542
- 38 于长青,林洪丽,王可平,杭宏东,谢华,王莉莉.连续性静脉-静脉血液滤过治疗多器官功能障碍综合征的临床研究.中国实用内科杂志 2005; 25: 342-344
- 39 余晨,刘志红,郭啸华,陈朝红,季大玺,黎磊石.连续性血液净化治疗全身炎症反应综合征及脓毒症对机体免疫功能的影响.肾脏病与透析肾移植杂志 2003; 12: 2
- 40 李宁,虞文魁.连续血滤在重症胰腺炎治疗中的作用.肝胆外科杂志 2006; 14: 164-165
- 41 李振江,陈威,徐月清,王汉民.重症急性胰腺炎患者HV-CVVH清除细胞因子的作用.第四军医大学学报 2004; 25: 846-848
- 42 毛恩强,汤耀卿,张圣道.进一步改善重症急性胰腺炎预后的探讨.中国实用外科杂志 2003; 23: 50-52
- 43 王冰,方国恩,满晓波,杜成辉.早期高容量血液滤过后多器官功能障碍综合征猪血清IL-6浓度及肺IL-6 mRNA表达的变化及意义.第二军医大学学报 2006; 27: 961-964
- 44 王质刚.血液净化时机的选择.实用医院临床杂志 2005; 2: 5-7
- 10 燕晓雯,李维勤,王浩,张震环,黎介寿,李宁.持续高流量血液滤过对重症急性胰腺炎猪炎症反应的影响.中国危重病急救医学 2006; 18: 165-168
- 11 张帆,郭学刚,董树强,罗志刚.持续性高流量血液滤过治疗重症急性胰腺炎并肺损伤18例.第四军医大学学报 2006; 27: 916
- 12 段兴.床旁血液滤过治疗重症急性胰腺炎18例疗效观察.中国中西医结合肾病杂志 2006; 7: 593-594
- 13 杨炯,方国恩,毕建威.高容量血液滤过重促炎与抗炎平衡在多器官功能障碍防治中的意义.东南国防医药 2006; 8: 423-426
- 14 Ikeda T. Hemoadsorption in critical care. *Ther Apher* 2002; 6: 189-192
- 15 雷李美,楼天正,颜碧清,夏淑娇.连续性静脉-静脉血液滤过在多器官功能障碍综合征中的应用.现代中西医结合杂志 2006; 15: 1291
- 16 祝伊琳,陈江华.连续性血液净化治疗急性重症胰腺炎的进展.国际移植与血液净化杂志 2007; 5: 1-4
- 17 王建文,彭佑铭,陈星,吴鸿.连续性血液透析滤过在MODS患者治疗中的临床疗效.中国血液净化 2005; 4: 491-493
- 18 谢长江,刘卫江,罗辉遇,熊旭明,李昭骥.连续血液净化对MODS病人的各器官功能的影响.广西医学院学报 2007; 35: 49-51
- 19 付平,唐万欣,崔天蕾.连续性肾脏替代治疗的临床应用进展.中国实用内科杂志 2006; 26: 411-413
- 20 沙玉霞,鱼惠霞.连续静-静脉血液滤过对多器官功能障碍综合征伴高血钾的治疗效果.宁夏医学杂志 2006; 28: 691
- 21 江建强,马国英.血液净化治疗多器官功能障碍综合征.中国危重病急救医学 2006; 18: 245
- 22 刘敏,林熙辉,孙红艳.血液净化治疗的特征及体会.医疗装备 2006; 2: 39-40
- 23 付荣国,桂保松,王莉,李荣,郭蕊军,张雅娟.不同血液净化方式透析效果及对营养状态的影响.西安交通大学学报(医学版) 2006; 27: 414-416
- 24 王浩,张震寰,燕晓雯,李维勤,全竹富,李宁,黎介寿.持续血液滤过对重症急性胰腺炎血流动力学和氧代谢影响的实验研究.肠内与肠外营养 2005; 12: 13-19
- 25 万建新,高丽真,郭淑霞,林建东.连续性肾脏替代治疗在重症急性胰腺炎并发多器官功能障碍综合征中的应用.中国血液净化 2003; 2: 128-131
- 26 Ronco C, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, Bellomo R, De Nitti C, Inguaggiato P, Tetta C. Adsorption in sepsis. *Kidney Int Suppl* 2000; 76: S148-S155
- 27 Su X, Bai C, Hong Q, Zhu D, He L, Wu J, Ding F, Fang X, Matthay MA. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury. *Intensive Care Med* 2003;

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 •

## 世界华人消化杂志 2006 年检索指标及排名

本刊讯 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.(常务副总编辑:张海宁 2008-04-28)

# 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞凋亡调控机制的研究进展

陈少东, 胡义扬

陈少东, 胡义扬, 上海中医药大学附属曙光医院 上海中医药大学肝病研究所 上海市 201203  
陈少东, 厦门大学医学院 福建省厦门市 361005  
国家自然科学基金资助项目, No. 30672635  
上海市教委重点学科建设资助项目, No. Y0302  
作者贡献分布: 陈少东与胡义扬对此文所作贡献均等。  
通讯作者: 胡义扬, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号, 上海中医药大学附属曙光医院; 上海中医药大学肝病研究所. yyhu@citiz.net  
收稿日期: 2007-12-17 修回日期: 2008-03-09

## Advances in regulation mechanism of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease

Shao-Dong Chen, Yi-Yang Hu

Chen Shao-Dong, Hu Yi-Yang, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Liver Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672635, and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0302

Correspondence to: Yi-Yang Hu, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Liver Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 528 Zhangheng Road, Pudongxin District, Shanghai 201203, China. yyhu@citiz.net

Received: 2007-12-17 Revised: 2008-03-09

### Abstract

The pathogenic mechanism of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) still remains unclear. In recent years, many studies indicate that abnormal hepatocyte apoptosis exists in NAFLD, confirming the close relationship between NAFLD and hepatocyte apoptosis. The regulation of cell apoptosis includes two: positive or negative. In this paper, we review the research advances in the regulation of hepatocyte apoptosis during the pathogenesis of NAFLD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Cell apoptosis; Liver cell

Chen SD, Hu YY. Advances in regulation mechanism of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1327-1331

### 摘要

非酒精性脂肪性肝病的发病机制至今尚不十分清楚. 近年来众多研究表明, 本病存在肝细胞凋亡的异常, 说明肝细胞凋亡与本病的发生密切相关. 调控细胞凋亡的机制可分正向/负向两个方面的调控因素. 本文就近几年在非酒精性脂肪性肝病肝细胞凋亡调控机制方面的研究进展作一综述.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 细胞凋亡; 肝细胞

陈少东, 胡义扬. 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞凋亡调控机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1327-1331  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1327.asp>

### 0 引言

目前在非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制中, Day *et al*提出的二次打击学说得到公认. 然而随着对凋亡的研究, 不断有证据表明在NAFLD中, 凋亡起着重要的作用<sup>[1-2]</sup>. 如范建高 *et al*在肥胖高脂血症性脂肪性肝炎细胞凋亡的动物实验研究中, 发现非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)在肝细胞坏死增加的同时, 也存在肝细胞凋亡显著增加的现象<sup>[3]</sup>. 而Nitchell *et al*也发现在酒精性肝炎和非酒精性肝病以及相关的肝纤维化中, 均有明显的肝细胞凋亡现象发生<sup>[4-5]</sup>. 那么肝细胞凋亡在NAFLD中受到哪些相关因素的调控, 而这些因素又是如何具体调控肝细胞凋亡呢? 具体来说, 肝细胞凋亡受到正向/负向两个方面的调控因素的作用, 具体可以分为以下两类: (1)正向调控肝细胞凋亡的因素, 包括野生型p53、Bax、TNF- $\alpha$ 、Fas等; (2)负向调控肝细胞凋亡的因素, 如Bcl-2、NF- $\kappa$ B等. 我们这里对近几年在NAFLD发病过程中参与调控肝细胞凋亡的有关因素及其作用机制作一综述.

### 1 正向调控肝细胞凋亡的相关因素

1.1 Fas Fas属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族成员, Fas基因编码一种相对分子质量为48 kDa的跨膜蛋白. Fas在各种

### ■背景资料

目前在非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的发病机制中, Day *et al*提出的二次打击学说得到公认. 然而随着对凋亡的研究, 不断有证据表明在NAFLD中, 凋亡起着重要的作用. 肝细胞凋亡是一个多基因调控的复杂过程, 各基因在调节细胞凋亡的过程中, 不是孤立的, 而是通过某些环节相互影响, 共同调节凋亡的实施.

### ■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科

## ■ 研究前沿

非酒精性脂肪性肝病存在肝细胞凋亡的异常,说明肝细胞凋亡与本病的发生密切相关,但具体机制至今尚不清楚。

组织中均可表达,尤其在肝脏、胸腺、心脏、肾脏中表达的量很大。Fas配体(FasL)主要表达于活化的T细胞, NK细胞。表达Fas抗原的细胞与Fas配体结合可活化天冬半胱酶(caspase)从而引起细胞凋亡。研究表明病毒性肝炎和人类其他一些肝病可由Fas受体诱导引起肝细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。而Riberio *et al*发现在NASH以及酒精性脂肪性肝病(alcoholic steatohepatitis, ASH)中,可见Fas受体介导的肝细胞凋亡<sup>[8]</sup>。同时研究证实Fas在NASH患者肝脏内表达增加,他不仅可以传导凋亡信号,还通过caspase-8裂解Bid损伤线粒体<sup>[9]</sup>。Jaeschke *et al*<sup>[10]</sup>发现Fas介导细胞凋亡的机制在于Fas受体在胞质中的尾部含有一个“死亡域”序列,可以与Fas相关死亡域蛋白(fas-associated death domain protein, FADD)结合,结合之后吸引caspase-8前体形成死亡激发信号复合体(death inducing signaling complex, DISC)。一旦DISC形成, caspase-8前体自身催化成有活性的caspase-8并释放。caspase-8是上游的一个活化caspases, 他能对下游的一些效应caspases如caspase-3进行加工, 最终导致细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>。正如史洪涛 *et al*在NAFLD大鼠实验中, 发现随着肝细胞凋亡的升高, caspase-3的量也相应的增加, 说明caspase-3介导的肝细胞凋亡可能是脂肪肝发病过程中肝细胞损伤的重要机制<sup>[1,13]</sup>。而相反, NAFLD大鼠在罗格列酮与二甲双胍的治疗下, 其Fas mRNA表达水平却显著下降<sup>[14]</sup>。

1.2 野生型P53(WTP53) WTP53基因是典型的抑癌基因, 位于17号染色体, 11个外显子和10个内含子, 编码一个由393个氨基酸组成的相对分子质量为53 kDa的核内磷酸蛋白, 故称为p53。p53蛋白具有蛋白-DNA和蛋白质-蛋白质结合的特性, 其功能形式为四联体<sup>[15]</sup>。P53基因分为野生型P53和突变型P53, 研究表明WTP53具有明显的促肝细胞凋亡的作用, 而且主要通过转录、激活及抑制特定的蛋白和抗凋亡基因来实现<sup>[16]</sup>。P53基因在调控肝细胞凋亡的过程中, 主要是在细胞分裂的G<sub>1</sub>/S期调控点起作用, 以决定细胞是否启动DNA合成还是进入凋亡<sup>[17-18]</sup>。当DNA受损后, P53基因表达增强, p53蛋白积累在细胞中, 使肝细胞停滞于G<sub>1</sub>期, 使之在复制前修复损伤的DNA, 修复后细胞进入S期; 一旦损伤严重, 则p53蛋白持续增高, 诱发细胞凋亡以防受损的DNA复制。p53在调控肝细胞凋亡的过程中, 与p21蛋白协同作用, p21蛋白是一个通用的细胞周期依赖激酶的抑制因子, 在细胞分裂G<sub>1</sub>期, p53就激活p21蛋白

与之共同调控肝细胞是复制还是凋亡。如Ikeda *et al*发现p53在脂肪肝发病中起重要作用, 并且与p21共同起协调作用<sup>[18-19]</sup>。

1.3 Bax Bax是第一个确定为Bcl-2的同源基因, 他和Bcl-2基因具有40%的同源性, 编码相对分子质量为21 kDa的Bax蛋白, 其蛋白包括家族特征的BH1、BH2、BH3结构域, 此外还有c末端的跨膜结构域。如Mengshol *et al*发现在丙型肝炎并发脂肪肝患者中, 出现Bax升高现象, 提示出现肝细胞凋亡<sup>[20-22]</sup>。Bax发挥促进凋亡的机制有三, 其一, 是Bax蛋白本身可形成同二聚体, 促进细胞凋亡<sup>[23-24]</sup>。其二, 如Malhi发现在游离脂肪酸诱导下的NAFLD细胞模型中, Bax作为线粒体功能失调的调解者, 其活化可介导c-Jun氨基末端激酶(JNK)依赖的脂质凋亡, 当JNK活化仅带有BH3结构域蛋白的Bim, 可观察到Bax活化并发生脂质凋亡, 相反运用RNA干扰技术可使仅带有BH3结构域蛋白的Bim表达降低, 同时也会抑制Bax的活化并减少脂质凋亡<sup>[25-26]</sup>。第三, Kaus-Michael还提出Bax从胞质中移位到线粒体外膜上, 并在此形成微孔结构的低聚物, 从而促进细胞色素C的释放。细胞色素C与凋亡蛋白活化因子-1(Apaf-1)、dATP及caspase-9前体结合形成凋亡小体而发生凋亡<sup>[27-29]</sup>。

1.4 TNF- $\alpha$  Sato *et al*发现脂肪肝中TNF- $\alpha$ 的上调可引起线粒体膜通透性改变并引起凋亡发生<sup>[30-31]</sup>, 其机制在于TNF受体有TNFR1和TNFR2两种。TNF- $\alpha$ 与TNFR1结合, TNFR1形成三聚体后与TNF受体偶连的死亡域(TNFR-associated death domain, TRADD)通过死亡结构蛋白的相互作用, 再与FADD结合从而激活caspase-8, 再激活caspase-3引起细胞凋亡<sup>[32-34]</sup>, 或者通过TRADD结合后TRAIDD(RIP-associated Ich/CED-3 homologous with a death domain)通过死亡域与RIP连接, 并使caspase-2聚集与RIP进一步引起细胞凋亡<sup>[35-37]</sup>。

## 2 负向调控肝细胞凋亡的相关因素

2.1 Bcl-2 Bcl-2基因是从滤泡性B淋巴细胞中分离出来的一种癌基因, 正常位于18号染色体上, 但在淋巴瘤中却异位转移到14号染色体上<sup>[38]</sup>。Bcl-2基因编码一个相对分子质量为25-26 kDa的蛋白, 其C末端的21个疏水氨基酸组成一个延伸的键状结构, 这个键状结构可插入细胞的膜结构中<sup>[39]</sup>。研究发现, Bcl-2在肝细胞凋亡的基因调控中起重要作用, 通过抑制细胞凋亡来延长

细胞存活的时间, 因此又称为“生存基因”<sup>[40]</sup>. 但是在NAFLD的发病中, *Bcl-2*的表达均显著下降<sup>[41]</sup>, 如在丙型肝炎并发脂肪肝患者中, *Bcl-2* mRNA水平显著下降, 说明*Bcl-2*抑制肝细胞凋亡的作用不明显<sup>[42]</sup>.

**2.2 NF- $\kappa$ B** NF- $\kappa$ B是细胞凋亡负向调控家族中的一名重要成员, 他最早是在1986年被定义为与免疫球蛋白轻链基因增强子 $\kappa$ B序列(GGGACTTCC), 几乎存在于所有类型的细胞中, 但是与其抑制物I $\kappa$ Bs结合, 以不活化形式存在于胞质中<sup>[43]</sup>. NF- $\kappa$ B是Rel蛋白成员, 已发现哺乳动物有5种NF- $\kappa$ B/Rel蛋白, 分别是NF- $\kappa$ B1(p50)、NF- $\kappa$ B2(p52)、C-Rel、RelA(p65)、RelB, 他们之间可以形成多种形式同源或异源二聚体<sup>[44]</sup>. Antwerp发现NF- $\kappa$ B能够抑制TNF- $\alpha$ 诱导的细胞凋亡<sup>[45]</sup>. 之后又陆续发现活化的NF- $\kappa$ B能阻碍多种类型细胞的凋亡<sup>[46]</sup>, 这种作用Wang认为是通过一系列与凋亡蛋白酶相作用的抗凋亡蛋白(TrAF1、TrAF2)及凋亡抑制蛋白(C-IAP1、C-IAP2)来实现的<sup>[47]</sup>. NF- $\kappa$ B诱导他们的表达从而抑制caspase-8的活化, 而caspase-8是介导死亡受体相关信号必须的凋亡蛋白酶, 也就是说NF- $\kappa$ B活化发挥抗凋亡机制是在激发阶段而不是执行阶段来阻断死亡信号<sup>[48-49]</sup>. 另外NF- $\kappa$ B还可以通过诱导抗凋亡基因的表达来发展抗凋亡作用. 有文献报道, *Bcl-2*基因的bfl-1启动子含有一个NF- $\kappa$ B的结合位点, *Bcl-2*基因的表达依赖于NF- $\kappa$ B的活性<sup>[50]</sup>. Wang *et al*证实活化的NF- $\kappa$ B可通过激活*Bcl-2*家族成员A1/bfl-1表达而阻断caspase-3激活, 并抑制线粒体释放细胞色素C<sup>[51]</sup>. 在NASH中, 增多的ROS可通过磷酸化泛素化作用和蛋白酶体介导使I $\kappa$ B降解, 激活NF- $\kappa$ B开始转录, 产生抗凋亡效应<sup>[52]</sup>. Riberio *et al*发现在NASH以及ASH中, 可见凋亡与NF- $\kappa$ B活化表达有关<sup>[53]</sup>. 当使用NF- $\kappa$ B抑制剂后, 会明显抑制NF- $\kappa$ B以及其靶基因*Bcl-xL*的活性, 从而提高由TNF- $\alpha$ 诱导的细胞凋亡<sup>[54-55]</sup>.

### 3 正负调控相关因素的相互作用

肝细胞凋亡是一个多基因调控的复杂过程, 各基因在调节细胞凋亡的过程中, 不是孤立的, 而是通过某些环节相互影响, 共同调节凋亡的实施. 如Bax与*Bcl-2*在调控肝细胞凋亡的过程中相互作用, 共同参与调节肝细胞凋亡<sup>[56]</sup>. *Bcl-2*与Bax可形成同二聚体或异二聚体来改变线粒体的通透性, 从而决定细胞的生存与死亡. 当

*Bcl-2*相对量高于Bax时, 则*Bcl-2*同二聚体增多, 并促进形成*Bcl-2*-Bax异二聚体, 而*Bcl-2*同二聚体和*Bcl-2*-Bax异二聚体都可抑制细胞凋亡; 相反当Bax的量相对高于*Bcl-2*时, 则Bax同二聚体增多, 从而促进细胞凋亡<sup>[40]</sup>. 因而*Bcl-2*/*Bax*两蛋白之间的比例是决定细胞凋亡或存活的关键因素<sup>[57-58]</sup>. 除此以外*Bcl-2*还可以通过直接或间接的影响细胞信号传递蛋白, 如抑制*Wtp53*介导的细胞凋亡<sup>[59-60]</sup>; *Wtp53*在诱导细胞凋亡的过程中, 能降低细胞内源性*Bcl-2*蛋白的表达并抑制其功能, 提高细胞内Bax蛋白的表达, 使Bax/*Bcl-2*的比例失调而促进细胞凋亡<sup>[59-62]</sup>; 再者Fas mRNA的表达也与caspases的活性密切相关<sup>[63-65]</sup>.

肝细胞凋亡参与NAFLD的发病机制已经得到肯定<sup>[66]</sup>, 但是由于肝细胞凋亡是一柄双刃剑, 有必要对具体的调控环节, 特别是各种调控因素之间的关系进行深层次的研究, 以期对其发病机制有新的认识, 以寻求新的治疗方案.

### 4 参考文献

- Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33
- Nishitani Y, Okazaki S, Imabayashi K, Katada R, Umetani K, Yajima H, Matsumoto H. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. *Nihon Arukoroku Yakubutsu Igakkai Zasshi* 2007; 42: 32-35
- 范建高, 钟岚, 王国良, 徐正婕, 李明升, 巫协宁. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎细胞凋亡的实验研究. *中华消化杂志* 2000; 20: 421-422
- Mitchell C, Mallet V, Guidotti JE, Mignon A, Couton D, Kahn A, Gilgenkrantz H. Experimental modulation of apoptosis: physiopathological and therapeutic targets. *J Soc Biol* 2005; 199: 243-246
- Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, Shono M, Huang HW, He JH, Yao DF. Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4295-4305
- Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Büchler P, Klar E, Lehnert T, Friess H, Büchler MW, Kirschfink M, Stremmel W, Krammer PH, Müller M, Protzer U. Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2003; 38: 736-744
- Łapinski TW, Wiercińska-Drapała A, Panasiuk A, Kovalchuk O. Concentrations of ssDNA in liver tissue and its correlation with sFas and sFasL in serum of patients infected with HBV, HCV, HCV and HIV. *Adv Med Sci* 2007; 52: 109-113
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- $\kappa$ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis

### ■ 相关报道

范建高 *et al* 在肥胖高脂血症性脂肪性肝炎细胞凋亡的动物实验研究中, 发现非酒精性脂肪性肝炎(NASH)在肝细胞坏死增加的同时, 也存在肝细胞凋亡显著增加的现象.

## ■应用要点

本文对肝细胞凋亡参考NAFLD的具体调控环节,特别是各种调控因素之间的关系进行深层次的研究,以期对其发病机制有新的认识,以寻求新的治疗方案。

- patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 9 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
- 10 Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176
- 11 Ader T, Norel R, Levoci L, Rogler LE. Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts. *Mech Dev* 2006; 123: 177-194
- 12 Chen LH, Jiang CC, Watts R, Thorne RF, Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. *Cancer Res* 2008; 68: 834-842
- 13 史洪涛, 陈东风, 李陶, 熊仁平. Caspase-3在大鼠非酒精性脂肪肝形成中的作用. *中华消化杂志* 2005; 23: 173-174
- 14 Zhang DM, Zhang GY, Wang T, Zhong HJ, Chen WK. Therapeutic effects of insulin-sensitizing drugs on nonalcoholic fatty liver disease: experiment with rats. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2006; 86: 1279-1283
- 15 Ohnishi K, Yasumoto J, Takahashi A, Ohnishi T. LY294002, an inhibitor of PI-3K, enhances heat sensitivity independently of p53 status in human lung cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 29: 249-253
- 16 Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G, Jalil A, Richon C, Vergnon I, Mami-Chouaib F, Chouaib S. p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; 174: 871-878
- 17 Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 2003; 17: 660-667
- 18 Mendonca MS, Chin-Sinex H, Gomez-Millan J, Datzman N, Hardacre M, Comerford K, Nakshatri H, Nye M, Benjamin L, Mehta S, Patino F, Sweeney C. Parthenolide sensitizes cells to X-ray-induced cell killing through inhibition of NF-kappaB and split-dose repair. *Radiat Res* 2007; 168: 689-697
- 19 Liu XF, Xia YF, Li MZ, Wang HM, He YX, Zheng ML, Yang HL, Huang WL. The effect of p21 antisense oligodeoxynucleotides on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells with normal p53 function. *Cell Biol Int* 2006; 30: 283-287
- 20 Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 622-634
- 21 Lee SK, Park SO, Joe CO, Kim YS. Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 756-762
- 22 Wang AG, Seo SB, Moon HB, Shin HJ, Kim DH, Kim JM, Lee TH, Kwon HJ, Yu DY, Lee DS. Hepatic steatosis in transgenic mice overexpressing human histone deacetylase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 461-466
- 23 Sato H, Ozawa K, Iwata S, Kaihara S, Ogura Y, Fujimoto Y, Ono M, Hodohara K, Uemoto S, Nakamura H, Takai K, Tanaka K. Role of bcl-2 mRNA in homeostatic proliferation in circulating T-cells in human liver transplant patients after T-cell depletion. *J Surg Res* 2005; 127: 123-130
- 24 Bermudez Y, Erasso D, Johnson NC, Alfonso MY, Lowell NE, Kruk PA. Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis. *Clin Interv Aging* 2006; 1: 155-167
- 25 Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-12101
- 26 Fletcher JI, Huang DC. Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle* 2008; 7: 39-44
- 27 Debatin KM. Chronic lymphocytic leukemia: keeping cell death at bay. *Cell* 2007; 129: 853-855
- 28 Wong CK, Chen Z, So KL, Li D, Li P. Polycomb group protein RING1B is a direct substrate of Caspases-3 and -9. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 844-852
- 29 Bao Q, Lu W, Rabinowitz JD, Shi Y. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. *Mol Cell* 2007; 25: 181-192
- 30 Sato N. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S1-S6
- 31 Chen Q, Casali B, Pattacini L, Boiardi L, Salvarani C. Tumor necrosis factor-alpha protects synovial cells from nitric oxide induced apoptosis through phosphoinositide 3-kinase Akt signal transduction. *J Rheumatol* 2006; 33: 1061-1068
- 32 Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308
- 33 Ding D, Jiang H, Wang P, Salvi R. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid. *Hear Res* 2007; 226: 129-139
- 34 Chen D, Texada DE, Duggan C, Liang C, Reden TB, Kooragayala LM, Langford MP. Surface calreticulin mediates muramyl dipeptide-induced apoptosis in RK13 cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 22425-22436
- 35 Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4: 387-396
- 36 Berube C, Boucher LM, Ma W, Wakeham A, Salmena L, Hakem R, Yeh WC, Mak TW, Benchimol S. Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14314-14320
- 37 Motaln H, McWhir J, Horvat S. In situ analysis of Raidd-beta-galactosidase fusion gene expression in transgenic mouse midgestation embryos. *Transgenic Res* 2005; 14: 27-40
- 38 Sawada S, Kinjo T, Makishi S, Tomita M, Arasaki A, Iseki K, Watanabe H, Kobayashi K, Sunakawa H, Iwamasa T, Mori N. Downregulation of citrin, a mitochondrial AGC, is associated with apoptosis of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 937-944
- 39 Vairaktaris E, Spyridonidou S, Goutzaris L, Vylliotis A, Lazaris A, Donta I, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E. Diabetes and oral oncogenesis. *Anticancer Res* 2007; 27: 4185-4193
- 40 Yu XD, Wang SY, Chen GA, Hou CM, Zhao M, Hong JA, Nguyen DM, Schrupp DS. Apoptosis induced by decapeptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells. *Cancer J* 2007; 13: 105-113
- 41 Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz

- D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202
- 42 Walsh MJ, Vanags DM, Clouston AD, Richardson MM, Purdie DM, Jonsson JR, Powell EE. Steatosis and liver cell apoptosis in chronic hepatitis C: a mechanism for increased liver injury. *Hepatology* 2004; 39: 1230-1238
- 43 MacFarlane AJ, Stover PJ. Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. *Nutr Rev* 2007; 65: S157-S166
- 44 Yang L, Tao LY, Chen XP. Roles of NF-kappaB in central nervous system damage and repair. *Neurosci Bull* 2007; 23: 307-313
- 45 Chuang HC, Lay JD, Hsieh WC, Su IJ. Pathogenesis and mechanism of disease progression from hemophagocytic lymphohistiocytosis to Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma: nuclear factor-kappa B pathway as a potential therapeutic target. *Cancer Sci* 2007; 98: 1281-1287
- 46 Naujokat C, Berges C, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation* 2007; 83: 485-497
- 47 Sandur SK, Ahn KS, Ichikawa H, Sethi G, Shishodia S, Newman RA, Aggarwal BB. Zylflamend, a polyherbal preparation, inhibits invasion, suppresses osteoclastogenesis, and potentiates apoptosis through down-regulation of NF-kappa B activation and NF-kappa B-regulated gene products. *Nutr Cancer* 2007; 57: 78-87
- 48 Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 2007; 131: 682-693
- 49 Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S38-S42
- 50 Park J, Kim M, Na G, Jeon I, Kwon YK, Kim JH, Youn H, Koo Y. Glucocorticoids modulate NF-kappaB-dependent gene expression by up-regulating FKBP51 expression in Newcastle disease virus-infected chickens. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 278: 7-17
- 51 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5923-5929
- 52 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
- 53 DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* 2005; 42: 1148-1157
- 54 Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 2000; 275: 1439-1448
- 55 Hatano E. Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S43-S44
- 56 Gavalda N, Pérez-Navarro E, García-Martínez JM, Marco S, Benito A, Alberch J. Bax deficiency promotes an up-regulation of Bim(EL) and Bak during striatal and cortical postnatal development, and after excitotoxic injury. *Mol Cell Neurosci* 2007
- 57 Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 1998; 101: 1326-1342
- 58 Jung JW, Cho SD, Ahn NS, Yang SR, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Aruoma OI, Kang KS, Lee YS. Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by p38 MAP kinase inhibition in rat liver epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1767-1772
- 59 张毓芳, 刘恩桥. 细胞凋亡与心血管疾病研究进展. *中国心血管杂志* 2004; 9: 385-387
- 60 Fukunaga-Johnson N, Ryan JJ, Wicha M, Nuñez G, Clarke MF. Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1761-1767
- 61 Zaky A, Busso C, Izumi T, Chattopadhyay R, Bassiouny A, Mitra S, Bhakat KK. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 1555-1566
- 62 Ohnishi T, Ohnishi K, Takahashi A. Glycerol restores heat-induced p53-dependent apoptosis of human glioblastoma cells bearing mutant p53. *BMC Biotechnol* 2002; 2: 6
- 63 Zhang X, Kiechle FL. Fatty acid synthase and its mRNA concentrations are decreased at different times following Hoechst 33342-induced apoptosis in BC3H-1 myocytes. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 185-193
- 64 Burkhardt BR, Lyle R, Qian K, Arnold AS, Cheng H, Atkinson MA, Zhang YC. Efficient delivery of siRNA into cytokine-stimulated insulinoma cells silences Fas expression and inhibits Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 2006; 580: 553-560
- 65 Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 845-852
- 66 Abdeen MB, Chowdhury NA, Hayden MR, Ibdah JA. Nonalcoholic steatohepatitis and the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2006; 1: 36-40

#### ■同行评价

本文内容全面, 论述条理, 语言流畅, 总体写的很好, 具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

# MicroRNAs与p53基因在肿瘤中相互关系的研究进展

李琼, 王阁

## ■背景资料

miRNAs是近年来生命科学领域的一个研究热点,这类非编码小分子RNA,参与调控发育、分化、细胞增殖和凋亡等重要的生理病理过程。miRNAs在翻译水平上特异性抑制靶基因表达,在肿瘤的发生发展过程中被认为是一组新的致癌基因或抑癌基因,其具体作用机制还不明了。抑癌基因p53的突变是人类肿瘤中最常见的基因异常现象,人类大部分的肿瘤与之相关。最新研究表明miRNAs与抑癌基因p53在肿瘤中有一定的相关性。

## ■同行评议者

陈公琰, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内一科

李琼, 王阁, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 重庆市 400042  
国家自然科学基金资助项目, No. 30570410, No. 30370341  
全国优秀博士专项基金资助项目, No. 200261  
作者贡献分布: 本论文李琼负责参考文献的查阅及检索, 写作由李琼和王阁共同完成。  
通讯作者: 王阁, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心。  
wangge70@hotmail.com  
电话: 023-68757171  
收稿日期: 2007-12-27 修回日期: 2008-03-20

## Research progress of the relationship between microRNAs and p53 gene in oncogenesis

Qiong Li, Ge Wang

Qiong Li, Ge Wang, Tumor Center, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570410, No. 30370341; and the Academic Foundation for National Excellent Doctoral Dissertation of China, No. 200261

Correspondence to: Ge Wang, Tumor Center, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China. wangge70@hotmail.com  
Received: 2007-12-27 Revised: 2008-03-20

## Abstract

The initiation and development of oncogenesis are a multi-step and complicated process, in which activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes are involved. MicroRNAs (miRNAs) are a new class of endogenous, non-coding small RNA molecules. It has been demonstrated that their expression levels are closely associated with human pathogenesis of cancers. They may participate in regulating the abnormal expression of oncogenes and tumor suppressor genes. Mutation in tumor suppressor gene p53 is the most frequent phenomenon in human cancer, and up to now, almost 50% human cancers are demonstrated associated with p53 mutation. Recent studies showed that miRNAs might play a role in regulating the tumor-suppressor activity of p53 gene. In this review, the research progress in this

field is discussed.

**Key Words:** MicroRNAs; Tumor suppressor gene p53; Oncogenesis; Progress

Li Q, Wang G. Research progress of the relationship between microRNAs and p53 gene in oncogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1332-1336

## 摘要

肿瘤的发生、发展是多基因共同参与的多步骤的复杂过程,包括癌基因的异常激活和抑癌基因的失活。MicroRNAs(miRNAs)是一组真核细胞内源性产生的单链小RNA分子,研究发现miRNAs的表达水平与人类肿瘤发生有着密切的关系,可能参与调控癌基因和抑癌基因的异常表达。抑癌基因p53的突变是人类肿瘤中最常见的基因异常现象,目前已证实人类大约有50%的肿瘤与之相关。近来发现miRNAs的表达水平与p53的抑癌活性相关,本文就这一研究进展作一综述。

**关键词:** miRNAs; p53抑癌基因; 肿瘤生成; 进展

李琼, 王阁. MicroRNAs与p53基因在肿瘤中相互关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1332-1336  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1332.asp>

## 0 引言

miRNAs是近年来生命科学领域的一个研究热点,他广泛存在于真核生物中,是一类保守、短序列、非编码的单链小分子RNA,通过与其靶mRNA分子的3'端非编码区(3'-UTR)互补结合,在翻译水平上特异性抑制基因表达,从而参与调控生物的生长和发育等许多复杂生命过程<sup>[1-3]</sup>。最初人们在线虫中发现lin-4和let-7这两种miRNAs具有调控基因表达的功能<sup>[4-5]</sup>。目前发现并证实的人类miRNAs已达到470多种,他们与肿瘤、心脏疾病以及艾滋病等多种疾病密切相关,尤其在肿瘤的发生发展过程中,扮演着重要的角色<sup>[6-11]</sup>。抑癌基因p53的突变是人类肿瘤中最常见的基因异常现象,人类大部分的肿瘤与之相关<sup>[11-19]</sup>。本

文就miRNAs与抑癌基因p53在肿瘤中相互关系的最新研究进展作一综述。

## 1 miRNAs与肿瘤

miRNAs是一类长度为22-24 nt的非编码小分子RNA, 其5'端有一个磷酸基团, 3'端为羟基, 它具有保守性、基因簇集现象和特异性表达和不具有蛋白质编码基因和开放阅读框架等特点。成熟miRNAs由长约80 nt含有茎环结构的小片段RNA-miRNA前体(pre-miRNA)经Dicer酶加工而成。miRNAs参与调控生物体的发育、神经分化、细胞增殖、凋亡和脂肪代谢等, 是细胞增殖分化和生物体发育过程中重要的调控因子<sup>[20]</sup>。生物信息学分析表明, miRNAs调控着人类大约三分之一的基因。其机制是在翻译水平上, 通过与靶mRNA分子的3'端非翻译区(untranslated region, UTR)不完全配对结合, 影响靶mRNA的成熟、转运及稳定性或直接调控翻译过程, 从而起到调节蛋白质表达水平的功能<sup>[21]</sup>。

miRNAs与肿瘤的发生发展密切相关, 被认为是一组新的致癌基因或抑癌基因<sup>[22-27]</sup>。miRNAs既可作为抑癌基因, 下调原癌基因的活性; 也可作为癌基因, 下调抑癌基因的活性。在肺癌的研究中发现, let-7在肺癌中呈明显低表达<sup>[28]</sup>, 并且证实let-7是通过抑制RAS基因的表达而在肺癌发生中发挥功能的<sup>[29]</sup>。多顺反子miR-17-92簇被发现于肺癌和淋巴瘤中呈高表达<sup>[30-31]</sup>。O'Donnell *et al*<sup>[32]</sup>指出*c-Myc*基因可同时激活E2F1和miR-17-92的转录, 调节他们的表达, 从而影响通过ARE-p53通路介导的细胞凋亡。*c-Myc*是一个最具代表性的致癌基因, 他的异常表达常常导致人类恶性疾病的发生<sup>[33-36]</sup>。Meng *et al*<sup>[37-38]</sup>检测正常肝细胞和肝癌细胞中的197种miRNAs分子的浓度, 发现高浓度的miR-21会抑制PTEN基因活性, 而PTEN基因与肿瘤生长、转移和侵袭等紧密相关, 从而证明了miRNAs能下调抑癌基因的活性, 促进肝癌细胞的生长和扩散。

大量的研究资料表明, 肿瘤的miRNAs表达谱具有其组织特异性, 即在肿瘤组织或细胞中有着与正常组织细胞显著差异的miRNAs表达谱, 不同类型的肿瘤组织有着不同组合的miRNAs异常表达谱。Iorio *et al*<sup>[39]</sup>发现在乳腺癌组织中, miR-125b, miR-145, miR-21和miR-155等表达量显著减少, miRNAs的表达水平与乳腺癌的病理类型、分期等都密切相关。同样, 他们发现在卵巢癌中的miRNA表达又不同, 其中

miR-200a, miR-141, miR-200c和miR-200b明显高表达, 而miR-199a, miR-140, miR-145和miR-125b1表达降低<sup>[40]</sup>。Murakami *et al*<sup>[41]</sup>发现在肝癌组织中, miR-18a和miR-224呈明显高表达, 而miR-195、miR-199a、miR-200a和miR-125a等呈现低表达。Volinia *et al*<sup>[42]</sup>发现了在大部分实体肿瘤中miR-20a、miR-21、miR-92、miR-106a和miR-155等呈过量表达。

## 2 p53基因与肿瘤

从1979年第一次发现p53基因以来, 成千上万的文献对这个基因的重要性进行了报道。p53基因定位于染色体17p13.1, 由20 kb的11个外显子构成, 他有野生型和突变型两种构型。野生型p53基因为正常的p53基因, 编码的蛋白质称为p53蛋白, 是由393个氨基酸组成的与细胞分裂周期相关的核磷酸蛋白质。作为肿瘤抑制基因的核转录因子, p53基因以“基因卫士”的关键角色, 依靠对其下游因子的激活或抑制来调节细胞的生长与凋亡<sup>[43-44]</sup>。正常的p53蛋白在DNA损伤或缺氧时以序列专一的方式与DNA结合后起转录因子的作用, 使依赖p53的CDK抑制物p21WAF1/CIP1活化, 抑制CDK活性, 阻滞细胞在G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期, 抑制细胞的增生。同时, 野生型p53基因还可和某些与细胞增殖相关基因的TATA结合蛋白(TBP)结合, 使TBP不能与启动子TATA盒结合而抑制转录起始, 从而起着抑制肿瘤发生的作用<sup>[45]</sup>。现已证明, 野生型p53基因通过调控p21、GADD45、CD95/Fas和PUMA等<sup>[46-48]</sup>下游基因来抑制细胞的生长和诱导细胞凋亡。最近, 对野生型p53基因诱导细胞凋亡的研究又有新突破。Chipuk *et al*<sup>[49]</sup>首次发现p53基因不仅在细胞核同时也能在细胞质中发挥抑制肿瘤的功能, 是通过一种促进细胞死亡的Bcl-2同类蛋白-Bax的激活来诱导细胞凋亡。Sykes *et al*<sup>[50]</sup>发现, hMOF和TIP60两种酶在细胞DNA受损后, 通过改变结合位点赖氨酸120, 影响p53蛋白与DNA结合的能力, 从而影响p53蛋白判断靶标基因的能力, 诱导受损细胞凋亡。而突变型p53基因则失去对细胞生长的抑制作用, 促进细胞转化和过度增殖, 导致肿瘤的发生。

## 3 miRNAs与p53

miRNAs在翻译水平上调节基因的表达, 是RNA干扰通路中的一个重要调节分子<sup>[51-55]</sup>。有趣的是, p53抑癌基因也是在翻译水平上被调控<sup>[56-58]</sup>。作为转录因子的p53可以直接调控多种基因mRNA

### ■研发前沿

miRNAs与抑癌基因p53在肿瘤中相关性报道并不多, 揭示miRNAs和p53基因在肿瘤形成过程中的相互调控机制, 是研究miRNA功能的重要点。

### ■相关报道

最新文献证明 miR-372 和 miR-373 通过抑制 p53 途径促进人类生殖细胞瘤生成。

的转录表达,也可以通过调节miRNAs的表达水平,间接影响下游靶基因mRNA的转录<sup>[59-63]</sup>。Xi *et al*<sup>[64]</sup>发现,结肠癌表达的326个miRNAs中46%有p53基因的结合位点,通过下调p53基因活性,削弱p53基因在细胞中对miRNAs的调节,表明p53基因和miRNAs在基因表达水平上相互影响。而在结肠癌的研究中,Slaby *et al*<sup>[65]</sup>发现miR-21和miR-31表达明显上调,而miR-143和miR-145则表达下调。锌指蛋白Wig-1已被发现在p53基因的调控途径中有着重要的功能<sup>[66]</sup>。Méndez Vidal *et al*<sup>[67]</sup>证实由p53基因诱导产生的锌指蛋白Wig-1能结合带有miRNAs结构特征的dsRNA,表明Wig-1在由miRNAs介导的基因调控中扮演着重要的角色,间接提示了miRNAs与p53基因的联系。现已证实在肿瘤中与p53基因密切相关的有两大miRNAs家族:

3.1 miR-372和miR-373 最近, Voorhoeve *et al*<sup>[68]</sup>筛选了大量与细胞致癌基因相关miRNAs,发现两个miRNAs: miR-372和miR-373是定位于致癌基因RAS和野生型p53初始细胞癌变和肿瘤化的关键因子,在生殖细胞瘤(testicular germ cell tumors, TGCTs)中起着促进细胞的生长和肿瘤形成的作用。研究人员同时还发现,miR-372和miR-373抑制了p53介导的CDK抑制因子的作用,这种作用可能是通过直接抑制肿瘤抑制因子LATS2的表达来实现的,这是继miR-17-92簇后发现的又一组潜在的新致癌基因,其机制可能是通过沉默p53途径来参与生殖细胞瘤的形成。

3.2 miR-34家族 p53基因抑癌网络是通过包括细胞DNA损伤,应激或不恰当的有丝分裂刺激等的反应而激发的,通过抑制细胞生长或凋亡来抑制不合适的细胞增殖,从而抑制肿瘤形成<sup>[69]</sup>。最近,He *et al*<sup>[70-71]</sup>在比较野生型和缺陷型p53细胞的miRNAs表达谱后,发现了一组参与p53肿瘤抑制网络的重要miRNAs家族miR-34(包括miR-34a, miR-34b和miR-34c),他们具有调节细胞增殖和凋亡的功能,是p53基因的直接转录靶标之一。在体内体外实验证明,miR-34可以依赖于p53的肿瘤胁迫(oncogenic stress)和DNA的损伤诱导产生。Chang *et al*<sup>[72]</sup>还发现miR-34a被p53基因调控影响其表达可促进细胞凋亡。而Tazawa *et al*<sup>[73]</sup>发现具有抑癌活性的miR-34a在结肠癌中能通过E2F诱导细胞老化。Corney *et al*<sup>[74]</sup>同样也证实了miR-34b和miR-34c是p53基因的直接转录靶标之一,参与调控着细胞的增殖和

黏附能力。miR-34家族在人类多种肿瘤细胞中缺失,是促使p53基因抑制肿瘤形成的关键。目前,仅在哺乳动物身上发现了多个p53基因的靶标,而miR-34不同于其他靶标,他同时还存在于果蝇和线虫中,说明miR-34与p53基因间的联系在p53基因抑癌网络演化的早期就出现了。

## 4 结论

大量的研究证明miRNAs这类小分子在细胞内直接或间接地影响基因的表达调控,尤其在肿瘤的发生发展过程中,通过不同的途径来调节细胞增殖、分化和凋亡等。p53作为一个重要的抑癌基因,在肿瘤发生、发展及预后中具有举足轻重的地位。最新的研究提出了miRNAs可通过p53基因抑制肿瘤细胞生长,促进细胞凋亡的新观点,同时又证明了miRNAs是一种可以通过抑制p53途径促进人类生殖细胞瘤生成的新致癌基因,这些都为研究miRNAs和p53基因在肿瘤形成过程中的调控机制提供了新的证据。随着各项生物学技术的发展,相信会有更多的研究证实miRNAs与p53基因的紧密关系,这将有利于我们进一步认识肿瘤的发生机制,为肿瘤的诊断、治疗提供新的视野。

## 5 参考文献

- 1 He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-531
- 2 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438-442
- 3 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132: 4653-4662
- 4 Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122: 553-563
- 5 Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* 2004; 18: 132-137
- 6 Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, Sandaltzopoulos R, Zhang L. miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1375-1386
- 7 Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 219-225
- 8 Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007; 13: 613-618
- 9 Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the

- development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007; 100: 416-424
- 10 Provost P, Barat C, Plante I, Tremblay MJ. HIV-1 and the microRNA-guided silencing pathway: an intricate and multifaceted encounter. *Virus Res* 2006; 121: 107-115
- 11 Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Jeang KT, Benkirane M. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 2007; 315: 1579-1582
- 12 Omoto S, Fujii YR. Cloning and detection of HIV-1-encoded microRNA. *Methods Mol Biol* 2006; 342: 255-265
- 13 Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R106-R113
- 14 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580-587
- 15 Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg* 2007; 94: 23-30
- 16 Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 2007; 26: 2212-2219
- 17 Kim E, Deppert W. Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J Cell Biochem* 2004; 93: 878-886
- 18 O'Farrell TJ, Ghosh P, Dobashi N, Sasaki CY, Longo DL. Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression. *Cancer Res* 2004; 64: 8199-8207
- 19 Tsuchiya S, Okuno Y, Tsujimoto G. MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 267-270
- 20 Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-173
- 21 Ross JS, Carlson JA, Brock G. miRNA: the new gene silencer. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 830-836
- 22 Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 2007; 115: 1090-1106
- 23 Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, Sandalozopoulos R, Zhang L. miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1375-1386
- 24 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-833
- 25 Hagan JP, Croce CM. MicroRNAs in carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2007; 118: 252-259
- 26 Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006; 25: 6188-6196
- 27 Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med* 2006; 79: 131-140
- 28 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-3756
- 29 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 30 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632
- 31 Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci* 2007; 98: 1482-1490
- 32 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-843
- 33 Mukherjee S, Conrad SE. c-Myc suppresses p21WAF1/CIP1 expression during estrogen signaling and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 17617-17625
- 34 Ikeguchi M, Hirooka Y. Expression of c-myc mRNA in hepatocellular carcinomas, noncancerous livers, and normal livers. *Pathobiology* 2004; 71: 281-286
- 35 Han Y, San-Marina S, Liu J, Minden MD. Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene* 2004; 23: 6933-6941
- 36 Xi Y, Edwards JR, Ju J. Investigation of miRNA Biology by Bioinformatic Tools and Impact of miRNAs in Colorectal Cancer-Regulatory Relationship of c-Myc and p53 with miRNAs. *Cancer Inform* 2007; 3: 245-253
- 37 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 38 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
- 39 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- 40 Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8699-8707
- 41 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
- 42 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- 43 Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53.

■应用要点  
揭示 miRNAs 和 p53 基因在肿瘤形成过程中的相互调控机制, 有利于进一步认识肿瘤的发生机制, 为肿瘤的诊断、治疗提供新的视野。

### ■同行评价

本文内容新颖、  
前沿,具有一定的  
学术价值.

- Cell 2007; 130: 597-600
- 44 Vousden KH. Outcomes of p53 activation-spoilt for choice. *J Cell Sci* 2006; 119: 5015-5020
- 45 Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007; 26: 1306-1316
- 46 Löhr K, Möritz C, Contente A, Dobbstein M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* 2003; 278: 32507-32516
- 47 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038
- 48 Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 2005; 123: 641-653
- 49 Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303: 1010-1014
- 50 Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 2006; 24: 841-851
- 51 Cullen BR. RNAi the natural way. *Nat Genet* 2005; 37: 1163-1165
- 52 Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol* 2006; 342: 295-312
- 53 Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 331-341
- 54 Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007; 213: 412-419
- 55 Mallory AC, Vaucheret H. MicroRNAs: something important between the genes. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7: 120-125
- 56 Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM. Modulating molecular functions of p53 with small molecules. *Cell Cycle* 2006; 5: 2575-2578
- 57 Riley KJ, Maher LJ 3rd. p53 RNA interactions: new clues in an old mystery. *RNA* 2007; 13: 1825-1833
- 58 Raver-Shapira N, Oren M. Tiny actors, great roles: microRNAs in p53's service. *Cell Cycle* 2007; 6: 2656-2661
- 59 Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007; 12: 414-418
- 60 Beckman M. MicroRNAs found cavorting with p53. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1664-1665
- 61 Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 2005; 4: 1179-1184
- 62 Lee YS, Dutta A. MicroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 560-564
- 63 He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 2007; 67: 11099-11101
- 64 Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2006; 2: 113-121
- 65 Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 397-402
- 66 Hellborg F, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 zinc finger protein is highly conserved from fish to man. *Int J Oncol* 2004; 24: 1559-1564
- 67 Méndez Vidal C, Prah M, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs. *FEBS Lett* 2006; 580: 4401-4408
- 68 Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124: 1169-1181
- 69 Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 2006; 24: 841-851
- 70 He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447: 1130-1134
- 71 He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 819-822
- 72 Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26: 745-752
- 73 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15472-15477
- 74 Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 2007; 67: 8433-8438

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

# 早期胚胎发育与肿瘤发生的相关性研究进展

马延磊, 秦环龙

马延磊, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 07DZ19505

作者贡献分布: 本文写作由马延磊完成; 秦环龙审校。

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

电话: 021-64369181-8261

收稿日期: 2008-01-25 修回日期: 2008-02-27

## Research progress in correlation between early embryo development and tumorigenesis

Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin

Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: the Science and Technology Committee Program of Shanghai City, No. 07DZ19505

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

Received: 2008-01-25 Revised: 2008-02-27

### Abstract

With the increased cognition in developmental biology, researchers have discovered the similarity of biological behaviors between early embryo development and tumorigenesis, as well as the important interaction between tumors and embryos. Therefore, it enlightens us to study tumors from the view of developmental biology, which may provide a new clue for tumor therapy. In this article, we review in detail the embryonic origin of tumors, the similarity between early embryo development and tumorigenesis at the level of gene and protein expression, their important biological behaviors, and moreover, the interaction between tumors and embryos from the angle of developmental biology.

Key Words: Developmental biology; Cancer; Embryo

Ma YL, Qin HL. Research progress in correlation between early embryo development and tumorigenesis. *Shijie*

*Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1337-1343

### 摘要

随着对发育生物学领域认识的不断深入, 研究者发现早期胚胎发育与肿瘤发生的生物学行为存在相似之处, 并且胚胎与肿瘤之间存在着重要的相互作用, 为进一步从发育生物学角度去认识肿瘤, 寻求治疗肿瘤开拓了新的思路。本文主要从发育生物学角度阐述肿瘤的胚胎源性, 早期胚胎发育与肿瘤发生在基因、蛋白、代谢水平和其它重要生物学行为方面的相似性, 以及两者之间的相互作用。

关键词: 发育生物学; 肿瘤; 胚胎

马延磊, 秦环龙. 早期胚胎发育与肿瘤发生的相关性研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1337-1343

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1337.asp>

### 0 引言

1970年代Pierce *et al*提出“癌, 一个发育生物学问题”的理论<sup>[1-2]</sup>, 指出肿瘤的发生在很大程度上与发育生物学有着密切的关系。诸多的实验研究表明: 早期胚胎细胞和肿瘤细胞在基因、蛋白、代谢水平以及重要的生物学行为方面存在许多相似之处。为研究肿瘤开拓了一个新的科学思维方法。

### 1 肿瘤的胚胎源性

发育生物学是由胚胎生物学发展起来的, 是应用现代生物学技术研究生物发育机制的科学。他主要研究多细胞生物的发生、受精、胚胎发育、生长直到衰老和死亡, 即研究生物变化过程的科学<sup>[3]</sup>。尤其是对胚胎, 因为胚胎是生物体从受精卵发育到成体的必经之路, 是介于基因型和表型之间的过渡体。发育生物学的核心问题是细胞分化, 而肿瘤的发生正是正常分化调控基因被破坏导致异常分化的结果, 许多肿瘤相关基因也显示出对胚胎正常发育分化的影响<sup>[4]</sup>。这些调控基因是一类决定分化方向的基因, 此类基因突变在肿瘤

### ■背景资料

肿瘤是一种特殊的疾病, 病因复杂, 并且有其特殊的生物学行为, 严重危害着人类的生命和健康。随着分子生物学、分子免疫学、肿瘤免疫学、发育分子生物学及实验胚胎学的发展, 越来越多的实验研究证实了早期胚胎发育和肿瘤发生存在密切的相关性。为从生命现象中去认识和和研究肿瘤提供了一种全新的思路。

### ■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

## ■ 研究前沿

肿瘤的研究是当今生命科学中的热点和难点,从发育生物学角度试图在生命现象中揭示早期胚胎发育和肿瘤发生之间的相关性,从而将胚胎和肿瘤这两种病理生理现象融合在一起进行研究,但目前这些研究仍存在一定的局限性,有待于进一步深入开展相关的工作。

的发生发展中起着重要的作用。

1892年法国生物学家Lobstein和Recamier首次提出肿瘤胚胎性起源的概念,他们认为肿瘤细胞和胚胎细胞有许多相似之处,肿瘤的发生是由于持续存在于体内的胚胎细胞的增殖而形成。1884年Durante也提出了类似的见解。Busch在关于癌的分子生物学一般概念中指出肿瘤细胞的形成是由于正常胚胎发育过程中被阻遏基因得以激活的结果。此后,随着分子生物学、分子免疫学、肿瘤免疫学、发育分子生物学及实验胚胎学的发展,越来越多的实验研究证实了早期胚胎发育和肿瘤发生存在密切的相关性。Williams *et al*<sup>[5]</sup>将疱疹病毒诱发的豹蛙肾癌(Lucke氏肾癌)细胞核移植到去核的受精卵后,得到发育正常的蝌蚪。在人类的畸胎瘤中,也可以看到某些瘤细胞分化后发育形成的胚胎样小体(embryoid bodies),可见癌细胞也可以发育成类似胚胎的组织。反之,把正常6 d小鼠胚胎细胞植入到成年小鼠睾丸内则可形成畸胎瘤。这些都从发育生物学角度证实了肿瘤细胞和受精卵在一定条件下具有互变性,肿瘤细胞也能像受精卵一样发育成类胚胎组织,二者有明显的相似之处<sup>[6]</sup>。Murray *et al*<sup>[7]</sup>发现早期胚胎的滋养层细胞和肿瘤细胞有许多相似之处,早期胚胎发育的滋养层细胞具有植入子宫内膜(亦可认为“侵袭”子宫内膜)的能力,生殖细胞在迁徙和植入过程“误入”定居并“滋养层化”而产生肿瘤组织,从发育生物学角度提出了肿瘤来源于生物体发育过程中某些潜伏的胚胎残余组织的观点。因此有学者认为肿瘤的最终克服将有助于发育生物学相关分子机制的阐明。

## 2 早期胚胎发育与肿瘤发生

从发育生物学角度研究胚胎到肿瘤再从肿瘤回到胚胎,两者之间的相关性对于探知他们之间的发生机制具有重要的作用。近来实验研究表明,早期胚胎发育和肿瘤发生之间的相似性主要集中在基因和蛋白质水平。在其他一些重要的生物学行为方面也存在惊人的相似性<sup>[8-10]</sup>。如在早期胚胎发育过程中胚胎细胞正常分化和增殖的机制与肿瘤细胞非正常分化和增殖的机制、肿瘤的侵袭转移与早期胚胎植入、两者的免疫学逃避机制、血管形成以及调控机制等方面均存在明显的相似性。

2.1 基因水平 在基因水平,肿瘤发生与早期胚胎发育过程具有相似性,早期胚胎在发育中成熟

分裂和体细胞暴露于放射性物质或是类辐射性化学物质等致癌物都共同经历DNA双螺旋的破坏和损伤。二者也共同分享了信号的终止途径,当有一个共同的扳机引起去分化时,卵母细胞从成熟的卵母细胞退出了他们的发育过程,体细胞则可能遭受损害和分裂。在整个发育过程和肿瘤形成过程,结果都是广泛基因组的去甲基化。Jurgens *et al*<sup>[11]</sup>研究表明高度甲基化的启动子和其他基因的沉默子,包含肿瘤的抑癌基因都能同时被观察到,其中高度甲基化可能是伴随基因活动终止的一种默认状态,换句话说,在肿瘤细胞及早期胚胎细胞特定基因的高度甲基化是随着细胞表型向增殖型干细胞转化二者转录减少的结果。然而十分惊奇的是, Baylin *et al*研究显示<sup>[12]</sup>,在早期胚胎发育和肿瘤形成过程中均存在广泛基因组的去甲基化,而甲基化酶和DNA甲基化转移酶的水平实际上均呈现出了非常高的状态。研究表明在早期胚胎发育和肿瘤发生另外一个共同的特性是:作为广泛基因组去甲基化的结果,出现了逆转录转座子的表达和转位的生长。DNA损伤和去甲基化之间的联系以及逆转录转座子的激活和癌的联系已经在相关文献中被报道<sup>[13]</sup>,类似于早期胚胎发育,逆转录转座子也在肿瘤细胞被激活。

人类早期胚胎细胞与肿瘤细胞具有相似的表现型。Monk *et al*<sup>[14-15]</sup>研究表明胚胎期表达的基因在肿瘤中可出现再表达。最近Misirlioglu *et al*<sup>[16]</sup>在试验中也证实了肿瘤细胞有胚胎性基因的表达。在早期胚胎发育阶段,精子和卵子细胞的结合体经历着基因组广泛的去甲基化,某些与肿瘤相关的基因亦呈现高表达。癌细胞也具有无限增殖、自我更新的潜能、未分化和侵袭性,因此,肿瘤细胞和早期的胚胎细胞所共同表达的基因,一般是与去分化及回到未分化和无限增殖的干细胞状态相关的基因,以及与维持这种状态相关的特异性基因。这些特异性基因在正常成人的体细胞不能表达,因为体细胞要遭受分化和衰老。

Monk *et al*<sup>[15]</sup>利用胚胎性cDNAs与体细胞cDNAs进行对比,来分离早期胚胎发育期特异性的差异表达序列。从中得到了5种明显差异基因,其中3种差异基因在胚胎和肿瘤中都有表达,而在正常体细胞不能显示。后从EMBL数据库中查得这3种基因的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs),并进一步列出了这3种基

表 1 胎源性肿瘤标志物

名称	性质	主要相关肿瘤
甲胎蛋白	糖蛋白M, 70 000	肝肿瘤、胚细胞肿瘤(非精原细胞瘤)等
癌胚抗原	糖蛋白M, 180 000	结直肠、胰腺、肺、乳腺肿瘤等
鳞状细胞抗原	糖蛋白M, 44 000-48 000	肺、皮肤、头、颈部肿瘤
Survivin蛋白	糖蛋白M, 16 500	乳腺癌、肺癌等
癌抗原199	糖蛋白M, 5000 000	结直肠癌、胰腺癌、卵巢
前列腺特异性抗原	蛋白酶M, 16 500	前列腺癌等
组织多肽特异性抗原	细胞角蛋白8、细胞角蛋白18 细胞角蛋白19	乳腺、结肠肿瘤等
人绒毛膜促性腺激素	糖蛋白M, 38 000	绒毛膜癌、葡萄胎等

## ■ 相关报道

早期胚胎发育和肿瘤发生之间的相关性已有不少的研究和报道, 国内外的研究主要集中在两者之间是否存在密切联系和相互作用。

因的差异序列和上游基因序列. 从中鉴定出了一个已知基因为OTC-4, 其他两个为未知基因, 其中一个未知基因序列在3'末端匹配一个944 bp的序列, 定位于染色体3q13.13; 另一个未知基因的差异显示序列在3'末端匹配一个总片段为1062 bp启动转录子的8基因序列, 定位于染色体3p25.2. 这三个基因的功能可能与体细胞向具有未分化特性的增殖型干细胞去分化有关, 以致于形成肿瘤, 并与早期胚胎的发育密切相关. 另外, Baudino *et al*<sup>[17]</sup>研究发现癌基因*c-myc*在多种肿瘤组织可见其高表达. *c-myc*基因也在小鼠卵母细胞、精子细胞及胚胎发育的4细胞至桑椹胚期均呈高表达, 并与这些时期细胞指数分化相关. Wenzel *et al*<sup>[18]</sup>最新研究发现抑癌基因*Rb*在胚胎组织中的表达与滋养层细胞的增殖分化相关, *Rb*基因的失活可致胚胎滋养层细胞过度增殖, 分化紊乱, 进而使胚胎发育中断和死亡.

**2.2 蛋白质水平** 在人类发育过程中, 许多原本只在胎盘时才具有的蛋白类物质, 随胎儿的出生而逐渐停止合成和分泌, 但因某种因素的影响, 特别是在肿瘤状态时, 会使得机体一些“关闭”的基因得以重新激活, 出现了返祖现象, 而重新生成和分泌这些胚胎、胎儿期的蛋白. 这类蛋白虽然与肿瘤组织不一定都具有特定的相关性, 但与肿瘤的发生发展存在着内在的联系, 并且可作为一种较为常见的肿瘤标志物, 在临床早期诊断、治疗和预后的判断中起着重要的意义. 目前胎源性肿瘤标志物主要分为四类: 蛋白质(抗原)类、碳水化合物类、糖脂类和激素类. 其中应用于临床且具有临床诊断价值的胎源性肿瘤标志物主要是癌胚蛋白质(抗原)类. 这些胎源性肿瘤标志物的发育生物学研究主要集中在其生物学行为、机体分布以及临床应用等方面. 目前大量实验研究证实

并应用于临床的胎源性肿瘤标志物主要有: 甲胎蛋白<sup>[19-21]</sup>、癌胚抗原<sup>[22-25]</sup>、鳞状细胞抗原<sup>[26-28]</sup>、Survivin蛋白<sup>[29-31]</sup>、癌抗原199<sup>[32-33]</sup>、前列腺特异性抗原<sup>[34-37]</sup>、组织多肽特异性抗原<sup>[38-40]</sup>、人绒毛膜促性腺激素<sup>[41-43]</sup>等(表1).

肿瘤和早期胚胎发育期所表达的这些蛋白与细胞的增殖有着极其重要的联系, 他们在胎儿早期的增殖发育和肿瘤组织中以很高的浓度表达, 在生物体液及相应的组织中研究这些胎源性蛋白类物质有助于理解并阐释胎儿和肿瘤组织相似的免疫学机制, 以及在很大程度上提高他们的早期诊断价值和临床应用. Wilczyński *et al*<sup>[44]</sup>研究表明早期胚胎发育和肿瘤形成分享着相似的免疫学逃逸机制. 这些胎源性蛋白在肿瘤组织中主要抑制了宿主的免疫系统, 干扰机体对恶性肿瘤细胞生长的调控并通过刺激抑制因子IL-4、IL-10来调整宿主的防御反应<sup>[45]</sup>. 由于缺乏前炎症细胞因子的合成, 在很大程度上会影响细胞因子的平衡, 这将使机体的免疫系统受到抑制并导致宿主对异常细胞的免疫耐受. 在胎儿生长发育期间, 由于多种因素对这些胎源性蛋白的影响使得机体产生大量的特异性标志物, 以影响母体免疫系统, 产生母体对胎儿组织的耐受, 这与宿主对致癌因子的防御作用完全相似<sup>[46]</sup>.

另外, 在胚胎早期发育过程中开始产生的一些激素如人类绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)、促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)也在特定的肿瘤细胞中大量合成. 早期胚胎发育与肿瘤形成所表达蛋白的相似性表明, 肿瘤形成和早期胚胎发育可能存在着必然的联系, 但仍需要大量的实验去证实.

**2.3 重要生物学行为** 早期胚胎发育与肿瘤形成

### ■创新盘点

本文从发育生物学角度较为全面的综述了早期胚胎发育和肿瘤发生的相关性,重点阐述早期胚胎发育和肿瘤发生在基因、蛋白、代谢水平和其他重要生物学行为方面的相似性。

除了在基因和蛋白质水平具有相似性外,还有其他生物学行为方面的相似性。如:(1)在代谢水平,癌细胞的代谢与某些早期发育的胚胎细胞相似,并且使得肿瘤细胞中特异性酶的活性和其同工酶的谱型都向早期胚胎发育时期靠拢;(2)在增殖和分化方面,早期胚胎发育过程中胚胎细胞正常分化和增殖的机制与肿瘤细胞非正常分化和增殖的机制之间存在明显的相似性,并且肿瘤细胞和胚胎细胞均为增殖力强并处于分化早期的细胞<sup>[15]</sup>;(3)胚胎植入和肿瘤的侵袭、转移具有相似性,Dvorak *et al*<sup>[47]</sup>在研究胚胎植入的实验中发现,胚胎植入于子宫内膜的过程也有大量肿瘤形成过程中癌基因的表达,如:*c-met*<sup>[48-49]</sup>、*c-fms*<sup>[50-51]</sup>、*c-kit*<sup>[52-54]</sup>、*fgf-2*<sup>[55-57]</sup>、*src*<sup>[58-61]</sup>等。Michael *et al*<sup>[62]</sup>在研究胚胎植入和肿瘤转移的关系时,发现二者具有相似的侵袭和血管发生方式,其中主要是肿瘤细胞具有和早期胚胎相似的侵袭性细胞表型,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及众多的细胞黏附分子参与了早期胚胎滋养层细胞植入于子宫内膜和肿瘤侵袭、转移的过程。(4)免疫逃逸机制的相似性<sup>[19-21]</sup>,已在上面蛋白质水平的相似性做了阐述。(5)细胞因子及信号转导通路的相似性,Xie *et al*<sup>[63]</sup>研究发现Hedge信号传导通路不仅在胚胎发育过程中起着至关重要的作用,而且与人类许多肿瘤的发生发展也具有密切关系。Wu *et al*<sup>[64]</sup>在研究中指出Notch信号传导通路既是肿瘤恶变的重要机制也是早期胚胎发育的重要调控信号。

### 3 早期胚胎发育与肿瘤发生相互作用

肿瘤发生和胚胎发育二者之间存在着错综复杂的联系和相关性,肿瘤细胞在胚胎性微环境中可以失去其恶性表型,而胚胎离开其发育的微环境也可以产生肿瘤,在胚胎性环境肿瘤细胞可以参与正常组织分化,并且在胚胎微环境中存在诱导幼稚细胞向成熟细胞的分化,目前关于早期胚胎发育和肿瘤之间的相互作用研究主要集中在小鼠。

早在1980年代,Papayioannou *et al*<sup>[65]</sup>将两个二倍体的胚胎性癌细胞系P10和P19注入小鼠囊胚后,P10细胞系在桑椹胚中聚集,并且产生了大部分正常的嵌合体,其中的原因可能是这两种细胞系都能与桑椹胚细胞及囊胚的内细胞群(inner cell mass, ICM)形成功能上的间隙连接有关,同时也提示了移植于囊胚的肿瘤细胞被接纳并影响和参与了胚胎的发育。Tzukerman

*et al*<sup>[66]</sup>在研究人类胚胎干细胞所衍生的胚胎微环境对实体瘤的影响时,将稳定表达H2A绿荧光蛋白(H2A-green fluorescence protein)融合蛋白的实体瘤细胞注入畸胎瘤中,也形成了相应的肿瘤,说明肿瘤细胞与外周组织微环境和间质的反应在肿瘤发生中担任着重要的角色。

Muller *et al*<sup>[67]</sup>利用显微注射方法,将人的KG-1髓系白血病细胞和原发性的急性髓系白血病(acute myeloid leukaemia, AML)细胞注入妊娠期3.5 d(embryonic day 3.5 of gestation, E3.5)的小鼠囊胚,通过发育产生异源性嵌合体 and 成鼠,在妊娠期12.5 d(embryonic day 3.5 of gestation, E12.5)可以追踪并观察到两种髓系白血病细胞的标记,结果在妊娠期12.5 d嵌合的中孕期小鼠和成鼠中均无肿瘤的形成,并且在妊娠期12.5 d嵌合的中孕期小鼠激起了红细胞系统特异性的人球蛋白(erythroid-specific human globin)和血型糖蛋白A(glycophorin A)表达。换句话说,也就是髓系白血病细胞表型出现了向正常红细胞系分化的标志。从而说明了鼠类胚胎微环境可以诱导人类肿瘤细胞的分化,并且胚胎微环境也可以控制肿瘤细胞的生存和转变肿瘤细胞的恶性表型。Hochedlinger *et al*<sup>[68]</sup>也在相似的实验中证实了胚胎微环境可能存在调控肿瘤细胞向特定细胞分化并改变其恶性表型的机制。

Cheng *et al*<sup>[69]</sup>利用显微注射方法将白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)反义寡核苷酸序列注入大鼠早期胚胎,发现注入4 fmol LIF的胚胎未能分裂增殖发育到四细胞阶段,分别注入0.5 fmol和1.0 fmol的胚胎发育到桑椹胚和胚泡期阶段所占有的比例呈现了显著的下降,表明了LIF反义寡核苷酸序列抑制了鼠类早期胚胎的发育,这也提示早期胚胎发育需要一个特定的微环境,这种特定微环境中某个因素的改变将在很大程度上影响胚胎的早期发育。

近来有研究报道基因型正常的胚胎干细胞向同系的小鼠腹腔移植可以产生极度恶性的肿瘤。Papayioannou *et al*<sup>[65]</sup>在研究中发现将小鼠囊胚移植到子宫外导致了恶性畸胎瘤的生长,也表明了胚胎的早期发育离不开自身所需要的微环境,早期胚胎和肿瘤不同的归属,可能是由于所处微环境的不同所造成的,但这需要以后大量的实验进行验证。

### 4 结论

从发育生物学角度研究早期胚胎发育与肿瘤发生的相关性,探索胚胎和肿瘤之间的相互作用,

将有助于揭示生命早期的发育和调控机制, 进一步从生命现象中认识肿瘤, 同时也给科学工作者从另一个视角去研究肿瘤提供了一种全新的思路. 但从发育生物学角度试图揭示肿瘤仍存在一定的局限性, 早期胚胎发育和肿瘤发生的相关性仍需大量的实验验证.

## 5 参考文献

- Pierce GB. The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. *Am J Pathol* 1983; 113: 117-124
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
- Snider P, Conway SJ. Developmental biology: the power of blood. *Nature* 2007; 450: 180-181
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- Williams JW 3rd, Carlson DL, Gadson RG, Rollins-Smith L, Williams CS, McKinnell RG. Cytogenetic analysis of triploid renal carcinoma in *Rana pipiens*. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 18-22
- Bignold LP, Coghlan BL, Jersmann HP, Hansemann, Boveri, chromosomes and the gametogenesis-related theories of tumours. *Cell Biol Int* 2006; 30: 640-644
- Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 275-290
- Stoika RS, Panchuk RR, Stoika BR. The similarities and the differences of embryogenesis and carcinogenesis. *Ontogenez* 2004; 35: 85-90
- Papaioannou VE. Ontogeny, pathology, oncology. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 33-37
- Jurgens B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 5698-5703
- el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3470-3474
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2545-2550
- Monk M. Of microbes, mice and man. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 497-507
- Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 8085-8091
- Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL, Memili E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18905-18910
- Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002; 16: 2530-2543
- Wenzel PL, Wu L, de Bruin A, Chong JL, Chen WY, Dureska G, Sites E, Pan T, Sharma A, Huang K, Ridgway R, Mosaliganti K, Sharp R, Machiraju R, Saltz J, Yamamoto H, Cross JC, Robinson ML, Leone G. Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population. *Genes Dev* 2007; 21: 85-97
- Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-1181
- Chen H, Egan JO, Chiu JF. Regulation and activities of alpha-fetoprotein. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7: 11-41
- Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM. Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res* 1972; 32: 979-982
- Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481
- Nap M, Mollgard K, Burtin P, Fleuren GJ. Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol* 1988; 9: 145-153
- Ryu JS, Lee HJ, Cho JH, Han HS, Lee HL. The implication of elevated carcinoembryonic antigen level in pleural fluid of patients with non-malignant pleural effusion. *Respirology* 2003; 8: 487-491
- Soletormos G, Nielsen D, Schioler V, SSKovsgaard T, Dombernowsky P. Tumor markers cancer antigen 15.3, carcinoembryonic antigen, and tissue polypeptide antigen for monitoring metastatic breast cancer during first-line chemotherapy and follow-up. *Clin Chem* 1996; 42: 564-575
- Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, Kamachi Y, Chatson K, Fries J, Silverman GA, Upton MP. Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 113-122
- Takeshima N, Suminami Y, Takeda O, Abe H, Kato H. Origin of CA125 and SCC antigen in human amniotic fluid. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1993; 19: 199-204
- Dibbelt L, Knuppen R, Bobrowski A. Squamous cell carcinoma antigen immunoactivity is normal in maternal serum but high and increasing in amniotic fluid during pregnancy. *Clin Chem* 1992; 38: 2161-2162
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- Jaskoll T, Chen H, Min Zhou Y, Wu D, Melnick M. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development. *BMC Dev Biol* 2001; 1: 5
- Megliorino R, Shi FD, Peng XX, Wang X, Chan EK, Tan EM, Zhang JY. Autoimmune response to anti-apoptotic protein survivin and its association with antibodies to p53 and c-myc in cancer detection. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 241-248
- Hohlfeld P, Dang TT, Nahoul K, Daffos F, Forestier F. Tumour-associated antigens in maternal and fetal blood. *Prenat Diagn* 1994; 14: 907-912
- Engelen MJ, de Bruijn HW, Hollema H, ten Hoor KA, Willemsse PH, Aalders JG, van der Zee AG. Serum CA 125, carcinoembryonic antigen, and CA 19-9 as tumor markers in borderline ovarian

## ■应用要点

本文有助于揭示生命早期的发育和调控机制, 进一步从生命现象中认识肿瘤, 为从一个新的视角去研究肿瘤提供了一种全新的思路, 同时也为寻求治疗肿瘤开拓了新的视野.

### ■名词解释

发育生物学: 由胚胎生物学发展起来, 是应用现代生物学技术研究生物发育机制的科学。他主要研究多细胞生物的发生、受精、胚胎发育、生长直到衰老和死亡, 即研究生物变化过程的科学。尤其是对胚胎, 因为胚胎是生物体从受精卵发育到成体的必经之路, 是介于基因型和表型之间的过渡体。发育生物学核心问题是细胞分化。

- tumors. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 16-20
- 33 Chu TM. Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer. *Tumour Biol* 1997; 18: 123-134
- 34 Yu H, Berkel H. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc* 1999; 151: 209-213
- 35 Vukotic V, Cerovic S, Kozomara M, Lazic M. The predictive value of PSA in diagnosis of prostate cancer in non screened population. *Acta Chir Iugosl* 2005; 52: 81-87
- 36 Malatesta M, Mannello F, Luchetti F, Marcheggiani F, Condemi L, Papa S, Gazzanelli G. Prostate-specific antigen synthesis and secretion by human placenta: a physiological kallikrein source during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 317-321
- 37 Kassanos D, Botsis D, Rizos D, Kontoravdis A, Sikiotis K, Phocas I, Sarandakou A, Creatsas G. Tissue polypeptide specific antigen (TPS) throughout normal pregnancy. *Anticancer Res* 2000; 20: 2129-2131
- 38 Sarandakou A, Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Rigopoulou U, Papagianni B, Creatsas G. Indicative markers of cell proliferation and apoptosis during the perinatal period. *Am J Perinatol* 2003; 20: 283-288
- 39 Rebhandl W, Felberbauer FX, Paya K, Rami B, Bancher-Todesca D, Bieglmayer C, Horcher E. Tissue polypeptide-specific antigen in pediatric patients: assessment of normal values. *Med Pediatr Oncol* 1997; 29: 218-221
- 40 Vaitukaitis JL. Human chorionic gonadotropin--a hormone secreted for many reasons. *N Engl J Med* 1979; 301: 324-326
- 41 Avgidou K, Papageorgiou A, Bindra R, Spencer K, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30,564 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1761-1767
- 42 Farghaly SA. Tumor markers in gynecologic cancer. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 34: 65-72
- 43 Wilczyński JR. Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. *Chemotherapy* 2006; 52: 107-110
- 44 Inglot AD, Gelder F, Georgiades JA. Tumor-associated antigens are cytokine inducers and hyporeactivity factors to the immune system. *Biotherapy* 1998; 11: 27-37
- 45 Cheli CD, Morris DL, Neaman IE, Dai J, Allard WJ, Yeung KK. Measurement of four tumor marker antigens in the sera of pregnant women. *J Clin Lab Anal* 1999; 13: 35-39
- 46 Dvorak P, Dvorakova D, Hampl A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett* 2006; 580: 2869-2874
- 47 Lee SW, Kang SB, Kim YS, Nam SW, Lee DS, Lee HK, Han SW. Expression of c-erbB-2 and c-met Proteins in Gastric Adenoma and Adenocarcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 152-157
- 48 Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, Fukayama M. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1006-1013
- 49 Fulop V, Mok SC, Genest DR, Szigetvari I, Cseh I, Berkowitz RS. c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med* 1998; 43: 101-110
- 50 Cheung AN, Srivastava G, Pittaluga S, Man TK, Ngan H, Collins RJ. Expression of c-myc and c-fms oncogenes in trophoblastic cells in hydatidiform mole and normal human placenta. *J Clin Pathol* 1993; 46: 204-207
- 51 Kimura W, Ma J, Takeshita A, Yamamoto T, Moriya T, Hirai I, Fuse A. Analysis of c-kit protein expression in pancreatic neoplasms and its implication for prognosis. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2203-2208
- 52 Tang M, Li DQ. Expression and gene mutation of phospho-platelet derived growth factor receptor alpha and C-kit in gastrointestinal and extra-gastrointestinal stromal tumors. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2008; 11: 80-83
- 53 LaPointe RJ, Bourne PA, Wang HL, Xu H. Coexpression of c-kit and bcl-2 in small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 401-406
- 54 Dahl M. Networking with fibrinogen: a prerequisite for fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-stimulated tumor growth? *J Thromb Haemost* 2008; 6: 174-175
- 55 Nakawatari M, Iwakawa M, Ohno T, Kato S, Tamaki T, Imadome K, Sakai M, Tsujii H, Imai T. Chemoradiation-Induced Expression of Fibroblast Growth Factor-2 and Laminin in Patients with Cervical Cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 6
- 56 Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, Presta M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 327-334
- 57 Hashimoto Y, Naruyama H, Ando R, Okada S, Tozawa K, Kohri K. Molecular targeted therapy for prostate cancer. *Hinyokika Kyo* 2008; 54: 57-61
- 58 Emaduddin M, Bicknell DC, Bodmer WF, Feller SM. Cell growth, global phosphotyrosine elevation, and c-Met phosphorylation through Src family kinases in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2358-2362
- 59 Zhang J, Kalyankrishna S, Wislez M, Thilaganathan N, Saigal B, Wei W, Ma L, Wistuba II, Johnson FM, Kurie JM. SRC-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines. *Am J Pathol* 2007; 170: 366-376
- 60 Kopetz S, Shah AN, Gallick GE. Src continues aging: current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7232-7236
- 61 Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 275-290
- 62 Xie K, Abbruzzese JL. Developmental biology informs cancer: the emerging role of the hedgehog signaling pathway in upper gastrointestinal cancers. *Cancer Cell* 2003; 4: 245-247
- 63 Wu F, Stutzman A, Mo YY. Notch signaling and its role in breast cancer. *Front Biosci* 2007; 12: 4370-4383
- 64 Papaioannou VE, Waters BK, Rossant J. Interactions between diploid embryonal carcinoma cells and early embryonic cells. *Cell Differ* 1984; 15: 175-179
- 65 Tzukerman M, Rosenberg T, Reiter I, Ben-Eliezer S, Denkberg G, Coleman R, Reiter Y, Skorecki K. The influence of a human embryonic stem cell-derived

- microenvironment on targeting of human solid tumor xenografts. *Cancer Res* 2006; 66: 3792-3801
- 66 Durr M, Harder F, Merkel A, Bug G, Henschler R, Muller AM. Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts. *Oncogene* 2003; 22: 9185-9191
- 67 Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, Jaenisch R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev* 2004; 18: 1875-1885
- 68 Cheng TC, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Huang CY, Lee MS, Liu JY. Leukemia inhibitory factor antisense oligonucleotide inhibits the development of murine embryos at preimplantation stages. *Biol Reprod* 2004; 70: 1270-1276

■同行评价  
本文虽有一些有一定争议的观点, 但可引发肿瘤研究的新思路, 综述相对全面, 具有较大的科学价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、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<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>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<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# HBsAg负载的慢性乙肝患者DCs诱导特异性Th1细胞分化的作用

吴琼, 汪晓莺, 周晓荣, 汤伟, 苏丽

## ■背景资料

慢性乙肝是由乙型肝炎病毒(HBV)持续感染引起的。目前, T细胞免疫应答被认为是机体清除HBV的基本机制, 急性自限性HBV感染者体内存在高效, 多克隆, 特异性CD4<sup>+</sup> T和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞反应, 可以彻底清除体内的病毒, 并可抵抗病毒的再次入侵。

吴琼, 南通市肿瘤医院生物治疗中心 江苏省南通市 226001  
汪晓莺, 周晓荣, 苏丽, 南通大学医学院微生物学与免疫学教研室 江苏省南通市 226001

汤伟, 南通大学医学院传染病学教研室 江苏省南通市 226001

作者贡献分布: 此课题由汪晓莺老师设计; 研究过程由吴琼, 周晓荣, 苏丽, 汪晓莺及汤伟操作完成; 病例标本由汤伟老师提供; 数据分析由吴琼完成; 本论文写作由汪晓莺, 吴琼完成。

通讯作者: 汪晓莺, 226001, 江苏省南通市启秀路19号, 南通大学医学院微生物学与免疫学教研室. tdfy16302@163.com

电话: 0513-85051735

收稿日期: 2007-09-10 修回日期: 2008-03-12

## Effect of dendritic cells loaded with HBsAg on the differentiation of HBsAg-specific T helper 1 cells in patients with chronic hepatitis B

Qiong Wu, Xiao-Ying Wang, Xiao-Rong Zhou, Wei Tang, Li Su

Qiong Wu, Department of Biotherapy Center, Nantong Tumor Hospital, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Xiao-Ying Wang, Xiao-Rong Zhou, Li Su, Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Wei Tang, Department of Lemology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Ying Wang, Department of Microbiology and Immunology, Medical College, Nantong University, 19 Qixiu Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. tdfy16302@163.com

Received: 2007-09-10 Revised: 2008-03-12

## Abstract

**AIM:** To investigate the influence of dendritic cells (DCs) loaded with HBsAg from peripheral blood monocytes of patients with chronic hepatitis B (CHB) on the differentiation of autologous T helper 1 (Th1).

**METHODS:** Mononuclear cells were isolated from CHB patients using the methods of density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque) and adherence. The adherent monocytes were incubated with recombinant human GM-CSF and interleukin-4 (IL-4) to induce DC generation. The phenotypes on DCs including CD80,

CD86, CD40 and HLA-DR were determined by flow cytometry (FCM). DCs' ability to stimulate allogenic mixed lymphocyte reaction (AMLR) was detected by CCK-8 assay. The concentration of IL-12 in DC supernate was tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). CD4<sup>+</sup> Th cell subpopulation in peripheral blood of CHB patients was isolated and purified by immunomagnetic beads. Subsequently, purified CD4<sup>+</sup> Th cells were co-cultured with autologous mature DCs. The differentiation of Th1/Th2 was detected by FCM using intracellular staining of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and IL-4. ELISA assay was also used to quantify the IFN- $\gamma$  and IL-4 in co-culture supernate.

**RESULTS:** In comparison with those in the control group, the expression levels of CD80, CD86, CD40 and HLA-DR and the concentration of IL-12 in DC supernate of the IFN- $\gamma$  group, HBsAg group and HBsAg + IFN- $\gamma$  group were higher, and the capability of DCs to stimulate allogenic lymphocytes to proliferate in the three groups was also stronger. Meanwhile, the percentages of Th1 cells in CD4<sup>+</sup> T cells and the level of IFN- $\gamma$  in co-culture supernate of the IFN- $\gamma$  group, HBsAg group and HBsAg + IFN- $\gamma$  group were higher (Th1 cells: 10.76%  $\pm$  3.98%, 11.43%  $\pm$  4.32%, 15.28%  $\pm$  4.73% vs 7.84%  $\pm$  3.10%,  $P < 0.01$ ; IFN- $\gamma$ : 578  $\pm$  47 mg/L, 496  $\pm$  92 mg/L, 784  $\pm$  97 mg/L vs 342  $\pm$  34 mg/L,  $P < 0.05$ ). However, the percentages of Th2 cells in CD4<sup>+</sup> T cells and the level of IL-4 in the three groups were lower (Th2 cells: 1.43%  $\pm$  0.96%, 1.68%  $\pm$  0.16%, 0.92%  $\pm$  0.21% vs 2.61%  $\pm$  1.27%,  $P < 0.01$ ; IL-4: 187  $\pm$  52 mg/L, 169  $\pm$  38 mg/L, 89  $\pm$  37 mg/L vs 226  $\pm$  48 mg/L,  $P < 0.05$ ). The most significant effect was observed in the HBsAg + IFN- $\gamma$  group.

**CONCLUSION:** DCs loaded with HBsAg can improve the insufficient differentiation of Th1 cells resulted from dysfunction of DCs *in vivo* in CHB patients.

**Key Words:** Dendritic cell; Chronic hepatitis B; T helper 1/T helper 2; Cytokine; Flow cytometry; Enzyme linked immunosorbent assay

## ■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

Wu Q, Wang XY, Zhou XR, Tang W, Su L. Effect of dendritic cells loaded with HBsAg on the differentiation of HBsAg-specific T helper 1 cells in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1344-1349

## 摘要

**目的:** 研究HBsAg负载的慢性乙肝患者外周血树突状细胞(dendritic cells, DCs)对自身Th1细胞分化的诱导作用。

**方法:** Ficoll密度梯度离心和贴壁法分离慢性乙肝患者外周血单核细胞, 以含rhIL-4+rhGM-CSF的完全培养基诱导DCs. 流式细胞术检测各组DC表面CD80, CD86, CD40和HLA-DR分子的表达, CCK-8法检测各组DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力, ELISA法检测各组DCs培养液上清中IL-12的水平. 免疫磁珠分选慢性乙肝患者外周血CD4<sup>+</sup> T细胞, 分别与患者自身的DCs共培养, 细胞内细胞因子染色, 流式细胞仪检测共培养后CD4<sup>+</sup> T细胞内特征性细胞因子IFN- $\gamma$ 和IL-4, ELISA法检测共培养上清中IFN- $\gamma$ /IL-4的水平。

**结果:** 与对照组相比, HBsAg、IFN- $\gamma$ 和HBsAg+IFN- $\gamma$ 组DCs表面表达CD80, CD86, CD40和HLA-DR分子水平较高; 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力较强; DCs分泌的上清液中, IL-12水平也较高. 与对照组相比, HBsAg、IFN- $\gamma$ 和HBsAg+IFN- $\gamma$ 组DCs与自身Th细胞共培养后, Th1细胞占CD4<sup>+</sup> T细胞的百分比升高(10.76% $\pm$ 3.98%, 11.43% $\pm$ 4.32%, 15.28% $\pm$ 4.73% vs 7.84% $\pm$ 3.10%,  $P<0.01$ ), Th2细胞占CD4<sup>+</sup> T细胞的百分比降低(1.43% $\pm$ 0.96%, 1.68% $\pm$ 0.16%, 0.92% $\pm$ 0.21% vs 2.61% $\pm$ 1.27%,  $P<0.01$ ), 共培养上清中IFN- $\gamma$ 的水平增高(578 $\pm$ 47 mg/L, 496 $\pm$ 92 mg/L, 784 $\pm$ 97 mg/L vs 342 $\pm$ 34 mg/L,  $P<0.05$ ), IL-4的水平降低(187 $\pm$ 52 mg/L, 169 $\pm$ 38 mg/L, 89 $\pm$ 37 mg/L vs 226 $\pm$ 48 mg/L,  $P<0.05$ ), 以HBsAg+IFN- $\gamma$ 组最为明显。

**结论:** 经HBsAg负载的DCs可以改善患者体内因DCs功能低下而引起的Th1细胞分化不足的状态。

**关键词:** 树突状细胞; 慢性乙型肝炎; Th1/Th2; 细胞因子; 流式细胞术; 酶联免疫吸附试验

吴琼, 汪晓莺, 周晓荣, 汤伟, 苏丽. HBsAg负载的慢性乙肝患者DCs诱导特异性Th1细胞分化的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1344-1349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1344.asp>

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

## 0 引言

慢性乙型肝炎(简称慢性乙肝)是由乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染引起的. 目前, T细胞免疫应答被认为是机体清除HBV的基本机制, 急性自限性HBV感染者体内存在高效, 多克隆, 特异性CD4<sup>+</sup> T和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞反应, 可以彻底清除体内的病毒, 并可抵抗病毒的再次入侵. 然而, 慢性乙肝患者体内, 这种免疫应答程度较弱甚至检测不到<sup>[1-2]</sup>. 以往的研究主要集中在细胞毒性T细胞, 近年来的研究表明CD4<sup>+</sup> T细胞和树突状细胞也扮演了非常重要的角色. Bocher *et al*<sup>[3]</sup>研究表明慢性乙肝患者体内Th1反应不足和HBV的持续感染密切相关。

研究表明, 多种因素会影响机体外周血Th1/Th2的分化, 其中DC作为目前发现的功能最强的抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC), 也是唯一能激活初始T细胞的APC, 被认为是影响Th1/Th2分化的最重要因素. 研究发现, 慢性乙肝患者DCs存在功能缺陷, 可能进而导致患者体内Th1反应不足<sup>[4-5]</sup>. 因此, 我们研究HBsAg负载的慢性乙肝患者外周血单核细胞来源的DC对自身Th1细胞分化的诱导作用, 为DC将来作为疫苗应用于治疗HBV持续感染提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** rhGM-CSF(北京宝赛生物技术有限公司), rhIL-4(R&D Systems, Inc.), rhIL-2(南京军事科学医学院), rhIFN- $\gamma$ (PROMEGA), CD80鼠抗人mAb(BioLegend), CD86鼠抗人mAb、CD40鼠抗人mAb(晶美生物工程有限公司), HLA-DR鼠抗人mAb(Caltag Laboratories), IL-4鼠抗人mAb、IFN- $\gamma$ 鼠抗人mAb(R&D Systems, Inc.), FITC羊抗鼠mAb、PE或FITC鼠IgG(SABC). RPMI 1640培养液(Gibco公司), 小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司), 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司), HBsAg(南京军事科学医学院), CCK-8 kit(北京同仁科技有限公司), IL-12 ELISA kit(晶美生物工程有限公司), Dynal CD4<sup>+</sup> positive isolation kit(Dynal), PMA、Monensin(晶美生物工程有限公司), Fix&Prem kit(Caltag), Ionomycin(ALEX), IL-4检测试剂盒、IFN- $\gamma$ 检测试剂盒(上海森雄科技有限公司进口分装), 倒置相差显微镜(Leica), DG5031酶标仪(南京华东电子集团有限公司), 流式细胞仪(Becton Dickinson).

**1.2 方法** 南通大学附属医院肝炎门诊患者28例, 男15例, 女13例, 年龄22-56(平均38.9 $\pm$ 11.4)岁,

## ■ 研发前沿

初始型Th细胞选择性向Th1/Th2分化的机制一直是免疫学界的研究热点。

### ■相关报道

研究表明,多种因素会影响机体外周血Th1/Th2的分化,其中DC作为目前发现的功能最强的抗原呈递细胞,也是唯一能激活初始T细胞的APC.

表 1 培养8 d慢性乙肝患者DC的表型 (mean ± SD, %, n = 10)

分组	CD40	HLA-DR	CD80	CD86
对照组	28.0 ± 4.3	65.4 ± 7.9	42.3 ± 6.1	46.2 ± 4.8
HBsAg	39.7 ± 3.9 <sup>b</sup>	72.9 ± 5.9 <sup>b</sup>	61.0 ± 5.5 <sup>b</sup>	55.5 ± 5.7 <sup>b</sup>
IFN-γ	39.8 ± 4.0 <sup>b</sup>	74.8 ± 4.0 <sup>b</sup>	62.3 ± 5.9 <sup>b</sup>	51.9 ± 4.9 <sup>b</sup>
HBsAg+IFN-γ	65.0 ± 4.7	90.0 ± 5.2	73.3 ± 6.6	72.1 ± 3.9

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组, HBsAg+IFN-γ组.

根据2000年西安会议修订的病毒性肝炎诊断标准临床确诊为慢性乙型肝炎患者<sup>[6]</sup>, HBVM均为HBsAg(+), HBeAg(+), 抗-HBcIgM(+), HBV DNA(+). 实验分4组: 对照组、HBsAg组、IFN-γ组和HBsAg+IFN-γ组. Ficoll密度梯度离心法分离慢性乙肝患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 贴壁2 h去除悬浮细胞获得单核细胞. 分4组进行诱导, 对照组每孔加入含rhIL-4(50 μg/L)、rhGM-CSF(100 μg/L)的DC培养液1 mL; IFN-γ组和HBsAg+IFN-γ组在DC培养液的基础上第1天加入rhIFN-γ(10 μg/L); HBsAg组和HBsAg+IFN-γ组在培养的第4天加入HBsAg(10 μg/L), 各组均置37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>温箱中培养7 d, 每3 d换液补充细胞因子.

1.2.1 DC的表型分析: DC培养的第8天收集细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9$ /L, 离心, 100 μL流式缓冲液重悬沉淀细胞, 分别加入PE标记的鼠抗人CD86, HLA-DR mAb和FITC标记的鼠抗人CD40、CD80 mAb, 同时用PE或FITC标记的小鼠IgG抗体为对照. 4℃暗处标记30 min, 洗涤2次, 24 h内流式细胞仪(FACS)检测.

1.2.2 同种异体混合淋巴细胞反应(AMLR): 取同一健康人外周血常规分离获得PBMC, 调整细胞浓度, 以 $1 \times 10^5$ /孔接种于96孔板. DC分别按 $1 \times 10^4$ /孔(DC: PBMC = 1: 10),  $2 \times 10^3$ /孔(DC: PBMC = 1: 50)加入, 每孔设3个复孔. 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育96 h, CCK-8 kit检测各孔吸光度. 计算刺激指数(stimulating index, SI)表示增殖情况.  $SI = \text{实验孔}A_{490}/\text{阴性对照孔}A_{490}$ .

1.2.3 IL-12的水平: 收集对照组、IFN-γ组、HBsAg组和HBsAg+IFN-γ组培养第8天的DC上清, -20℃保存, 一并按IL-12 ELISA kit操作说明检测.

1.2.4 慢性乙肝患者DCs与自身Th细胞共培养: Dynal免疫磁珠阳性分离慢性乙肝患者外周血CD4<sup>+</sup> T细胞, 按Dynal CD4<sup>+</sup> positive isolation kit

操作说明进行. 用此方法分离CD4<sup>+</sup> T细胞, 纯度达96.5% ± 2.6%, 得率在80%以上. 体外诱导第8天的慢性乙肝患者DC与自身纯化的Th细胞以1: 10的比例混合培养, 96孔板每孔含 $2 \times 10^5$ 个Th细胞, 终体积为200 μL. 在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养5 d后, 再添加IL-2(100 U/mL), 继续培养2 d. 慢性乙肝患者DC与自身Th细胞共培养的第7天, 每孔中加入PMA(40 μg/L)、Ionomycin(1 mg/L)、Monensin(0.25 mg/L), 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养5 h. 收集各孔细胞按Fix&Prem kit说明进行胞内染色, 流式细胞仪检测Th1/Th2.

1.2.5 IFN-γ和IL-4的含量: 收集慢性乙肝患者DC与自身Th细胞共培养第7天的上清, -20℃保存, ELISA法一并检测, 按IL-4检测试剂盒、IFN-γ检测试剂盒说明进行操作.

**统计学处理** 使用Stata7.0软件, 进行方差分析, 若有统计学意义再进行两两比较, 多个实验组与对照组比较用 $q'$ 检验,  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 DC表面分子表达水平 IFN-γ组、HBsAg组、HBsAg+IFN-γ组DC表面分子CD80, CD86, CD40, HLA-DR的表达率均高于对照组( $P < 0.01$ ), 而且HBsAg+IFN-γ组DCs表面分子的表达率最高( $P < 0.01$ ), HBsAg组与IFN-γ组比较无差异( $P > 0.05$ , 表1).

2.2 DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力 在DC: T分别为1: 10和1: 50混合比例的实验中, IFN-γ组、HBsAg组、HBsAg+IFN-γ组DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力均比对照组强( $P < 0.05$ ), 而且HBsAg+IFN-γ组DCs的刺激能力最强( $P < 0.05$ ), HBsAg组与IFN-γ组比较无差异( $P > 0.05$ , 图1).

2.3 DC分泌IL-12的水平 结果表明: 培养第8天, IFN-γ组( $145.5 \pm 47.4$  ng/L)、HBsAg组( $168.4 \pm$

表 2 DC与自身CD4<sup>+</sup> Th细胞共培养后Th1和Th2的百分率和细胞因子含量 (mean ± SD, n = 10)

分组	Th1(%)	Th2(%)	IFN-γ(mg/L)	IL-4(mg/L)
对照组	7.84 ± 3.10	2.61 ± 1.27	342 ± 34	226 ± 48
HBsAg	10.76 ± 3.98 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.96 <sup>ab</sup>	578 ± 47 <sup>ab</sup>	187 ± 52 <sup>ab</sup>
IFN-γ	11.43 ± 4.32 <sup>ab</sup>	1.68 ± 0.16 <sup>ab</sup>	496 ± 92 <sup>ab</sup>	169 ± 38 <sup>ab</sup>
HBsAg+IFN-γ	15.28 ± 4.73	0.92 ± 0.21	784 ± 97	89 ± 37

<sup>a</sup>P<0.05 vs HBsAg+IFN-γ组比较; <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

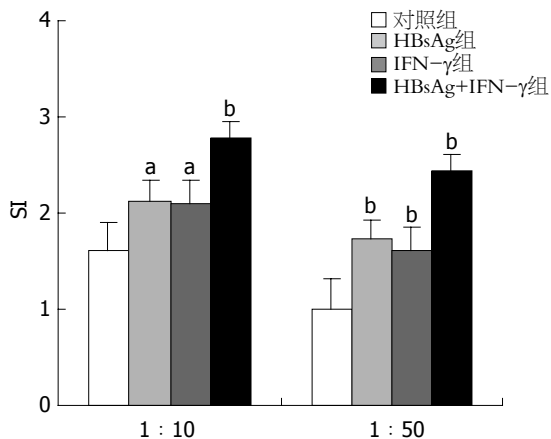


图 1 慢性乙肝患者DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力。\*P<0.05 vs 对照组; <sup>b</sup>P<0.01 vs HBsAg组+IFN-γ组.

56.3 ng/L)、HBsAg+IFN-γ组(232.4 ± 67.2 ng/L)上清液中IL-12的水平均高于对照组(95.6 ± 23.3 ng/L)(P<0.01), HBsAg+IFN-γ组DCs的分泌的IL-12的水平最高(P<0.05), IFN-γ组、HBsAg组比较无差异(P>0.05)。

2.4 DC与自身Th细胞共培养后Th1/Th2分化状况 以不加DC, 单独培养的Th细胞作为空白组的Th1为4.57% ± 1.80%, Th2为1.78% ± 0.91%。Th1细胞占CD4<sup>+</sup> T细胞的百分比均比其他4组低(P<0.05, 表2)。

2.5 DC与自身Th细胞共培养后上清中IFN-γ和IL-4含量 HBsAg组、IFN-γ组和HBsAg+IFN-γ组培养第8天成熟DC分别与纯化后的自身Th细胞共培养后的上清, 用ELISA法检测其中IFN-γ和IL-4含量增加(表1)。

### 3 讨论

CD4<sup>+</sup> Th细胞主要可分化为Th1和Th2细胞。Th1和Th2细胞分别介导2种不同的免疫应答产生不同的免疫效应, 机体通过产生不同的Th1/Th2模式应答来抵御不同种类的病原体感染, Th1/Th2的平衡决定了机体能否有效和安全地清除体内的病原体。研究表明, 在抗HBV感染的免疫应答

过程中, Th1处于中心地位, 产生高效特异性的Th1反应是机体清除体内病毒的关键。然而在对慢性乙肝的研究发现, 患者外周血中Th1、Th2亚型的比例失调, Th2亚型占优势, 细胞因子模式为Th2型<sup>[7]</sup>。Livingston *et al*<sup>[8]</sup>研究HBsAg脂质体的免疫效果时发现, 慢性乙肝患者体内不能有效的激发CTL反应与其Th1反应低下有关。这些研究提示HBV特异性Th1细胞反应低下或Th1/Th2分化失衡是慢性乙肝患者体内HBV持续感染的重要原因。

初始型Th细胞选择性向Th1/Th2分化的机制一直是免疫学界的研究热点, 研究表明有多种因素影响Th1/Th2的分化。其中, DC作为目前已知的体内功能最强的专职APC, 其对Th1/Th2分化的影响在现今受到了最广泛的关注, 甚至Rissoan *et al*<sup>[9]</sup>提出主要是由APC决定了T细胞是向Th1还是Th2分化。因此, 在抗HBV的感染免疫中, DC的功能状态可能决定了机体能否产生高效的病毒特异性Th1反应, 从而有效清除体内的病毒。DC膜上免疫分子的高表达、维持一定的细胞数和分泌一些重要的细胞因子是DC诱导高效病毒特异性Th1反应的物质基础, 然而许多研究均发现, 慢性乙肝患者外周血单核细胞来源的DC存在着多种异常, 具体表现为DC的增殖数量较正常人明显降低, 其表达免疫分子(HLA-DR、CD80、CD86、CD40)的水平明显低于正常人, 刺激T细胞增殖的能力低于正常人, 分泌IL-12的能力亦下降<sup>[4]</sup>。IL-12是DC分泌的促进Th1分化的最重要的一个细胞因子<sup>[10]</sup>, 慢性乙肝患者DC分泌IL-12低, 这也可能导致了Th1分化不足。总之, 慢性乙肝患者DCs功能的缺陷可以从多反面抑制Th的活化和增殖及Th1的分化。

虽然慢性乙肝患者DC存在表型及功能的改变, 但Tavakoli *et al*<sup>[11]</sup>指出慢性乙肝患者DC的这种改变并不是永久的, 是可以通过在培养环境

### ■创新盘点

本研究在DC通用培养体系中加入HBsAg共孵育, 使DC成为负载HBsAg的DC。

### ■应用要点

经HBsAg负载的DCs可以改善患者体内因DCs功能低下而引起的Th1细胞分化不足的状态。

中加入适当的细胞因子来改善甚至逆转的。Löhr *et al*<sup>[12]</sup>用磁珠分选出CD34<sup>+</sup>造血干细胞,体外诱导生成DC,将重组IL-12与之共孵育,结果与之共培养的T细胞的增殖能力提高了2倍。这些都提醒我们是否可以通过改善慢性乙肝患者DC的功能进而促进Th1的分化,达到利于清除患者体内病毒的目的。那么如何有效纠正慢性乙肝患者的DC的功能缺陷呢?有资料显示,用特异性抗原冲击DC可以提高DC的成熟度,增强DC抗原提呈的能力<sup>[13]</sup>。本研究中,我们在DC通用培养体系(含IL-4和CSF-GM)中加入了HBsAg共孵育,使DC成为负载HBsAg的DC。鉴于我们以往的研究发现INF- $\gamma$ 能促进DC的成熟和增强其功能<sup>[14]</sup>,我们又联合应用了IFN- $\gamma$ ,观察其是否可以使DC的功能进一步改善。我们观察到,HBsAg组、INF- $\gamma$ 组和HBsAg+INF- $\gamma$ 组DC的协同刺激分子CD40、CD80、CD86及MHC-II分子的表达量增加,刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力提高,IL-12的分泌量也提高,而且以HBsAg+INF- $\gamma$ 联合作用改善更明显。说明HBsAg负载有提高慢性乙肝DC功能的作用,尤其是联合INF- $\gamma$ 应用时能产生协同作用而获得更好的效果。这一结果与国内外的研究也相一致。

在DC的培养体系中加入HBsAg确实能够有效改善慢性乙肝患者DC的功能,但DC功能的改善能否有效促进Th1的分化呢?于是,我们将各组DC在培养7 d后与自身用免疫磁珠法纯化的CD4<sup>+</sup> T细胞共培养,并且以不加DC单独培养的Th细胞作为空白对照,观察不同培养条件下DC对Th1/Th2分化的影响。慢性乙肝患者病毒特异性的Th1反应不足,可能由于数量少于正常,也有可能是由于分泌细胞因子的功能低下所导致,或者两者皆有,Alheim *et al*<sup>[15]</sup>就提出, Th细胞分泌到上清中各种细胞因子的水平与具有分泌能力的Th细胞的数量并无必然的关系。这提醒我们,要全面了解Th1/Th2分化的情况,按照目前的条件,可能需要结合多种检测方法。在本实验中,采用流式细胞仪来探测细胞内细胞因子的信号,结果可以客观地判断具有分泌IL-4和分泌INF- $\gamma$ 能力的细胞的数量,但却不能分析分泌到细胞外并发挥活性的细胞因子的含量,于是同时我们又采用了检测共培养上清中细胞因子的量来弥补这一点,这两种方法的结合能够更准确地反映Th1/Th2的分化情况。我们发现不加DC单独培养的患者Th细胞中Th1细胞所占比例最低。加入DC共培养后, Th1细

胞所占比例增高,培养上清中INF- $\gamma$ 这一Th1细胞分泌的特征性的细胞因子的量增加,而且以HBsAg+INF- $\gamma$ 组增高的最为明显。这一结果表明加入HBsAg和联合应用INF- $\gamma$ 培养的功能改善的慢性乙肝患者DC能够有效诱导病毒特异性Th1的分化,有助于患者清除体内的HBV。我们的实验为HBsAg负载的DC疫苗应用于慢性乙型肝炎提供了一个实验依据。

### 4 参考文献

- 1 Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertolotti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999; 117: 1386-1396
- 2 Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertolotti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117-1124
- 3 Bocher WO, Galun E, Marcus H, Daudi N, Terkieltaub D, Shouval D, Lohr HF, Reisner Y. Reduced hepatitis B virus surface antigen-specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen-specific antibodies in the trimera mouse. *Hepatology* 2000; 31: 480-487
- 4 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 537-541
- 5 汤伟,汪晓莺,朱俊,周跃,沈轶瑶,蒋道荣.慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞状况的初步研究. *江苏医药* 2003; 29: 401-403
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会.病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-60
- 7 冯霞,魏来,吴文漪,颜学兵,张萍.慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞Th1、Th2型细胞标记物及其细胞因子的表达. *中华传染病杂志* 2003; 21: 42-45
- 8 Livingston BD, Alexander J, Crimi C, Oseroff C, Celis E, Daly K, Guidotti LG, Chisari FV, Fikes J, Chesnut RW, Sette A. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. *J Immunol* 1999; 162: 3088-3095
- 9 Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-1186
- 10 Scott P, Trinchieri G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 34-40
- 11 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Löhr HF, Böcher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 10): 2829-2836
- 12 Löhr HF, Pingel S, Böcher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced

- virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic hepatitis B - restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 107-114
- 13 席泓, 古涛, 朱一蓓, 戚春建, 顾宗江, 束永前, 张学光. 凋亡肿瘤细胞负载的树突状细胞对抗原特异性 CTL的激活. *上海免疫学杂志* 2002; 22: 297
- 14 汤伟, 孙伟红, 汪晓莺, 孙晓雷. 肝素对慢性乙型肝炎

- 患者树突状细胞免疫功能的作用. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 50-113
- 15 Alheim M, Lazdina U, Milich DR, Sällberg M. Flow cytometric determination of cytokine production and proliferation in hepatitis B core antigen specific murine CD4 cells: lack of correlation between number of cytokine producing cells and cytokine levels in supernatant. *J Immunol Methods* 2001; 258: 157-167

#### ■同行评价

本研究设计合理, 有较强的科学性和潜在的应用价值, 但病例数较少.

编辑 潘伯荣 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 •

### 世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

#### 1 修回稿信件

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, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)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; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

#### 2 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 d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.

#### 3 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》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

# Tec激酶区作用蛋白RAI16的原核表达和纯化

许文, 王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 王东, 李增鹏, 杨志祥

## ■背景资料

Tec是一种存在于胞质内的非受体型蛋白酪氨酸激酶,最初于肝癌组织中筛选得到,其参与多种细胞因子的信号传递过程,是多种细胞因子、辅助分子及受体型PTK信号转导过程中一个重要的靶分子。经测序及BLAST比对分析,RAI16确定为一种Tec相关新基因。

许文, 王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 王东, 李增鹏, 杨志祥, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 重庆市 400042

国家自然科学基金资助项目, No. 30370341, No. 30570410

全国优秀博士专项基金资助项目, No. 200261

作者贡献分布: 此课题由王阁, 许文, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中及杨志祥设计; 研究过程由许文, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆及杨志祥操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王阁, 王东及李增鹏提供; 数据分析由许文, 王阁, 郑继军, 王红中, 胡庆及杨志祥完成; 本论文写作由许文, 王阁及邓婧完成。

通讯作者: 王阁, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心。

wangge70@hotmail.com

电话: 023-68757796

收稿日期: 2007-11-08 修回日期: 2008-03-14

## Prokaryotic expression and purification of retinoic acid induced 16 interacting with Tec kinase domain

Wen Xu, Ge Wang, Jing Deng, Jin Yang, Ji-Jun Zheng, Hong-Zhong Wang, Qing Hu, Dong Wang, Zeng-Peng Li, Zhi-Xiang Yang

Wen Xu, Ge Wang, Jing Deng, Jin Yang, Ji-Jun Zheng, Hong-Zhong Wang, Qing Hu, Dong Wang, Zeng-Peng Li, Zhi-Xiang Yang, Tumor Center, Daping Hospital and Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30370341, No. 30570410, and the Academic Foundation for National Excellent Doctoral Dissertation of China, No. 200261

Correspondence to: Ge Wang, Tumor Center, Daping Hospital and Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China. wangge70@hotmail.com

Received: 2007-11-08 Revised: 2008-03-14

## Abstract

**AIM:** To construct and purify an active region of prokaryotic expression vector retinoic acid induced 16 (RAI16) interacting with Tec kinase domain.

**METHODS:** TRAI16 cDNA sequence was synthesized, and then linked to pMD18-T vector. After enzyme digestion, the purified target fragment was linked to the expression vector pGEX4T-2, which was then transferred and screened. After the positive recombinants were transferred into human *E.coli* BL-21, the expres-

sion was induced by different concentrations of isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) at different temperatures and culture time periods. The expression products were analyzed by SDS-PAGE.

**RESULTS:** RAI16 cDNA was successfully cloned in pGEX4T-2 plasmid. Using 0.4 mmol/L IPTG at 30°C for 4 h, the soluble target protein was expressed efficiently. SDS-PAGE revealed glutathione S-transferase-RAI16 fusion protein bands expressed mainly in the form of inclusion bodies.

**CONCLUSION:** High expression of the extracellular region of Tec fusion protein is attained using *E.coli* BL-21, and the soluble target protein without any additional amino acid is successfully purified.

**Key Words:** Tec protein; Retinoic acid induced 16; Nucleotide; Protein structure

Xu W, Wang G, Deng J, Yang J, Zheng JJ, Wang HZ, Hu Q, Wang D, Li ZP, Yang ZX. Prokaryotic expression and purification of retinoic acid induced 16 interacting with Tec kinase domain. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1350-1354

## 摘要

**目的:** 利用原核表达系统构建Tec激酶区作用蛋白RAI16的融合蛋白表达载体, 并进行表达条件的优化和初步纯化。

**方法:** 设计基因拼接引物, 合成RAI16 cDNA序列, 将其连接于克隆载体pMD18-T中; 将酶切、纯化的RAI16基因与pGEX4T-2载体相连接、转化、筛选。将鉴定阳性的重组子质粒转入大肠杆菌BL-21表达菌中, 采用SDS-PAGE电泳分析不同浓度诱导剂异丙基硫代-D-半乳糖(IPTG)、不同诱导温度、不同诱导时间下目的蛋白的表达。

**结果:** 成功构建RAI16蛋白原核表达载体。采用0.4 mmol/L IPTG、30°C诱导4 h, 获得较高表达目的蛋白。融合蛋白主要以包涵体形式表达, 将包涵体进行尿素法变性复性和亲和层析柱处理后, 获得可溶的高纯度GST-多肽融合蛋白。

## ■同行评议者

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

**结论:** Tec激酶区作用蛋白RAI16融合蛋白表达的载体和纯化, 是制备RAI16多抗以及进一步验证与Tec体外结合作用实验的基础。

**关键词:** Tec蛋白; 视黄酸诱导蛋白16; 核苷酸; 蛋白质结构

许文, 王阁, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 王东, 李增鹏, 杨志祥. Tec激酶区作用蛋白RAI16的原核表达和纯化. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1350-1354  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1350.asp>

## 0 引言

Tec(tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma)是一种存在于胞质内的非受体型蛋白酪氨酸激酶, 最初于肝癌组织中筛选得到, 他参与多种细胞因子的信号传递过程, 是多种细胞因子、辅助分子及受体型PTK信号转导过程中一个重要的靶分子。一方面, Tec能够对受体型蛋白酪氨酸激酶(包括生长因子受体、细胞因子受体、G蛋白耦联受体、抗原受体)及整合素等传导的各种胞外刺激做出反应<sup>[1-2]</sup>。同时, Tec可以被许多非受体型蛋白酪氨酸激酶调节, 如: Src、JAK、Syk和FAK家族激酶等。研究表明Tec蛋白激酶经上游分子活化后, 通过SH2、SH3、PH、TH等的连接, 与下游作用底物BRDG1<sup>[3]</sup>、TIP3<sup>[4]</sup>、Grb10/GrbIR<sup>[5]</sup>、Sak丝-苏氨酸激酶<sup>[6]</sup>、p62Dok-1<sup>[7]</sup>、NF-AT<sup>[8]</sup>、PTP20<sup>[9]</sup>、LARG<sup>[10]</sup>、p85和p55PIK亚基及Vav等<sup>[11]</sup>相互结合, 从而调节多种主要信号传导路径, 包括磷脂酰肌3-激酶(PI3-K)通路、磷脂酶C(PLC $\gamma$ )<sup>[12-14]</sup>通路以及蛋白激酶C(PKC)通路<sup>[15]</sup>。我们前期以Tec激酶结构域作为“钓饵”蛋白, 利用酵母双杂交技术筛选构建于转录激活结构域(AD)载体的cDNA文库, 经筛选, 发现并确证了一个新的阳性克隆。本实验以多组织cDNA试剂盒作为模板, 合成巢式PCR引物, 进行两步法PCR扩增, 得到RAI16基因, 并将其插入到原核表达质粒pGEX4T-2中, 与GST基因融合, 构建原核融合表达载体。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pGEX 4T-2 vector购自Amersham Biosciences公司, PMD18-T vector, 高保真LA Taq酶、EcoRI、XhoI、PMD18-T、Simple Vector TA克隆试剂盒购自大连TaKaRa公司, cDNA克隆模板购自ClonTech公司; 质粒小抽试剂盒购自Omega公司, DNA纯化回收试剂盒购自Promega

公司, IPTG购自Bebco公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组人TEC激酶区基因cDNA:** 序列胞外段基因的改造和合成: (1)引物设计、连接、和PCR扩增: 根据GenBank上人TEC基因编码多肽氨基酸序列, 设计24条用于基因拼接的正、反链DNA引物, 在5'端和3'端分别含有与载体连接的Nru I 或EcoR I 酶切位点。以连接反应产物2  $\mu$ L为模板, 加入10 $\times$ LA Buffer 2.5  $\mu$ L、dNTPs Mixture 2  $\mu$ L、引物RAI16 N5'和RAI16 N3'各0.5  $\mu$ L、LA Taq酶0.25  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 25  $\mu$ L, 混匀。DNA扩增: 预变性94 $^{\circ}$ C, 2 min; 变性94 $^{\circ}$ C, 45 s; 退火55 $^{\circ}$ C, 45 s; 延伸72 $^{\circ}$ C, 2 min; 25个循环后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。以1  $\mu$ L PCR扩增产物为模板, 加入10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu$ L、dNTPs Mixture(10  $\mu$ mol/L)4  $\mu$ L、引物RAI16 N5'和RAI16 N3'各1  $\mu$ L、LA Taq酶0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ L, 混匀。DNA扩增: 30个循环后72 $^{\circ}$ C延伸7 min, 其他同前。(2)目的基因的连接、转化、克隆筛选及鉴定: 取PCR产物5  $\mu$ L, 10 $\times$ T4 DNA配体Buffer 2  $\mu$ L、pMD-18T载体1  $\mu$ L、RAI16 4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L置16 $^{\circ}$ C水浴中连接过夜, 连接产物转化*E.coli* DH5 $\alpha$ 。取2  $\mu$ L反应产物加入100  $\mu$ L感受态菌液中, 冰浴40 min, 设阳、阴性对照; 置42 $^{\circ}$ C水浴, 热休克90 s, 冰浴1-2 min; 每管加LB培养液, 37 $^{\circ}$ C 100 r/min振摇1 h。各取100  $\mu$ L涂布LB平板上, 37 $^{\circ}$ C过夜。取可疑白色菌落接种于10 mL的LB培养液中, 37 $^{\circ}$ C 250 r/min过夜; 取10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu$ L、Dntp 4  $\mu$ L、RAI16 5' 1  $\mu$ L、RAI16 3' 1  $\mu$ L、LA Tag 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ L混匀; 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 55 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min; 30个循环后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。琼脂糖凝胶电泳, Xho I 和EcoR I 双酶切鉴定, 阳性的载体测序。将阳性菌株接种于LB液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min过夜。将测序证实完全正确的序列命名为pMD-18T/RAI16。

**1.2.2 重组人TEC基因cDNA原核表达载体pGEX 4T-2/RAI16的构建:** 取表达载体pGEX 4T-2质粒DNA及pMD18-T/RAI16质粒DNA各1  $\mu$ g, 分别加入EcoR I、Xho I 各1  $\mu$ L, 10 $\times$ H Buffer 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C水浴, 酶切4-6 h。酶切产物行琼脂糖凝胶电泳, 回收载体及目的基因片断。取PCR产物5  $\mu$ L, 10 $\times$ T4 DNA配体Buffer 2  $\mu$ L、pGEX 4T-2 2  $\mu$ L、RAI16 3  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L, 置16 $^{\circ}$ C水浴中连接过夜, 连接产物转化*E.coli* BL-21。取2  $\mu$ L连接反应产物加入100  $\mu$ L感受态

### ■ 研发前沿

Tec是肝干细胞和肝细胞增殖、定向诱导分化及凋亡信号转导途径中关键的蛋白激酶连接分子, 但其分子机制还有待于进一步深入研究。由于研究上下游蛋白分子间的相互作用是研究信号转导分子作用机制的重要组成部分, 因此, 探寻新的Tec相关作用分子具有十分重要的意义。

### ■ 相关报道

近几年发现RAI系列基因,但对就构建TEC激酶区作用蛋白RAI16的融合蛋白表达载体,以及表达条件的优化和初步纯化未见报道。

菌液中,冰浴40 min,设阳、阴性对照;置42°C水浴,热休克90 s,冰浴1-2 min;加LB培养液,37°C 100 r/min振摇1 h.各取100  $\mu$ L涂布LB平板上,37°C过夜.挑取可疑白色菌落接种于10 mL的LB培养液中,37°C 250 r/min过夜;取10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu$ L、dNTP 4  $\mu$ L、RAI16 5' 1  $\mu$ L、RAI16 3' 1  $\mu$ L、LA Tag 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ L混匀. DNA扩增:72°C,1.5 min;30个循环后72°C延伸7 min,余其他同前.琼脂糖凝胶中电泳.质粒抽提,*Xho* I和*Eco*R I鉴定,阳性的载体测序.将测序证实完全正确的序列命名为pGEX 4T-2/RAI16.

1.2.3 融合蛋白的诱导表达: pGEX4T-2/RAI16表达质粒和pGEX4T-2载体转化至蛋白表达菌株*E.coli* BL-21中;挑取单个BL21/pGEX4T-2/RAI16, BL21/pGEX4T-2(+)转化菌落和单个BL-21菌,用10 mL的LB培养基在37°C以200 r/min过夜振荡;抽提质粒,酶切鉴定;挑取单个菌落,接种10 mL LB培养基,37°C 200 r/min过夜;按1:100的比例接种10 mL LB培养基,37°C 200 r/min摇菌培养至 $A_{600}$ 约为0.4-0.6;各取1 mL菌液离心收集菌体,各用0.5 mL PBS重悬沉淀,离心弃上清,加入水和2 $\times$ SDS上样缓冲液,4°C备用;加入IPTG至终浓度0.4 mmol/L,37°C,4 h;各取1 mL菌液,以4000 r/min离心5 min,收集菌体;用0.5 mL PBS重悬沉淀,离心弃上清;以水和2 $\times$ SDS上样缓冲液重悬沉淀,100°C,10 min,以1000 r/min离心3 min;各取20  $\mu$ L上清的标本进行10% SDS-PAGE. IPTG以上述浓度,诱导1、2、3、4 h后,检测表达量;以30°C和37°C诱导表达,观察诱导温度变化后融合蛋白的表达量;菌液离心收集沉淀,用PBS重悬,离心,弃液,加无菌水和2 $\times$ SDS上样缓冲液,混匀,100°C,5 min,上样20  $\mu$ L进行10% SDS-PAGE.电泳,染色,脱色,扫描,凝胶成像系统扫描分析表达产物.

1.2.4 融合蛋白的纯化: (1)融合蛋白的大量诱导表达:取转化的单克隆菌落,用LB培养基振荡过夜;次晨按1:100比例分别接种于含Amp的LB培养基中,于37°C振荡培养至为约 $A_{600} = 0.5-0.6$ ;各加IPTG至终浓度为0.4 mmol/L,30°C培养4 h至约 $A_{600} = 1.2-1.3$ ;取1 mL菌液离心收集菌体,重悬,加无菌水和上样缓冲液,SDS-PAGE电泳分析;离心收集菌体.各用5 mL PBS重悬菌体.置-70°C冷冻1 h;取出标本,解冻,超声破碎;加入Triton X-100至终浓度为1%,轻振荡20 min;4°C,以8000  $g \times 10$  min离心;弃上清,加DTT至终浓度为1 mmol/L;取20  $\mu$ L进行SDS-PAGE电

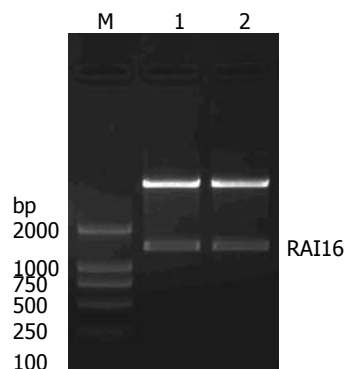


图1 重组质粒pGEX4T-2/RAI16酶切鉴定电泳图. 1: PGEX-RAI16-6; 2: PGEX-RAI16-8.

泳分析; (2)包涵体洗脱、变性和复性:将沉淀分别用包涵体洗涤液I和包涵体洗涤液II洗脱包涵体,洗脱后产物用蛋白变性液溶解,室温放置3 h;用含不同浓度梯度尿素的透析溶液在8000 MWCO的透析袋透析处理24 h,透析中换液多次,透析液各达约2 L;以含25 mmol/L Tris-HCl和20 mmol/L NaCl的溶液透析2 h;透析袋内容物行SDS-PAGE分析; (3)融合蛋白的纯化:混匀树脂填料,装柱;用1 $\times$ GST Wash Buffer冲洗至平衡状态;加入细菌混合物,流速为每小时10个柱床体积.收集流过液置于冰上;用10倍柱床体积1 $\times$ GST Wash Buffer冲洗,收集流过液置于冰上;用3倍体积1 $\times$ GST Elution Buffer洗脱融合蛋白,置-70°C冷藏.

## 2 结果

2.1 重组质粒pGEX4T-2/RAI16酶切鉴定结果显示6号(PGEX-RAI16-6)和8号(PGEX-RAI16-8)在2000 bp与1000 bp之间约1300 bp处出现一明亮条带,与预期值相符(图1).

2.2 融合蛋白的诱导表达 发现pGEX4T-2(+)诱导后有约26 kDa的GST蛋白表达,而pGEX4T-2/RAI16重组质粒诱导后有约75 kDa大小的目的蛋白条带出现,大小与我们的预期值一致(图2).用细胞裂解物的上清和沉淀分别电泳后,发现有部分可溶的目的蛋白表达,而目的蛋白大多以包涵体形式存在(图3).

2.3 融合蛋白的纯化 将融合蛋白大量诱导表达后,超声碎菌,在7 mol/L尿素存在的条件下,其包涵体溶解,经变性复性处理后可得到可溶的目的蛋白.另外,将以可溶形式存在于上清中的表达产物用谷胱甘肽-琼脂糖树脂进行免疫亲和层析纯化,得到了可溶的GST-多肽融合蛋白(图4).

## 3 讨论

表达载体是指含有强启动子的质粒载体.原核

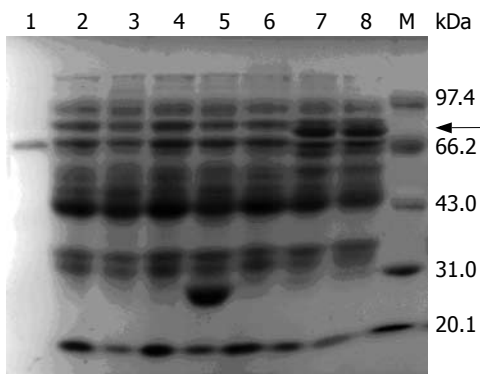


图 2 SDS-PAGE分析GST-RAI16融合蛋白表达电泳图. 1:BSA蛋白(分子质量: 66 kDa); 2: BL-21空菌诱导前; 3: BL-21空菌诱导后; 4: pGEX4T-2(+)空载体诱导前; 5: GST-pGEX4T-2 (+)空载体表达产物; 6: pGEX4T-2/RAI16/BL-21诱导前; 7, 8: pGEX4T-2/RAI16/BL-21分别诱导3, 4 h; M: 蛋白marker.

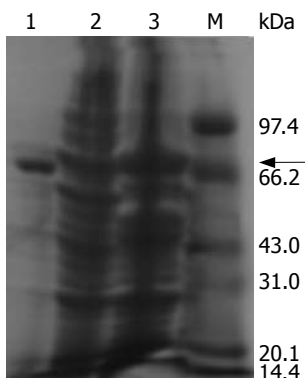


图 3 DS-PAGE分析细菌裂解物表达电泳图. 1: BSA蛋白分子质量: 66 kDa; 2: 细菌裂解物中的上清; 3: 细菌裂解物中的沉淀; M: 蛋白marker.

表达载体分为两类: 一类是可直接表达不含任何原核序列的外源蛋白的载体, 称为非融合型表达载体; 另一类则是以融合蛋白的形式进行表达的载体, 融合蛋白的一部分由载体编码, 而其余部分则由外源片段的开放阅读框编码, 称为融合表达载体. 可调控的强启动子和有效的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS), 是原核表达载体表达完整的天然蛋白所必不可少的两个要素. 原核表达系统通常用来表达天然状态下糖基化影响不大的重组蛋白, 其中pGEX-4T系列载体是比较常用的原核表达载体, 具有一个强的tac启动子, 表达与GST蛋白相融合的重组蛋白, 两者之间有凝血酶或Xa因子酶切位点. 细胞中的生物学活性蛋白质常以可溶性或分子复合物的形式存在, 功能性的蛋白质总是折叠成特定的三维结构型. 而包涵体内的蛋白是非折叠状态的聚集体, 不具有生物学活性. 不可溶、无生物活性的包涵体必须经过变性、复性才能获得天然结构和生物活性, 因此应该选择一个合适的复性过程来实现蛋白质的正确折叠, 获得生物活性.

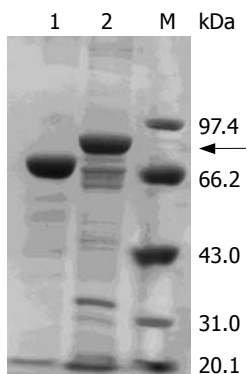


图 4 GST-RAI16融合蛋白纯化后电泳图. 1: BSA蛋白; 2: GST-RAI16融合蛋白纯化后; M: 蛋白marker.

**应用要点**  
本研究将RAI16基因构建于原核表达载体pGEX4T-2中, 与GST基因融合, 再进行诱导表达得到GST-RAI16融合蛋白, 并进一步纯化融合蛋白, 为后续实验进一步验证RAI16与Tec蛋白之间的相互作用, 以及RAI16蛋白在体外的某些生物学活性奠定重要基础.

本实验中采用7 mol/L的尿素成功地进行了RAI16蛋白的变性复性工作, 在7 mol/L尿素存在的条件下, 其包涵体溶解, 经变性复性处理后可得到可溶的目的蛋白. 另一方面, 参照pGEX4T-2(+)载体外源基因表达纯化方法, 结合GST亲和层析说明书的纯化条件, 摸索RAI16蛋白的纯化方法. 将RAI16超声后离心的上清用谷胱甘肽-琼脂糖树脂进行免疫亲和层析纯化, 得到GST-RAI16融合蛋白纯化物, 为制备RAI16多抗以及进一步验证与Tec体外结合作用等后续实验提供了充足的蛋白来源. 我们对诱导前培养条件、诱导温度、时间及IPTG用量与表达量的关系进行了研究后发现, 首先接种量不宜过大, 才能保证 $A_{600}$ 约为0.5左右时, 工程菌的生长处于对数生长的中、后期, 一般选用1%-5%的接种比例. 其次诱导点的选择, 我们选用了1%的接种量, 诱导点选择 $A_{600}$ 达到0.6时. 诱导温度、时间与诱导剂IPTG用量的关系<sup>[16]</sup>是我们研究的重点. 37℃是大肠杆菌生长的最适温度, 但并非是其外源基因表达时的最佳温度. 如果表达需要的温度与菌体生长温度不同时, 在加诱导剂之前, 即应在短时间内改变培养温度, 使之与加入诱导剂以后的温度相一致, 这样有利于重组蛋白进行高效表达<sup>[17]</sup>. 通过一系列实验研究, 我们摸索发现RAI16高效表达的条件, 最后进行SDS-PAGE鉴定, 其表达产物部分主要以包涵体形式存在, 有部分融合蛋白以可溶形式存在于上清中. 本研究对筛库所得基因片段测序并经BLAST比对分析后, 确定为RAI16基因, 已被GenBank收录(编号为BC052237), 组织来源为脑IV型星状细胞瘤, 其编码蛋白为人视黄酸诱导蛋白16. 随后以RAI16蛋白为切入点, 一方面利用相关的生物信息学站点及计算机软件, 对RAI16进行生物信息学分析, 从中获得其编码蛋白质结构方面的重要信息, 从而根据结构预测其功能; 另一方面将RAI16基因构建于原核表达载体中, 进行融合

#### ■同行评价

本文在原工作基础上构建了RAI16蛋白的原核表达载体,为后续研究工作奠定基础,提供了充分的实验信息,结果可信,有一定的学术价值。

表达,并进一步纯化融合蛋白,为下一步RAI16功能研究奠定重要基础。

#### 4 参考文献

- 1 Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 549-600
- 2 Finkelstein LD, Shimizu Y, Schwartzberg PL. Tec kinases regulate TCR-mediated recruitment of signaling molecules and integrin-dependent cell adhesion. *J Immunol* 2005; 175: 5923-5930
- 3 Ohya K, Kajigaya S, Kitanaka A, Yoshida K, Miyazato A, Yamashita Y, Yamanaka T, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K, Mano H. Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11976-11981
- 4 Ohya K, Kajigaya S, Yamashita Y, Miyazato A, Hatake K, Miura Y, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K, Mano H. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27178-27182
- 5 Mano H, Ohya K, Miyazato A, Yamashita Y, Ogawa W, Inazawa J, Ikeda U, Shimada K, Hatake K, Kasuga M, Ozawa K, Kajigaya S. Grb10/GrbIR as an in vivo substrate of Tec tyrosine kinase. *Genes Cells* 1998; 3: 431-441
- 6 Yamashita Y, Kajigaya S, Yoshida K, Ueno S, Ota J, Ohmine K, Ueda M, Miyazato A, Ohya K, Kitamura T, Ozawa K, Mano H. Sak serine-threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 39012-39020
- 7 van Dijk TB, van Den Akker E, Amelsvoort MP, Mano H, Löwenberg B, von Lindern M. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* 2000; 96: 3406-3413
- 8 Tomlinson MG, Kane LP, Su J, Kadlecck TA, Mollenauer MN, Weiss A. Expression and function

- of Tec, Itk, and Btk in lymphocytes: evidence for a unique role for Tec. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 2455-2466
- 9 Aoki N, Ueno S, Mano H, Yamasaki S, Shiota M, Miyazaki H, Yamaguchi-Aoki Y, Matsuda T, Ullrich A. Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 2004; 279: 10765-10775
- 10 Suzuki N, Nakamura S, Mano H, Kozasa T. Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 733-738
- 11 Takahashi-Tezuka M, Hibi M, Fujitani Y, Fukada T, Yamaguchi T, Hirano T. Tec tyrosine kinase links the cytokine receptors to PI-3 kinase probably through JAK. *Oncogene* 1997; 14: 2273-2282
- 12 Lucas JA, Miller AT, Atherly LO, Berg LJ. The role of Tec family kinases in T cell development and function. *Immunol Rev* 2003; 191: 119-138
- 13 Finkelstein LD, Schwartzberg PL. Tec kinases: shaping T-cell activation through actin. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 443-451
- 14 Reynolds LF, Smyth LA, Norton T, Freshney N, Downward J, Kiuoussis D, Tybulewicz VL. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 2002; 195: 1103-1114
- 15 Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene* 2000; 19: 5651-5661
- 16 Piatak M, Lane JA, Laird W, Bjorn MJ, Wang A, Williams M. Expression of soluble and fully functional ricin A chain in *Escherichia coli* is temperature-sensitive. *J Biol Chem* 1990; 268: 4837-4843
- 17 Hounsa CG, Aubry JM, Dubourguier HC, Hornez JP. Application of factorial and Doehlert design for optimization of pectate lyase production by a recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996; 45: 764-770

编辑 程剑侠 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 •

### 世界华人消化杂志网络版的发表前链接

**本刊讯** 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.(常务副总编辑:张海宁 2008-04-28)

# TGF- $\alpha$ 和Cyclin E在中医不同证型患者胃病变组织中的表达及相关性

梁卫江, 马业俊, 阎曦, 张万岱, 罗荣城

梁卫江, 罗荣城, 南方医科大学南方医院肿瘤中心 广东省广州市 510515  
马业俊, 阎曦, 张万岱, 南方医科大学南方医院消化科 广东省广州市 510515  
作者贡献分布: 梁卫江对本课题作主要贡献; 张万岱指导课题研究并提供经费和实验支持; 病例及标本收集由马业俊和阎曦完成; 罗荣城对文章内容进行审阅并修改。  
通讯作者: 张万岱, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学南方医院消化科. zhangwdcn@163.com  
电话: 020-61641547 传真: 020-87280770  
收稿日期: 2008-03-08 修回日期: 2008-04-07

## Expression of transforming growth factor $\alpha$ and Cyclin E and their correlation in chronic gastric lesion tissues from patients with different TCM types

Wei-Jiang Liang, Ye-Jun Ma, Xi Yan, Wan-Dai Zhang, Rong-Cheng Luo

Wei-Jiang Liang, Rong-Cheng Luo, Cancer Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Ye-Jun Ma, Xi Yan, Wan-Dai Zhang, Department of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Wan-Dai Zhang, Department of Digestive Disease, Nanfang Hospital, Southern Medical University, 1838 Guangzhou Road, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. zhangwdcn@163.com  
Received: 2008-03-08 Revised: 2008-04-07

### Abstract

**AIM:** To explore the expression of transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) and Cyclin E in chronic gastric lesion tissues from patients with different types of traditional Chinese medicine (TCM), and analyze the correlation between TGF- $\alpha$  and Cyclin E expression.

**METHODS:** The patients ( $n = 135$ ) with chronic gastric diseases were classified to 4 groups according to different TCM types such as disharmony between liver and stomach (group A), spleen-stomach cold deficiency (group B), stomach-yin deficiency

(group C), and mixed cold and heat (group D). Immunohistochemical staining was used to examine the expression of TGF- $\alpha$  and Cyclin E in the lesion tissues and the correlation between TGF- $\alpha$  and Cyclin E expression was also assessed.

**RESULTS:** The positive rates of TGF- $\alpha$  expression in the lesion tissues of group A, B, C and D were 25.0%, 18.6%, 47.1% and 42.1%, respectively, and there was significant difference between group B and C ( $P < 0.05$ ). The positive rates of Cyclin E expression were 20.0%, 7.0%, 26.5% and 31.6%, respectively, and there was marked difference between group B and D ( $P < 0.05$ ). Both TGF- $\alpha$  and Cyclin E expression were the lowest in group B, and there existed a positive correlation between the expression of TGF- $\alpha$  and Cyclin E.

**CONCLUSION:** TGF- $\alpha$  and Cyclin E are differentially expressed in chronic gastric lesion tissues of patients with different TCM types, and the expression of TGF- $\alpha$  and Cyclin E are positively correlated.

**Key Words:** Chronic gastric diseases; Traditional Chinese medicine type; TGF- $\alpha$ ; Cyclin E

Liang WJ, Ma YJ, Yan X, Zhang WD, Luo RC. Expression of transforming growth factor  $\alpha$  and Cyclin E and their correlation in chronic gastric lesion tissues from patients with different TCM types. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1355-1358

### 摘要

**目的:** 探讨中医不同证型患者的慢性胃病变组织中TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达的变化, 并分析两者表达的相关性。

**方法:** 慢性胃病患者(慢性良性胃病变和胃癌)135例, 按中医分为肝胃不和、脾胃虚寒、胃阴不足和寒热夹杂4种证型。对患者慢性胃病变组织进行TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达的免疫组化染色, 对两者在各中医证型中表达的阳性率进行比较, 并进一步分析TGF- $\alpha$ 和

### 背景资料

在疾病的发生发展中, 患者常表现为不同的中医证型。探讨中医证型与机体病理生理改变的关系, 是提高中西医结合辨证施治疗效的重要途径之一。

### 同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科; 王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

## ■研究前沿

研究中医证型与病变组织的分子病理变化的关系,是中医的现代医学基础研究热点之一。

## Cyclin E表达的相关性.

**结果:** TGF- $\alpha$ 在4种中医证型中表达的阳性率分别为25.0%、18.6%、47.1%和42.1%,在胃阴不足型与脾胃虚寒型中的表达,有显著性差异( $P<0.05$ ). Cyclin E表达的阳性率则分别为20.0%、7.0%、26.5%和31.6%,在寒热夹杂型与脾胃虚寒型中表达的,有显著性差异( $P<0.05$ ). TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达均在脾胃虚寒型最低. TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达存在显著的正相关关系.

**结论:** 在中医不同证型患者中, TGF- $\alpha$ 和Cyclin E在胃病变组织中的表达存在差异, TGF- $\alpha$ 和Cyclin E的表达存在正相关关系.

**关键词:** 慢性胃疾病; 中医证型; 转化生长因子 $\alpha$ ; Cyclin E

梁卫江, 马业俊, 阎曦, 张万岱, 罗荣城. TGF- $\alpha$ 和Cyclin E在中医不同证型患者胃病变组织中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(12): 1355-1358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1355.asp>

## 0 引言

在慢性胃疾病的发病过程中, 几乎都出现不同的中医证型. 探索其中医证型的现代医学基础, 是提高中西医结合辨证施治疗效的重要途径之一. 研究认为, 中医分型与慢性胃疾病的病理生理改变有一定关系<sup>[1]</sup>. 转化生长因子 $\alpha$ (transforming growth factor alpha, TGF- $\alpha$ )是重要的胃肠道生长因子之一, 与胃肠道慢性疾病关系密切<sup>[2]</sup>. 在炎症、损伤修复中其促上皮组织增生, 使细胞发生转化, 但有潜在的致癌危险. 已发现其在胃癌前病变及胃癌中有较高表达, 可促进胃癌的发生发展. Cyclin E是重要的细胞周期调节蛋白, 在细胞由G<sub>1</sub>向S期进程中起主要作用, 其促进细胞增殖. 已发现某些肿瘤Cyclin E基因扩增或蛋白高表达, 对肿瘤的发生发展起着促进作用<sup>[3]</sup>. 本研究旨在探讨中医证型与促进细胞增殖的TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达之间的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 南方医院就诊的慢性胃病患者135例, 男87例, 女48例. 年龄16-72岁, 中位年龄46岁, 其中慢性浅表性胃炎61例, 肠上皮化生25例, 不典型增生18例, 胃溃疡8例、胃癌23例. 标本为胃镜活检组织, 每例取3-5块病变组织, 经40 g/L甲醛固定、石蜡包埋、3  $\mu$ m连续切片, 进行HE染色

及病理学检查, 并确定所选组织与诊断无误, 然后进行TGF- $\alpha$ 和Cyclin E的免疫组化染色.

## 1.2 方法

**1.2.1 中医分型:** 根据临床症状按以下标准把患者分为四型<sup>[1]</sup>: (1)肝胃不和型主症: 胃脘胀痛, 窜及两肋, 嗝气、泛酸、纳差、善叹气; 舌淡红, 苔薄白或薄黄; 脉弦或沉弦. (2)脾胃虚寒型, 主症: 胃脘隐痛, 喜暖喜按, 空腹痛重, 得食痛减, 吐清水, 神倦, 便溏; 舌胖、有齿印, 苔薄白; 脉细或虚软无力. 胃口差, 食后腹胀, 口燥唇干, 消瘦乏力; 副症: 五心烦热, 大便干结, 舌红少苔, 脉细数. (3)胃阴不足型, 主症: 胃脘隐痛或灼痛, 口干舌燥, 喜冷饮, 失眠多梦, 大便干结; 舌红干, 少苔、无苔或剥脱苔; 脉细数. (4)寒热夹杂型, 主症: 胃脘隐痛或胀痛, 喜暖喜按, 嗝气泛酸, 口干失眠, 大便干结或时干时稀; 舌红胖有齿印, 苔白黄相间或黄腻; 脉弦细数或滑数.

**1.2.2 免疫组化染色:** 组织切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡至水后, 浸入3 g/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>内15 min, 以阻断内源性过氧化酶活性; 对TGF- $\alpha$ 抗原进行微波15 min修复; 山羊血清封闭10 min; 加一抗TGF- $\alpha$ (mAb, 武汉博士德生物工程公司, 1:50)或Cyclin E(pAb, Santa Cruz公司, 1:50), 37℃水浴孵育3 h, PBS漂洗5 min $\times$ 3次; 37℃下分别与二抗(羊抗兔或羊抗鼠IgG, 1:100)反应20 min, PBS漂洗; 加三抗(辣根过氧化物酶标记的链卵白素, 1:100)37℃反应20 min, PBS漂洗5 min $\times$ 3次; DAB显色2 min; 苏木素复染、脱水、透明、封片. 阴性对照的一抗用PBS代替, 阳性对照用已知阳性片进行染色.

**1.2.3 结果评价:** 染色结果分级参照Shimizu *et al*<sup>[4]</sup>评分方法. 每张切片均观察整体染色情况, 选择5个有代表性的区域, 每区计算200个细胞. 阳性细胞数计分: 阳性数 $\leq$ 5%: 0; 阳性数 $>$ 5%但 $\leq$ 35%: 1; 阳性数 $>$ 35%但 $\leq$ 70%: 2; 阳性数 $>$ 70%: 3. 阳性强度记分: 不着色: 0; 弱着色: 1; 强着色: 2; 阳性分级: 以上两项相加, 0: (-); 2: ( $\pm$ ); (-)( $\pm$ ): 阴性; 3以上: (+), 阳性.

**统计学处理** 用SPSS10.0统计软件进行 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 有显著性差异.

## 2 结果

TGF- $\alpha$ 和Cyclin E在细胞内表达部位不同. TGF- $\alpha$ 主要表达于胞质, Cyclin E主要表达于胞核. 两者在中医不同证型的胃病变组织的表达存在差异(表1). TGF- $\alpha$ 的阳性率在胃阴不足型最

表 1 慢性胃病、胃癌组织TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达与中医证型的关系

中医分型	n	TGF- $\alpha$			Cyclin E		
		+	-	阳性%	+	-	阳性%
肝胃不和型	20	5	15	25.0	4	16	20.0
脾胃虚寒型	43	8	35	18.6	3	40	7.0
胃阴不足型	34	16	18	47.1 <sup>a</sup>	9	25	26.5
寒热夹杂型	38	16	22	42.1	12	26	31.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 脾胃虚寒型.

表 2 慢性胃病、胃癌组织TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达的相关性

TGF- $\alpha$	Cyclin E		合计
	+	-	
+	25	13	38
-	4	93	97
合计	29	106	135

$P < 0.05$ .

高, 在寒热夹杂型次之; 在胃阴不足型与脾胃虚寒型之间的比较, 有显著性差异( $P < 0.05$ ). Cyclin E的表达则在寒热夹杂型最高, 胃阴不足型次之; 在寒热夹杂型与脾胃虚寒型之间的比较, 有显著性差异( $P < 0.05$ ). 两者均在脾胃虚寒型表达最低. 在观察中发现, 同一标本如果TGF- $\alpha$ 阳性, Cyclin E也常会阳性(表2). 经统计学分析, TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达存在显著的正相关( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

采用现代医学科学技术进行研究, 已发现中医证型不仅与患者机能状态有关, 而且与组织病变程度存在一定关系<sup>[1-5]</sup>. 研究还发现, TGF- $\alpha$ 和Cyclin E可促进细胞增殖并与肿瘤的发生发展密切相关. TGF- $\alpha$ 对胃肠黏膜等细胞的增殖和分化, 以及许多组织器官的发生发展有促进作用<sup>[6-7]</sup>; 但在肿瘤中常有较高表达, 可促进肿瘤自身增殖<sup>[8-12]</sup>. Cyclin E在促进细胞周期进程中起重要作用<sup>[13]</sup>; 在肿瘤组织中常高表达, 是候选的癌基因<sup>[14-18]</sup>.

本研究探讨慢性胃黏膜病变和胃癌患者的中医证型与具有促癌作用的TGF- $\alpha$ 和Cyclin E表达的关系. 结果发现不同中医证型的胃黏膜病变组织中, TGF- $\alpha$ 和Cyclin E的表达存在差异, TGF- $\alpha$ 的阳性率在胃阴不足型最高, 在寒热夹杂型次之; Cyclin E则在寒热夹杂型最高, 胃阴不足型次之; 两者表达均在脾胃虚寒型的最低.

### ■应用要点

本文探讨中医证型与胃病变组织中促癌分子TGF- $\alpha$ 和Cyclin E的关系, 为指导临床治疗提供依据.

从组织病理学角度出发, 胃黏膜肠上皮化生、不典型增生和胃溃疡是癌前病变. 本研究结果提示, 胃癌前病变患者如属于胃阴不足和寒热夹杂型, 可能有较高的癌变危险. 胃癌患者如属于这两种证型, 可能有更高的恶性程度. 这提醒我们, 在临床工作中对这些患者应有更高的重视程度, 应采取更积极的治疗措施.

### 4 参考文献

- 张万岱, 谢国建, 杨海涛, 周殿元. 胃癌及胃癌前病变患者中医证型与病理及Hp感染的关系. 新消化病学杂志 1997; 5: 564-566
- Kosone T, Takagi H, Kakizaki S, Sohara N, Horiguchi N, Sato K, Yoneda M, Takeuchi T, Mori M. Integrative roles of transforming growth factor-alpha in the cytoprotection mechanisms of gastric mucosal injury. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 22
- Gourguechon S, Savich JM, Wang CC. The multiple roles of cyclin E1 in controlling cell cycle progression and cellular morphology of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* 2007; 368: 939-950
- Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 尹光耀, 何雪芬, 张武宁, 陈一. 脾虚证分型与胃黏膜细胞核及线粒体生物活性物质的量变关系. 中国中西医结合脾胃杂志 1999; 7: 145-148
- Celikel C, Eren F, Gulluoglu B, Bekiroglu N, Turhal S. Relation of neuroendocrine cells to transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor expression in gastric adenocarcinomas: prognostic implications. *Pathol Oncol Res* 2007; 13: 215-226
- Booth BW, Smith GH. Roles of transforming growth factor-alpha in mammary development and disease. *Growth Factors* 2007; 25: 227-235
- 梁卫江, 张万岱, 张亚历, 刘利民. 胃癌及癌前病变组织中TGF- $\alpha$ 和cyclin E的表达及两者关联性分析. 癌症 2004; 23: 259-263
- Wada Y, Yoshida K, Hihara J, Konishi K, Tanabe K, Ukon K, Taomoto J, Suzuki T, Mizuiri H. Sivelestat, a specific neutrophil elastase inhibitor, suppresses the growth of gastric carcinoma cells by preventing the release of transforming growth factor-alpha. *Cancer Sci* 2006; 97: 1037-1043
- Espinoza LA, Tone LG, Neto JB, Costa RS, Wang QJ, Ballejo G. Enhanced TGFalpha-EGFR expression and P53 gene alterations contributes to gastric

### ■同行评价

本文选题较新颖,研究方法较科学,结论明确,对临床工作有一定的参考价值。

- tumors aggressiveness. *Cancer Lett* 2004; 212: 33-41
- 11 Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Expression of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha and Ki-67 in relationship to malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Acta Otolaryngol* 2007; 127: 1207-1213
  - 12 Tampellini M, Longo M, Cappia S, Bacillo E, Alabiso I, Volante M, Dogliotti L, Papotti M. Co-expression of EGF receptor, TGFalpha and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch* 2007; 450: 321-328
  - 13 Iacovelli J, Lopera J, Bott M, Baldwin E, Khaled A, Uddin N, Fernandez-Valle C. Serum and forskolin cooperate to promote G1 progression in Schwann cells by differentially regulating cyclin D1, cyclin E1, and p27Kip expression. *Glia* 2007; 55: 1638-1647
  - 14 Ma Y, Fiering S, Black C, Liu X, Yuan Z, Memoli VA, Robbins DJ, Bentley HA, Tsongalis GJ, Demidenko E, Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Transgenic cyclin E triggers dysplasia and multiple pulmonary adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4089-4094
  - 15 Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, Aboubakr AA, Kamel K, El-Sabah MT, Mokhtar NM. The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 292-302
  - 16 Li Z, Pützer BM. Spliceosomal protein E regulates neoplastic cell growth by modulating expression of Cyclin E/CDK2 and G2/M checkpoint proteins. *J Cell Mol Med* 2008
  - 17 Berglund P, Stighall M, Jirstrom K, Ryden L, Fernö M, Nordenskjöld B, Landberg G. Cyclin E confers a prognostic value in premenopausal breast cancer patients with tumours exhibiting an infiltrative growth pattern. *J Clin Pathol* 2008; 61: 184-191
  - 18 Akli S, Van Pelt CS, Bui T, Multani AS, Chang S, Johnson D, Tucker S, Keyomarsi K. Overexpression of the low molecular weight cyclin E in transgenic mice induces metastatic mammary carcinomas through the disruption of the ARF-p53 pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 7212-7222

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 •

## 世界华人消化杂志作者署名要求

**本刊讯** 本刊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。(常务副总编辑:张海宁 2008-04-28)

# 慢性胰腺炎诊治分析303例

肖南平, 欧阳钦

肖南平, 欧阳钦, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市610041

作者贡献分布: 肖南平与欧阳钦对此文所作贡献均等; 此课题设计由欧阳钦完成; 研究过程由肖南平操作完成; 数据分析由肖南平及欧阳钦完成; 本文写作由肖南平及欧阳钦完成。

通讯作者: 欧阳钦, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. qin.ouyang@163.com

收稿日期: 2007-12-19 修回日期: 2008-03-17

## Diagnosis and treatment of chronic pancreatitis: an analysis of 303 cases

Nan-Ping Xiao, Qin Ou-Yang

Nan-Ping Xiao, Qin Ou-Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qin Ou-Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. qin.ouyang@163.com

Received: 2007-12-19 Revised: 2008-03-17

### Abstract

**AIM:** To investigate the diagnosis and treatment status of chronic pancreatitis (CP) and its etiology-related factors.

**METHODS:** The clinical data of 303 CP patients in West China Hospital of Sichuan University from 1996 to 2006 were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Etiologically, patients with biliary diseases or over 5-year alcohol-drinking history accounted for a percentage of 30.7% and 37.0%, respectively. Furthermore, among biliary CP patients, 31.2% were found with a long-term alcohol-drinking history. Abdominal pain was the most common symptom, which covered a percentage of 86.8%. Complications were found in 146 of 303 CP patients (48.2%). Imaging techniques confirmed 196 patients (64.7%), while 38.9%, 53.5% and 7.6% of all the patients received drug treatment, surgical treatment and endoscopic treatment, respectively.

**CONCLUSION:** CP occurrence usually results from multiple etiological factors with a higher complication rate. Imaging examinations play an

important role in the diagnosis of this disease.

**Key Words:** Chronic pancreatitis; Etiology; Complication; Diagnosis; Therapy

Xiao NP, Ou-Yang Q. Diagnosis and treatment of chronic pancreatitis: an analysis of 303 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1359-1363

### 摘要

**目的:** 研究慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)的致病相关因素及诊治现状。

**方法:** 回顾性分析1996-2006年四川大学华西医院303例CP患者的临床资料。

**结果:** 病因方面, 嗜酒5年以上和胆源性疾病分别占37.0%, 30.7%, 其中胆源性CP患者中存在长期饮酒史者达31.2%。腹痛为最常见症状占86.8%。146例(48.2%)CP患者出现并发症。196例(64.7%)患者均通过影像学检查确诊。行内科药物治疗、手术治疗、内镜介入治疗者分别占38.9%、53.5%、7.6%。

**结论:** CP常有多种致病相关因素并存, 其并发症发生率高, 可发生多重并发症, 影像学检查在CP诊断中具有重要作用, CT检查可作为首选检查。

**关键词:** 慢性胰腺炎; 病因学; 并发症; 诊断; 治疗

肖南平, 欧阳钦. 慢性胰腺炎的诊治分析303例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1359-1363

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1359.asp>

### 0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)在欧美国家患病率较高, 近年来随着我国居民生活水平的改善, CP患者明显增多<sup>[1]</sup>. CP的发病机制尚未完全阐明, 其诊断与治疗仍是目前临床工作中的一个难点. 自2002年以来国内文献报道, 酒精已取代慢性胆道系统疾病成为目前我国CP的最主要病因, 慢性胆道系统疾病所占比例虽较以前有所下降, 但仍是我国CP的一个主要致病因

### ■背景资料

慢性胰腺炎的病因和发病机制尚未完全阐明. 胆道疾病是否是CP的致病相关因素目前国内外尚存在较大争议. CP的症状繁多而缺乏特异性, 容易出现多种多样并发症, 其诊断与治疗一直是目前临床工作中的一个难点.

### ■同行评议者

郭晓钟, 教授, 沈阳军区总医院消化内科

## ■ 研究前沿

CP的各种主要致病相关因素间的相互关系如何、并发症的发生状况以及如何提高CP的诊断及治疗效果是研究者的研究重点。

素<sup>[1-2]</sup>。我们在医疗实践中发现胆源性CP患者中也有相当部分同时存在长期饮酒史,各种致病相关因素间的相互关系如何,国内外鲜有报道,CP的并发症多种多样,但目前对其发生率的研究较少。对CP各种诊断与治疗方法的比较,国内也缺乏大宗的流行病学调查。为此,我们从流行病学角度对四川大学华西医院近10年303例CP住院患者的临床资料进行了研究,探讨CP致病相关因素的分布规律、临床特征和诊治现状,以期提高对本病的认识。

## 1 材料和方法

1.1 材料 四川大学华西医院1996-01/2006-12的住院CP患者303例,男234例,女69例,男女比例为3.39:1。发病时平均年龄为46.2岁,男女分别为49.4岁、40.2岁。CP的诊断标准参照2005年中华医学会消化病学分会制定的CP诊断标准<sup>[3]</sup>。在排除胰腺癌的基础上,将下述4项作为CP的主要诊断依据:(1)典型的临床表现(腹痛、胰腺外分泌功能不全症状);(2)病理学检查;(3)影像学上有CP的胰胆改变征象;(4)实验室检查有胰腺外分泌功能不全依据。(1)为诊断所必须,(2)阳性可确诊,(1)+(3)可基本确诊,(1)+(4)为疑似患者。参照酒精性CP诊断标准<sup>[4]</sup>,患者酒精摄入量>50 g/d,饮酒时间>5年,所以本研究中我们把饮酒者定义为平均每天饮酒大于50 g,持续5年或以上。

1.2 方法 所有患者的资料均登记在1个标准电子表格中。调查患者年龄、性别、发病时年龄。根据国内外公认的CP病因相关因素<sup>[5]</sup>,记录下列项目:(1)胆道系统疾病史,包括胆石症、胆道感染、胆道蛔虫病、Oddi括约肌功能紊乱(SOD);(2)长期喜吸烟饮酒史,包括烟龄和吸烟量、酒龄和乙醇摄入量;(3)胰腺外伤史;(4)胰管先天异常史;(5)腹部手术史;(6)高甘油三脂血症;(7)高钙血症;(8)自身免疫性疾病;(9)遗传因素。症状、体征及并发症;采用的诊断方法记录包括影像学检查、胰腺组织病理学、尿胰腺外分泌试验(BT-PABA试验)。对患者实施的治疗措施及其疗效。

**统计学处理** 用SPSS13.0软件进行统计分析,相对数用率、比表示,资料间的比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。按资料类型对各项致病相关因素行单因素分析,并计算各相关因素、诊断及治疗措施占全部病例的构成比。

## 2 结果

2.1 CP致病相关因素构成 在303例CP患者中,

194例(64.2%)同时存在2种或2者以上的致病相关因素,其中93例胆源性CP患者中有长期嗜酒史者29例(31.2%),同时嗜烟者35例(37.6%);112例酒精性CP患者中同时存在嗜烟习惯者100例(89.3%)。各主要致病相关因素占全部病例的构成比分别为酒精37.0%(112/303)、胆源性疾病30.7%(93/303)、吸烟47.9%(145/303)、急性胰腺炎24.4%(74/303)、十二指肠降段疾病4.6%(14/303)(包括十二指肠降段溃疡4例、恶性肿瘤8例、不明原因狭窄2例)、手术1.7%(5/303)、自身免疫性疾病1.3%(4/303)、遗传0.3%(1/303),仅10.2%(31/303)原因不明,考虑特异性。93例胆源性CP中合并胆囊结石46例(49.5%)、胆管结石26例(28.0%)、单纯性胆囊炎8例(8.6%)、胆管不明原因狭窄9例(9.7%)。其他少见的胆道疾病有:胆道蛔虫、先天性胆总管囊肿等。112例酒精性CP患者平均饮酒量222.1 g/d,范围为50-1000 g/d,饮酒时间平均为15.2(范围5-50)年。

2.2 不同性别CP患者的主要致病相关因素构成 本组303例CP患者中,男性234例,女性69例,男性患者为女性患者的3.39倍;男性患者的致病相关因素以酒精和吸烟为主,分别占46.6%、61.1%,而女性患者以胆源性疾病为主,占44.9%,这些构成比均明显高于异性。所有女性CP患者中,女性饮酒者仅3例,较男性患者少135例,女性吸烟者仅2例,较男性少141例,男女患者数的差异由此产生(表1)。

2.3 临床表现及实验室检查 在303例CP患者中,263例(86.8%)患者在确诊前均有反复发作的左、中上腹痛,其中放射至腰背部者占40.3%(106/263);132例(43.6%)伴有体质量下降(范围0.5-15 kg,平均6.4 kg),35例(11.6%)伴腹泻,73例(24.1%)伴腹胀纳差,18例(5.9%)伴脂肪泻,7例(2.3%)伴上消化道出血;入院时172例(56.8%)存在腹部压痛,23例(7.6%)发现腹部包块。仅2例无任何临床表现而在体检时发现,并由手术后病理组织学证实。实验室检查发现血糖升高者27例(8.9%)、血淀粉酶升高者68例(22.4%)、大便苏丹Ⅲ染色阳性18例(5.9%)、血脂升高者2例(0.7%)。

2.4 并发症 303例CP患者中出现并发症者146例,占48.2%。其中多重并发症(指同时存在两种或两种以上并发症)的发生率为12.9%(39/303),他们分别为2种并发症者9.6%(29/303),3种并发症者1.7%(5/303),4种并发症者1%(3/303),5

表 1 303例慢性胰腺炎不同性别的主要致病相关因素构成

致病相关因素	男性(n = 234)		女性(n = 69)	
	例次	%	例次	%
酒精	138	46.6 <sup>a</sup>	3	4.3
胆源性疾病	62	26.5	31	44.9 <sup>a</sup>
吸烟	143	61.1 <sup>a</sup>	2	2.9
急性胰腺炎	49	20.9	25	36.2
特发性	10	4.3	21	30.4 <sup>a</sup>
其他	32	13.7	8	11.6

<sup>a</sup>P<0.05 vs 异性.

种并发症者0.6%(2/303). 各种并发症的发生率分别为: 胰管结石26.7%(81/303), 胰腺假性囊肿22.4%(68/303), 胆道梗阻征象(均为B超提示)15.5%(47/303), 糖尿病8.9%(27/303), 不同程度的胸腹水8.6%(26/303), 区域性门脉高压症3.3%(10/303), 上消化道出血2.3%(7/303), 脾静脉栓塞1.3%(4/303), 胰腺癌1.7%(5/303)(均系手术后病理组织学证实), 消化性溃疡1.3%(4/303), 包括十二指肠球部溃疡3例, 胃溃疡1例, 肺结核0.3%(1/303).

**2.5 CP的诊断** 本组经外科手术行组织学和/或细针穿刺活检确诊107例(35.3%), 其余196例(64.7%)患者均通过影像学检查确诊. 各种影像学检查的检出率分别为: B超51.1%(142/278), CT 86.5%(193/223), 磁共振成像胰胆管造影(MRCP)84.5%(62/73), 内镜逆行胰胆管造影(ERCP)93.6%(42/47), 超声内镜(EUS)75.0%(9/12), 腹部平片27.3%(6/22). B超结合CT 87.7%(179/204), B超结合MRCP 89.9%(62/69).

**2.6 治疗** 全部病例中行内科药物治疗者118例(占38.9%), 外科手术治疗者162例(53.5%), 内镜介入治疗者23例(7.6%). 内科药物治疗出院时疼痛缓解或减轻、饮食改善者108例(91.5%), 但其中23例(16.3%)反复在我院住院两次以上, 3例达10余次; 对外科手术治疗和内镜介入治疗者, 以出院时疼痛缓解或症状明显减轻、黄疸消退、饮食改善者计为治疗有效, 二者的有效率分别为96.9%(157/162)、91.3%(21/23).

### 3 讨论

CP是一种慢性进展性、不可逆的胰腺炎性疾病. 病理特征为胰腺纤维化. 临床上以上腹疼痛为主要症状, 随着疾病的进展, 常出现胰腺内外

分泌功能不全及胰腺钙化、胰管结石和胰腺假性囊肿形成等并发症, 发病25年后的死亡率高达25%-50%. 本组资料表明, 该病多见于中年男性, 与国外文献报道一致<sup>[6-7]</sup>.

CP的致病相关因素甚多. 本研究表明, 64.2%的CP患者同时存在两种或两者以上的致病相关因素. 目前认为CP的主要致病相关因素为长期嗜酒和胆道疾病. 在西方发达国家中两者所占比例分别为60%-90%、8%-12%<sup>[6-8]</sup>; 而国内的文献报道<sup>[1-2]</sup>二者分别占34.58%-35.4%、31.5%-33.9%. 因此酒精是CP的主要致病相关因素已经得到国内外学者公认; 至于酒精的具体摄入量和持续时间目前尚无定论. 但胆道疾病是否是CP的致病相关因素目前尚存在较大争议. 西方国家多认为胆道疾病不是慢性胰腺炎的病因<sup>[6]</sup>, 而我国学者认为, 慢性胆道系统疾病仍是一个主要致病因素<sup>[1-2]</sup>. 我们的研究结果显示, 长期嗜酒和胆道疾病所占比例分别为37.0%、30.7%, 与国内文献报告相近. 但进一步研究发现, 胆源性CP患者同时存在长期饮酒史者达31.2%, 同时嗜好吸烟者达37.6%, 因此作者认为, 对胆道疾病在我国CP的地位与作用值得国内同行进一步的研究. 此外, 吸烟也被认为是CP的危险因素, 可能对CP的形成和发展起着一定的促进作用<sup>[8-9]</sup>. 在西方国家酒精性CP患者中同时存在饮酒吸烟习惯者高达95%<sup>[8-9]</sup>, 本组也高达89.3%. 国外研究发现吸烟与慢性酒精性胰腺炎诊断年龄的提前以及胰腺钙化及糖尿病的出现密切相关<sup>[9]</sup>. 关于急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)能否发展为CP目前尚存有争议. 本组中高达24.4%, 与国外报道相似<sup>[6,8,10]</sup>. 尽管不能除外有将既往的CP急性发作误诊为AP的可能性, 但仍可看出两者之间存在紧密联系. 进一步分析各种致病相关因素在不同性别中的构成比发现, 男性以吸烟与酒精最常见, 这也可能是导致本组男性明显多于女性的原因; 女性以胆源性疾病最常见, 其次为特发性. 这与国内文献报告一致<sup>[1-2]</sup>. 总之, CP可能是多种因素共同作用所引起.

本研究表明, 腹痛是CP最常见的症状, 多位于左、中上腹, 并放射到腰背部, 疼痛程度、发作频度和持续时间不一. 其发生机制尚不明确, 可能和胰管梗阻导致压力升高、炎症病变侵及周围神经及疼痛介质增多等因素有关. 此外, 体重下降也较为常见. 值得注意的是, 既往诊断CP传统五联征中的脂肪泻在本组非常少见, 仅占5.9%; 而且本组有2例无任何表现, 仅在体检时

### ■ 相关报道

CP并发症的发生状况, 国内缺乏大宗病例报告. 影像学检查是目前我国诊断CP的主要手段, 诊断性ERCP不再是诊断CP的常规要求. 内镜下介入治疗CP有创伤小、疗效好、可重复性等优点, 但目前国内开展较少.

### ■应用要点

本研究结果揭示我国CP的主要致病相关因素除酒精外,胆道系统疾病仍是主要致病相关因素之一,但约1/3胆源性CP合并有长期饮酒史。

影像学上发现胰腺增大.其原因可能在于胰腺腺泡组织必须破坏达90%以上才产生脂肪泻,胰腺80%被破坏时可出现糖尿病的发生率约70%.CP的体征很少,除上腹部压痛外,其他如黄疸、上腹部包块、腹肌紧张等均很少见.其上腹部包块通常为胰腺假性囊肿,多系胰管阻塞或狭窄导致压力增大,囊性扩张形成.实验室检查提示在CP的急性发作期血淀粉酶也可以升高,而认为有较大诊断价值的BT-PABA试验,在本组无1例进行,应该引起国内同行注意.总之,CP症状繁多而无特异性,早期诊断困难.

慢性胰腺炎易出现多种多样的并发症,本组高达48.2%,也是患者的首诊原因之一.值得注意的是,本组多重并发症的发生率达12.9%,这在国内尚未见报道.CP常见的并发症有胰管结石、胰腺假性囊肿、胆道梗阻等,而糖尿病在本组的发生率仅8.9%,远远低于国外文献报道的40%以上<sup>[6]</sup>.值得注意的是,胰管结石在我国的发生率高达26.7%,与西方国家的文献报道相似(30%)<sup>[11]</sup>.这在国内尚属首次报道,也可能是本组实施手术治疗的比例较高(53.5%)的原因之一.由于胰管结石是造成患者慢性持续性上腹痛及脂肪泻、消瘦等症状的主要原因,也是诱发胰腺癌的高危因素之一<sup>[11-12]</sup>,因此多数学者认为胰管结石一旦确诊就需治疗.

本研究表明,影像学检查是目前我国诊断CP的主要手段,本组达64.7%.虽然组织学检查是CP诊断的金标准,但因为标本较难获得,故仍不常用.在各种影像学检查中,ERCP一直被视为CP诊断的金标准,在本组中其单独检出率最高,为93.6%.在疾病的早期阶段,ERCP就可以发现胰管一级或二级分枝的扩张或不规则变化,后期则可以发现主胰管的相应变化.当其他方法未能诊断CP或患者急性胰腺炎反复发作,考虑需要进行介入性治疗时ERCP是很好的选择.但作为有创检查,ERCP存在严重并发症(达10%,1%为致命性)的风险,因此无创性检查方法日益受到关注.腹部B超价格低廉,应用广泛,若胰腺出现局部或弥漫性增大,边缘不规整,内部光点增多不均匀,胰管形态不规则和扩张,可初步诊断为CP.但腹部B超检查胰腺易受胃肠道气体的干扰,对CP的检出率较低,本组仅51.1%,故可作为初步筛选手段.超声内镜早期诊断CP的诊断敏感性优于腹部B超检查,在本组中为75%,这与国内文献报告相近<sup>[5]</sup>.但EUS对肿块型CP与胰腺癌的鉴别仍然存在一定的难度,22%-36%的

肿块型CP被误诊为胰腺癌<sup>[13]</sup>,虽然胰管内超声及超声下细针穿刺活检有助于二者的鉴别,但目前国内开展较少,其诊断价值尚有待于进一步探讨.CT、MRCP能清楚显示胰腺实质及周围的变化,二者对CP的诊断敏感性在本组均为85%左右,他们对CP的诊断价值与ERCP相近,提示诊断性ERCP不再是诊断CP的常规要求,这与国外报告一致<sup>[6,14]</sup>.但MRCP对钙化和结石的显示不如CT清楚,同时CT对假性囊肿等CP并发症亦是较好的诊断方法,加上目前国内CT应用较为广泛,故我们推荐将CT作为诊断CP的首选检查.若CT扫描发现胰管或胰腺实质的钙化,主胰管扩张伴胰腺实质的萎缩则CP的诊断明确.B超结合CT、B超结合MRCP的检出率高于单独选用CT和MRCP检查,我们的初步研究显示联合应用影像学检查方法有助于提高CP的诊断率.但值得注意的是,上述影像学表现很多方面均与胰腺癌相似,而且胰腺癌也可合并CP,因此应注意对二者进行鉴别,必要时可行剖腹探查;同时,部分CP患者可在患病后10-15年发生胰腺癌,其癌变比例也高于正常人群,故应加强对CP患者的密切随访.

CP的治疗应以控制症状、改善胰腺功能和治疗并发症为重点,强调以个体化治疗为原则的综合治疗<sup>[15]</sup>.治疗的关键在于尽早发现、明确病因.戒酒和处理胆道疾病是主要的去除病因方法,常可阻止CP的病情发展.CP目前的治疗手段主要有3种:内科药物治疗、手术治疗、内镜下介入治疗.根据患者不同的病理、病情、并发症、临床表现,选择不同的治疗方法<sup>[6,16]</sup>.一般情况下,无胰、胆管狭窄、梗阻、结石和局部肿块的患者可先行内科药物治疗,胰管括约肌和胰头部胰管狭窄、梗阻、结石最适于内镜治疗.内科药物或内镜治疗无效,顽固性疼痛或胰、胆管明显狭窄、梗阻、结石,逐渐增大的假性囊肿,局部明显肿块等多需接受外科手术治疗.本研究表明,只要适应证选择得当,各种方法均能获得较好的近期疗效.就内科药物治疗而言,虽然近期症状缓解率高,但症状容易反复,与国内文献报告一致<sup>[17]</sup>.内镜下介入治疗具有创伤小、疗效好、可重复等优点<sup>[18-19]</sup>.国外文献报道<sup>[18]</sup>,内镜下介入治疗CP后疼痛的两年缓解率高达66%,但需要较高的技术与设备.目前内镜下介入治疗CP在国内开展较少,本组仅占7.6%,这应引起国内同行注意并探讨其远期疗效.

总之, 本组资料表明, CP常有多种致病相关因素并存, 胆源性CP患者同时存在长期饮酒史者达1/3. CP症状多而无特异性, 其并发症发生率高, 可发生多重并发症, 胰管结石较常见. 影像学检查是目前我国诊断CP的主要手段, CT、MRCP对CP的检出率与ERCP相近. 内科非手术治疗虽然近期症状缓解率高, 但易反复, 内镜下介入治疗还有待积极开展.

#### 4 参考文献

- 1 陈浮, 李兆申, 王洛伟, 李淑德. 慢性胰腺炎的相关因素及诊治分析. 中华消化杂志 2006; 28: 515-518
- 2 孙钢, 宁晓红, 钱家鸣. 慢性胰腺炎321例致病因素分析. 中国医刊 2002; 37: 30-32
- 3 中华医学会消化病学分会. 慢性胰腺炎诊治指南(2005年, 南京). 胃肠病学 2005; 10: 234-235
- 4 钱家鸣, 李景南, 吕红, 田自力, 陶丽萍. 酒精性与胆源性慢性胰腺炎的临床特点的异同. 中华消化杂志 2002; 22: 141-143
- 5 周志超, 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 1840-1852
- 6 Nair RJ, Lawler L, Miller MR. Chronic pancreatitis. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1679-1688
- 7 Dite P, Stary K, Novotny I, Precechtelova M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 749-750
- 8 Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 286-290
- 9 Maisonneuve P, Lowenfels AB, Mullhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L, Frulloni L, Ammann RW. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 2005; 54: 510-514
- 10 Thuluvath PJ, Imperio D, Nair S, Cameron JL. Chronic pancreatitis. Long-term pain relief with or without surgery, cancer risk, and mortality. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 159-165
- 11 Deviere J, Delhaye M, Cremer M. Pancreatic duct stones management. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998; 8: 163-179
- 12 Smits ME, Rauws EA, Tytgat GN, Huibregtse K. Endoscopic treatment of pancreatic stones in patients with chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 556-560
- 13 Kahl S, Glasbrenner B, Leodolter A, Pross M, Schulz HU, Malfertheiner P. EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 507-511
- 14 Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 2007; 132: 1557-1573
- 15 Dite P. Chronic pancreatitis--a disease we can treat but cannot cure. *Vnitr Lek* 2004; 50 Suppl 1: S98-S102
- 16 王炳煌. 慢性胰腺炎治疗方法选择. 内分泌外科杂志 2008; 2: 4-6
- 17 王炳煌, 张小文, 李晓, 朱红, 王琳, 李越华, 崔江云, 李立春. 慢性胰腺炎的诊断和治疗. 外科理论与实践 2004; 9: 301-303
- 18 Rosch T, Daniel S, Scholz M, Huibregtse K, Smits M, Schneider T, Ell C, Haber G, Riemann JF, Jakobs R, Hintze R, Adler A, Neuhaus H, Zavoral M, Zavada F, Schusdzarra V, Soehendra N. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: a multicenter study of 1000 patients with long-term follow-up. *Endoscopy* 2002; 34: 765-771
- 19 Heyries L, Sahel J. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6127-6133

#### ■同行评价

本文对有关慢性胰腺炎的病因、临床表现、诊断及治疗等诸多方面结合较大宗的病例进行了较为系统的回顾性分析, 取得的一些结论对临床医师有较大的指导价值, 所提出的一些问题值得消化界同仁进一步探讨, 学术价值较高.

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 •

### 世界华人消化杂志标点符号用法

**本刊讯** 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

## 输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石126例

陈万发, 余忠, 罗强, 王文

### ■背景资料

胆管结石的高发病率, 高复发率和高再次手术率而成为肝胆外科临床研究工作重点, 术中细小肝内胆管结石及壶腹部嵌顿结石的处理仍非常棘手, 近10年将泌尿微创器械及技术用于胆管结石的治疗, 但尚未对其进行系统研究和开发。

陈万发, 余忠, 罗强, 王文, 内江市第六人民医院外科 四川省内江市 641001

作者贡献分布: 此课题设计及主要手术操作由陈万发和余忠完成; 病例选择, 资料收集和整理由罗强和王文完成; 本论文写作由陈万发完成。

通讯作者: 余忠, 641001, 四川省内江市, 内江市第六人民医院外科. yuzhong0@yahoo.cn

收稿日期: 2007-11-14 修回日期: 2008-03-28

### Treatment of bile duct stones with ureteroscopic air-pressure ballistic lithotripsy: an analysis of 126 cases

Wan-Fa Chen, Zhong Yu, Qiang Luo, Wen Wang

Wan-Fa Chen, Zhong Yu, Qiang Luo, Wen Wang, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital of Neijiang City, Neijiang 641001, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Zhong Yu, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital of Neijiang City, Neijiang 641001, Sichuan Province, China. yuzhong0@yahoo.cn  
Received: 2007-11-14 Revised: 2008-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the efficacy, feasibility, reliability and safety of ureteroscopic air-pressure ballistic lithotripsy (UAPBL) in the treatment of bile duct stones.

**METHODS:** The clinical data of 126 patients (since the year 2002), who were diagnosed with bile duct stones and treated with UAPBL, were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** All the patients underwent UAPBL smoothly, and 119 patients (94.4%) were cured successfully after they received lithotripsy only once. There were no complications and the post-operative outcomes were satisfactory.

**CONCLUSION:** UAPBL can effectively treat bile duct stones with a low complication incidence.

**Key Words:** Bile duct stone; Ureteroscopic air-pressure ballistic lithotripsy; Treatment

### ■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

Chen WF, Yu Z, Luo Q, Wang W. Treatment of bile duct stones with ureteroscopic air-pressure ballistic lithotripsy: an analysis of 126 cases. *Shijie Huaren*

*Xiaohua Zazhi* 2008; 16(12): 1364-1367

### 摘要

**目的:** 探讨输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石的作用及相关问题。

**方法:** 回顾性分析2002年以来本院输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石患者126例的临床资料。

**结果:** 全组病例碎石顺利, 一次性碎石清石成功119例(94.4%), 无并发症。

**结论:** 采用输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石具有碎石快捷, 清石彻底, 残石率低, 手术时间短, 费用低廉, 并发症少, 安全高效的特点。

**关键词:** 胆管结石; 输尿管硬镜气压弹道碎石; 治疗

陈万发, 余忠, 罗强, 王文. 输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石126例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(12): 1364-1367

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1364.asp>

### 0 引言

胆管结石在胆石症中的比例高达50%以上, 由于该病的高发病率, 高复发率和高再次手术率而成为肝胆外科临床研究工作重点. 胆管结石的治疗以手术为主, 在“去除病灶, 取尽结石, 矫正狭窄, 通畅胆流, 防止复发”的治疗原则中“取尽结石”是胆管结石症手术治疗成功的关键, 也是胆道外科治疗的难点. 其困难在于: 一是位于II级以上肝内胆管的结石不易清除, 二是嵌顿在胆总管壶腹部的结石难以取出, 三是危重患者术中病情不允许耗费过长时间取石. 对于难取性胆管结石, 无论是切开胆总管用胆石钳夹取, 或是用取石勺搔刮, 还是用胆道镜取石网篮套取均难以成功. 因此, 必须寻找一种更加理想的取石器械和排石方法. 我院于2002-07开始采用输尿管硬镜气压弹道碎石技术治疗胆管结石, 临床应用病例126例, 现对其进行分析总结。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院2002-07至今采用输尿管硬镜气压弹道碎石技术治疗胆管结石, 临床应用病例126例, 男58例, 女68例, 年龄26-75(平均57.2)岁, 其中输尿管硬镜气压弹道碎石治疗术后胆管残余结石56例; 开放手术中经胆囊管或切开胆总管行输尿管硬镜气压弹道碎石治疗肝内胆管结石及胆总管下段壶腹部嵌顿结石57例, 在腹腔镜下经胆总管探查及治疗胆管结石13例. 本组病例中急诊32例, 平诊94例. 均以B超、CT、或胆道造影等检查确诊. 输尿管硬镜为德国Wolf F8-9.8, 气压弹道碎石机为瑞士EMS.

### 1.2 方法

1.2.1 经腹壁窦道途径: 拔除窦道引流管, 插入输尿管硬镜, 维持一定水压, 使管道充盈, 视野清晰, 严格遵守循腔进镜原则. 看到胆总管腔隙后, 利用手法拉直窦道与胆总管形成的夹角, 先指向胆总管下段, 发现结石后从输尿管镜操作孔插入气压弹道碎石杆, 对准结石, 启动气压, 将结石碎成2 mm以下细碎块, 待结石上浮后将镜身通过胆总管壶腹部进入十二指肠, 然后退回镜身, 利用液体压力将结石碎块冲入十二指肠或经窦道口溢出, 再将镜身转向肝内胆管方向, 同法处理肝内胆管结石, 大的结石碎块也可用鳄鱼钳自窦道取出, 待结石清除干净后, 检查胆管壁无损伤后结束手术.

1.2.2 开腹经胆囊管残端或切开胆总管途径: 在胆囊管相对较粗的情况下, 常规胆囊切除后有意留长胆囊管, 经胆囊管残端送输尿管硬镜入胆总管, 当胆囊管内径过细时, 可用血管钳、胆道探子或带气囊导管扩张后即可插入输尿管硬镜, 碎石方法同前, 碎石结束后将胆囊管结扎即可, 无需安置T形引流管. 小于3 mm的胆囊管需切开胆总管探查和处理结石术后需留置T形管引流.

1.2.3 腹腔镜下经胆囊管或胆总管切开途径: 腹腔镜下先解剖胆囊三角, 钛夹钳闭胆囊动脉, 游离胆囊管后, 紧靠胆囊颈钳闭胆囊管, 逆行剥离胆囊后, 距胆总管1.0 cm处纵形剪开胆囊管0.5 cm, 将输尿管硬镜套转换器从剑突下主操作孔进入(向上探查肝内胆管时输尿管硬镜应从脐部穿刺孔进入), 经胆囊管切口将输尿管硬镜插入胆总管, 对胆囊管插入失败者, 可切开胆总管置入输尿管硬镜进行探查及碎石治疗, 结石处理完成后, 经胆囊管者在其近端用钛夹钳闭即可, 胆总管切开者, 可根据术中情况直接缝合胆总

管切口或安置T形管引流.

## 2 结果

全组126例, 其中肝内胆管结石38例, 胆总管结石88例(其中继发结石16例, 壶腹部嵌顿结石56例), 一次性碎石清石成功119例(94.4%), 两次成功6例, 另有1例三次手术也未能将结石取尽, 治愈率99.2%, 最终残石率为0.8%. 手术时间, 术后残石组: 8-45 min, 平均 $28 \pm 19$  min; 开放手术组: 68-145 min, 平均 $102 \pm 33$  min; 腹腔镜组: 56-128 min, 平均 $92 \pm 27$  min, 全组病例未发生胆道出血, 胆管损伤及十二指肠破裂等并发症.

## 3 讨论

我院在应用输尿管硬镜气压弹道碎石治疗输尿管结石10余年的经验基础上, 于2002-07开始将该设备用于胆管结石的治疗, 通过5年的临床应用研究, 成功地将输尿管硬镜气压弹道碎石用于: (1)胆道术后残余结石的处理, (2)术中II-IV级肝内细小胆管结石的治疗, (3)对术中术后胆总管壶腹部嵌顿结石的治疗, (4)胆囊结石下排的继发性胆总管结石治疗, (5)腹腔镜胆囊切除后用输尿管硬镜行胆总管探查及对结石的处理等方面, 取得了丰富的临床经验. 目前该设备已成为本院治疗胆管结石最有力的武器. 该技术已成为本院治疗胆管结石最有效的方法.

腹壁窦道, 肝, 胆道及十二指肠均系软性组织和器官, 在经腹壁窦道进入胆管时尽管两者之间存在着钝角, 甚至锐角, 但通过施术者使镜身方向的变动, 可以拉直窦道与胆道间的夹角, 向下通过胆总管下段的十二指肠乳头使输尿管镜进入十二指肠肠腔, 向上可达IV级肝内胆管<sup>[1]</sup>从而使肝内胆管结石历历在目, 配合气压弹道碎石, 将结石击碎成2 mm以下碎块乃至粉末, 从而使结石碎块随冲洗水流进入肠腔或经窦道排出体外<sup>[2]</sup>. 气压弹道碎石是将压缩气体产生的能量驱动碎石器手柄内的子弹体, 子弹体高速运动撞击撞针, 撞针冲击结石而将其击碎. 因其振幅极短, 前后振荡不超过2 mm, 只要不直接加压于胆管壁<sup>[3]</sup>, 便不会造成胆管, 肝脏及十二指肠的损伤. 气压弹道碎石的动能为机械能, 故无热、电损伤之虑.

输尿管硬镜从腹壁窦道转向胆总管下段寻找管腔的操作以及镜身通过十二指肠乳头进入十二指肠肠腔的操作为本术式的两个核心技术: (1)镜头经腹壁窦道抵达胆总管时先见光滑内壁,

### ■创新亮点

在腹腔镜或开放手术中经胆囊管置入输尿管镜气压弹道碎石治疗继发性胆总管结石为本临床研究首创.

### ■应用要点

输尿管硬镜气压弹道碎石技术用于胆管结石, 拓宽了胆管结石的治疗途径, 临床实用性强, 具有推广应用价值。

变动输尿管镜方向拉直腹壁窦道与胆总管之间的夹角, 在将镜身压向肋弓方向的过程中, 视野中只见管壁而不见管腔, 此时应把稳镜身, 只能变动角度而不能向前推进<sup>[4]</sup>, 以免戳穿胆总管后壁导致严重并发症。当锐角拉直时, 总管腔隙出现, 方可继续循腔进镜, 对置镜困难者, 可先用能弯曲的纤维胆道镜插入胆总管下段, 从操作孔置入输尿管导管作为引导, 再插入输尿管硬镜便十分安全。(2)镜身通过十二指肠乳头时, 切勿使用暴力, 以防假道形成或戳破十二指肠肠壁。在寻找其放射状腔隙时要耐心, 细心。采用提高冲洗液液袋, 加大液压措施可促使奥狄氏括约肌张开, 应用阿托品等平滑肌松弛药物可解除奥狄氏括约肌痉挛, 必要时可从输尿管镜操作孔插入F<sub>4</sub>导管, 先使导管通过十二指肠乳头, 然后在导管的引导下使镜身通过十二指肠乳头而入肠腔<sup>[5]</sup>。一旦进入十二指肠则视野开阔, 见到肠壁黏膜皱襞<sup>[6]</sup>及绒毛为判断进入十二指肠肠腔的指示特征。手术操作必须在良好的麻醉下进行, 完全无痛及肌肉松弛是插入输尿管硬镜的必备条件, 严格遵守循腔进镜的原则, 掌握持镜稳妥, 动作轻柔, 缓慢进退, 切勿盲目进镜等操作要领。为保证输尿管硬镜视野清晰, 冲洗液应保持一定水压, 使管腔适度扩张, 以管壁清晰为度, 但应避免压力过大导致管腔增粗使结石游动而增加碎石难度。在实施弹道碎石时应对准结石中心部位, 避免碎石杆直接接触管壁, 尤其是不能施压于胆管壁, 以免造成组织损伤, 在视野不清时不要起动气压, 为防止碎石杆滑动伤及管壁, 碎石时可间断启动气压或单发撞击, 对于游动结石, 应将结石抵向管壁固定后再将其击碎。

输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆管结石有以下优势: (1)由于镜身前端直径仅3.5 mm, 他能进入更细的肝内胆管(扩张的IV级胆管), 因而可以更加充分地清除细小肝内胆管之结石。(2)细小的硬镜前端可以更容易通过胆总管下段出口而进入十二指肠, 从而打开快速清除结石的通道。(3)特有的碎石功能可将结石击成细碎块乃至粉末, 尤其是对壶腹部嵌顿结石有独特碎石作用。(4)击碎的结石细碎块及粉末通过液压冲洗很容易经细小的镜身与腹部窦道壁之间的间隙排出或随冲洗水流进入十二指肠。(5)如在腹腔镜手术中用输尿管硬镜经较粗的胆囊管行胆道探查, 则可省去安置T管引流之苦及防止可能带来的并发症。(6)气压弹道碎石能量大(机械

能), 碎石能力强, 可快速清除IV级以上肝内胆管内的巨大结石, 手术多可一次完成。(7)清石较彻底, 残留结石少, 再次手术率低。(8)无液电碎石及等离子爆破碎石的热电损伤之虑。本技术亦有其局限性, 对于输尿管镜操作技术不熟练者, 存在着腹壁窦道, 胆管, 十二指肠损伤的危险, 尤其是在胆管炎症重, 组织变脆时容易发生。对于肝右后叶, 左内叶, 尾状叶等与肝总管夹角极小的死角部位则非输尿管硬镜所能及, 故该区域内的肝内胆管结石不适宜使用本方法。而这些部位的碎石则可用能弯曲的胆道镜液电碎石或等离子碎石等技术解决。对于肝内胆管多发性结石并囊性扩张者, 其胆管狭窄严重, 且常合并明显肝纤维化, 无论什么取石方法都非常费时费力, 也不可能将结石取尽, 而取石后残余结石的松动及脱落, 还可能引起胆总管下段急性梗阻, 故应该采取其他手术方法治疗。

实践证明, 输尿管硬镜气压弹道碎石技术具有碎石快捷, 清石彻底, 残石率低, 手术时间短, 费用低廉, 并发症少, 安全高效的特点。特别是有大量结石积聚而尚无明显肝萎缩及胆管狭窄的病例, 采用本项技术不但能够有效清除结石, 而且能最大限度地保存尚有功能的肝脏组织。本方法与纤维胆道镜及其他碎石技术比较<sup>[7-11]</sup>, 无论是治疗时间及清石彻底性上均有一定优势, 尤其在清除细小肝内胆管结石及处理胆总管壶腹部嵌顿结石等难取性结石<sup>[12-16]</sup>上有独特的治疗效果。输尿管硬镜气压弹道碎石技术用于胆管结石, 拓宽了胆管结石的治疗途径, 临床实用性强, 具有推广应用价值。

### 4 参考文献

- 1 侯东生, 刘衍民. 电视输尿管硬镜治疗胆道结石. 中国内镜杂志 1997; 8: 47-48
- 2 田立新, 龙云, 袁小东, 李均乐, 卢敏俊, 孙民焱. 应用电视输尿管镜治疗23例肝内胆管多发结石的经验. 山西医药杂志 2002; 31: 138
- 3 邓伟均, 陈占斌. 输尿管硬镜气压弹道碎石联用纤维胆道镜治疗术后胆道难取性结石. 中华普通外科杂志 2000; 8: 496
- 4 陈万发, 余忠, 罗强. 输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆道术后残余结石. 消化外科杂志 2006; 5: 123
- 5 余忠, 陈万发, 罗强. 输尿管镜气压弹道碎石在治疗胆总管壶腹部嵌顿结石中的作用. 中国内镜杂志 2007; 13: 214-215
- 6 张文生, 吴启菁, 陈孝安, 丁建业, 凡曙青, 李锦红. 输尿管肾镜在胆道结石治疗中的应用体会. 中国内镜杂志 2004; 10: 74-84
- 7 王卫东, 刘子贤, 梁伟芝. 经纤维胆道镜液电碎石术治疗胆道结石. 岭南现代临床外科 1996; 1: 31
- 8 焦晓春. 术后胆总管壶腹部嵌顿结石胆道镜处理体会. 中国内镜杂志 2001; 7: 95
- 9 周望先, 周明忠, 蒙谦, 刘培根, 徐晓光. 经胆道镜

- PSWL等离子碎石在治疗肝胆管疑难结石中的应用. 中国内镜杂志 2005; 11: 214-215
- 10 程里生. 纤维胆道镜治疗胆道残余结石的应用研究. 中国内镜杂志 2006; 12: 1343
- 11 刘树清, 陈书忠, 吴云, 余明豪. 腹腔镜联合胆道镜治疗胆管结石160例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2734-2736
- 12 郑小明. 压腔内弹道碎石术治疗胆道术后难取性残留结石. 中国医学工程杂志 2004; 12: 71-73
- 13 汪祖来, 温建机, 孔勇, 李陆发, 李柏钧. 输尿管镜、气压弹道碎石结合纤维胆道镜在胆石症中的应用. 华夏医学 2005; 18: 253-254
- 14 陈宝芝. 气压弹道碎石在胆道残余结石中的应用. 齐齐哈尔医学院学报 2005; 26: 1311
- 15 余忠, 陈万发, 罗强. 术中经胆囊管输尿管硬镜气压弹道碎石治疗胆总管壶腹部嵌顿结石. 中华临床医学实践杂志 2006; 5: 158-159
- 16 陈万发, 余忠, 罗强. 输尿管硬镜在腹腔镜胆道探查中的作用. 中华临床医学实践杂志 2007; 6: 312-313, 318

■同行评价  
本文内容全面, 论述条理, 拓宽肝胆管结石的治疗方法, 实用性强, 具有临床推广前景.

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 •

### 世界华人消化杂志名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化, 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, LD<sub>50</sub>, 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分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.(常务副总编辑: 张海宁 2008-04-28)

## 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 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈国凤 主任医师

中国人民解放军第302医院感染七科

陈红松 副研究员

北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所

陈亚军 主任医师

首都医科大学附属北京儿童医院普外科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

韩新巍 教授

河南省郑州大学第一附属医院放射科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄晓东 副主任医师

湖北省武汉市中心医院消化内科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医院普外科

季加孚 教授

北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

李延青 教授

山东大学齐鲁医院消化科

林胜璋 副教授

温州医学院附属二院肝胆外科

刘冰熔 教授

黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

刘铁夫 教授

哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心

吕志武 教授

哈尔滨医科大学附属第二临床医学院消化科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院普通外科

王鲁 副教授

复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

许文燮 教授

上海交通大学生命科学院生物医学工程系

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

张绪清 副教授

中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

张占卿 主任医师

上海市(复旦大学)公共卫生中心