

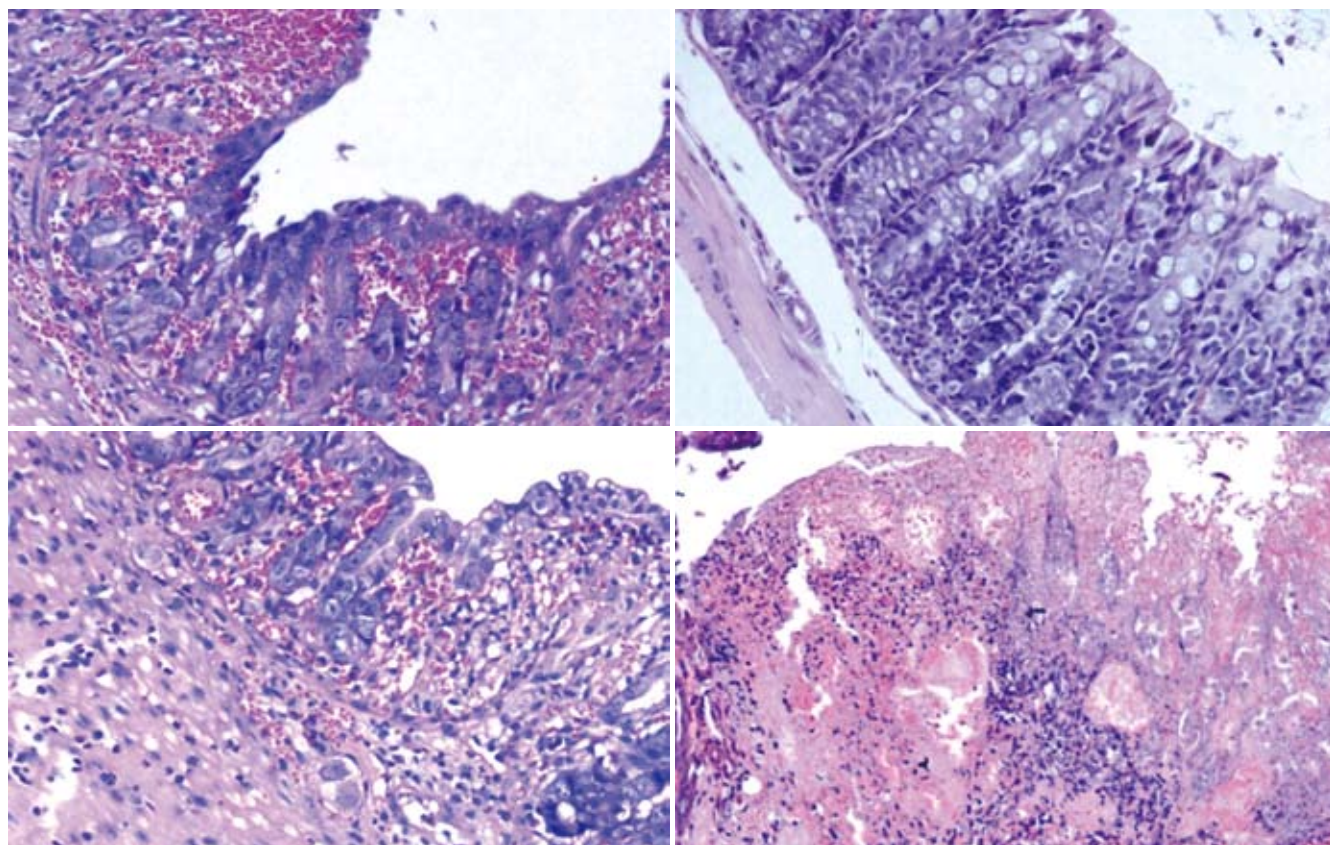
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年6月18日 第16卷 第17期 (Volume 16 Number 17)



17 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《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®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海峰教授
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
唐芙蓉教授
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
朱人敏教授
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
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
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
刘正穗教授
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
闫惠平研究员
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
杨业发教授
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
刘海峰主任医师
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
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
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6月18日 第16卷 第17期 (总第241期)

述 评	1833 注重对肝纤维化的防治 栾新明, 贾皓
基础研究	1837 5-Aza-dC和TSA对胃癌细胞系p16和hMLH-1基因甲基化水平及表达的影响 朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋 1842 5-氮杂胞苷抑制肝癌细胞恶性表型和逆转甲基化状态的作用及机制 董科, 李波, 覃扬, 俞小炯, 温尔刚 1849 胰腺癌细胞基因组范围内的基因缺失 林连捷, 王玉峰, 郑长青, 金玉, 胡刚正, 刘香, 林艳 1855 联合应用热休克蛋白70与卡介苗对Hcaf细胞的抑制作用 杨野, 刘宇, 郭仁宣, 傅庆国 1859 重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体小鼠树突状细胞对受体小鼠淋巴细胞激活的影响 朱研, 李涛, 朱继业, 陈建飞, 冷希圣
临床研究	1866 食管鳞癌肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶1的鉴定 高红军, 周兰萍, 毛友生, 王伟, 乔媛媛, 刘芳, 蔡毅然, 赵晓航 1873 干扰素调节因子3在慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞中的表达及意义 安宝燕, 谢青, 王晖, 贾妮娜, 沈怀诚, 蔡伟, 俞红, 郭清 1880 肝硬化病因及临床特点分析178例 孟晓丹, 向国卿, 贺小虎, 王炳元 1885 大肠癌组织抑癌基因DPC4和TGF- β 1的表达意义 张东伟, 杨维良, 姚强
文献综述	1890 无痛内镜术在胃肠道疾病诊治中的应用 徐贵森, 吴晓玲, 刘合年 1897 NADPH氧化酶产生的活性氧簇对肝星状细胞内信号转导的调控 何文华, 朱莹 1904 PTEN与肝脏疾病研究进展 郝礼森, 张晓岚 1912 遗传多态性与肠易激综合征发病的关系 邱敏霞, 刘诗 1917 排便图式及其在便秘治疗中的转换与构建 陈峰, 蔡而玮, 邓正明
研究快报	1920 N-去硫酸肝素对体外培养人胃癌SGC-7901细胞bFGF表达的影响 陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 耿建国 1926 NF- κ B p65反义寡核苷酸对TNBS结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子和NF- κ B表达的影响 李弼民, 吕农华, 谢勇, 陈江, 朱莹, 易静 1932 食物过敏对小鼠肠道屏障功能及CD4 ⁺ CD25 ⁺ 调节性T细胞的影响 黄煌, 郝鹏远, 罗予, 张利利
临床经验	1938 选择性断流术治疗门静脉高压症217例 谢敏, 曹亚娟, 潘一明, 许碧云

	<p>1942 评分法对门静脉高压症上消化道出血手术方式选择的指导 陈立波, 杨炼, 王国斌</p> <p>1946 内镜治疗胃肠道Dieulafoy病出血77例 崔俊, 刘运祥, 吴承荣, 黄留业</p> <p>1951 溃疡性结肠炎的临床及内镜特点分析120例 施斌斌, 黄重发, 朱清</p>
致 谢	1954 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1836 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>1841 中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知</p> <p>1848 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>1858 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>1865 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>1879 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>1884 世界华人消化杂志投稿方式</p> <p>1896 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>1903 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>1911 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>1916 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>1926 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知</p> <p>1931 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>1937 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>1945 世界华人消化杂志中文摘要要求</p>
封面故事	<p>李弼民, 吕农华, 谢勇, 陈江, 朱萱, 易静. NF-κB p65反义寡核苷酸对TNBS结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子和NF-κB表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1926-1931 http://www.wjgnet.com/1007-3079/16/1926</p>
本期责任人	<p>编务 江艳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 郭海丽; 责任编辑 张海宁; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 30%;"> <h2 style="text-align: center;">世界华人消化杂志</h2> <p style="text-align: center;">Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p style="text-align: center;">吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p style="text-align: center;">创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-06-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>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</p> </div> <div style="width: 35%;"> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>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)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> </div> <div style="width: 30%;"> <p>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.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>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.</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p> </div> </div>	
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期24.00元 全年864.00元 1401004000050</p> <p style="text-align: center;">www.wjgnet.com</p>	

World Chinese Journal of Digestology

June 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 17

EDITORIAL	1833 Emphasis on prevention and treatment of hepatic fibrosis <i>Chang XM, Jia A</i>
BASIC RESEARCH	1837 Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression and methylation of <i>p16</i> and <i>hMLH-1</i> gene in human gastric cancer cell lines <i>Zhu XJ, Meng CF, Peng G, Dai DQ</i> 1842 Effects of 5-azacytidine on the growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells and reversion of <i>p16</i> hypermethylation <i>Dong K, Qing Y, Yu XJ, Wen EG</i> 1849 Genome-wide gene loss in human pancreatic cancer cells <i>Lin LJ, Wang YF, Zheng CQ, Jin Y, Hu GZ, Liu X, Lin Y</i> 1855 Inhibitory effect of heat shock protein 70 combined with bacillus calmette-guerin on mouse hepatoma HcaF cells <i>Yang Y, Liu Y, Guo RX, Fu QG</i> 1859 Effect of recombinant adenovirus Ad-PD-L1 transfection of donor mouse dendritic cells on the activation of receptor mouse lymphocytes <i>Zhu Y, Li T, Zhu JY, Chen JF, Leng XS</i>
CLINICAL RESEARCH	1866 Phosphoglycerate kinase 1 as a candidate of tumor-associated antigen identified from esophageal squamous cell carcinoma <i>Gao HJ, Zhou LP, Mao YS, Wang W, Qiao YY, Liu F, Cai YR, Zhao XH</i> 1873 Expression and significance of interferon regulatory factor 3 of peripheral blood dendritic cells in HBV-infected patients <i>An BY, Xie Q, Wang H, Jia NN, Shen HC, Cai W, Yu H, Guo Q</i> 1880 Etiology and clinical character of liver cirrhosis: an analysis of 178 cases <i>Meng XD, Xiang GQ, He XH, Wang BY</i> 1885 Expression of deleted in pancreatic carcinoma locus 4 and transforming growth factor- β 1 in human colorectal carcinoma and their clinical significances <i>Zhang DW, Yang WL, Yao Q</i>
REVIEW	1890 Application of painless endoscopy in the diagnosis and treatment of gastrointestinal diseases <i>Xu GS, Wu XL, Liu HN</i> 1897 Participation of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase in regulating signal transduction in hepatic stellate cells <i>He WH, Zhu X</i> 1904 Advances in PTEN and hepatic diseases <i>Hao LS, Zhang XL</i> 1912 Relationship between genetic polymorphism and irritable bowel syndrome pathogenesis <i>Qiu MX, Liu S</i> 1917 Transformation and construction of a new defecation schema for treatment of constipation <i>Chen F, Cai EW, Deng ZM</i>
RAPID COMMUNICATION	1920 <i>In vitro</i> effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma cell line SGC-7901 <i>Chen MX, Chen JL, Lu JL, Hong J, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Geng JG</i>

	<p>1926 Effects of NF-κB p65 antisense oligonucleotide on the expression of cytokines and NF-κB in colonic intestinal mucosa of mice with TNBS-induced colitis <i>Li BM, LV NH, Xie Y, Chen J, Zhu X, Yi J</i></p> <p>1932 Influence of food allergy on gut barrier function and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in food allergic mice <i>Huang H, Zheng PY, Luo Y, Zhang LL</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1938 Management of 217 portal hypertension cases using selective devascularization <i>Xie M, Cao YJ, Pan YM, Xu BY.</i></p> <p>1942 Operational options based on scoring system to treat upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension <i>Chen LB, Yang L, Wang GB</i></p> <p>1946 Endoscopic therapy for gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion: an analysis of 77 cases <i>Cui J, Liu YX, Wu CR, Huang LY</i></p> <p>1951 Clinical analysis and colonoscopic manifestations in 120 patients with ulcerative colitis <i>Shi BB, Huang CF, Zhu Q</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	1954 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Li BM, LV NH, Xie Y, Chen J, Zhu X, Yi J.</i> Effects of NF- κ B p65 antisense oligonucleotide on the expression of cytokines and NF- κ B in colonic intestinal mucosa of mice with TNBS-induced colitis. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2008; 16(17): 1926-1931 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1926.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Hai-Li Guo</i> Editor-in-Charge: <i>Hai-Ning Zhang</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date June 18, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of 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. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

注重对肝纤维化的防治

袁新明, 贾皓

袁新明, 贾皓, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科
陕西省西安市 710061
袁新明, 教授, 主任医师, 主要从事慢性肝病防治研究。
通讯作者: 袁新明, 710061, 陕西省西安市健康路1号, 西安交通
大学医学院第一附属医院消化内科. cxm218@163.com
电话: 029-85323924
收稿日期: 2008-03-26 修回日期: 2008-05-15

Emphasis on prevention and treatment of hepatic fibrosis

Xin-Ming Chang, Ai Jia

Xin-Ming Chang, Ai Jia, Department of Gastroenterology,
the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University
School of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi Province,
China

Correspondence to: Xin-Ming Chang, Department of
Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao-
tong University School of Medicine, 1 Jiankang Road, Xi'
an 710061, Shaanxi Province, China. cxm218@163.com
Received: 2008-03-26 Revised: 2008-05-15

Abstract

Hepatic fibrosis is a common pathological basis of chronic liver disease and liver cirrhosis. HBV infection is highly prevalent in China and there is an increasing trend of liver disease caused by HCV and other factors. However, no specific virus-eradicating drugs have been available for liver diseases caused by HBV and HCV. Cytokine-triggered and HSC-triggered waterfall effect does not cease with removal of the original pathogenic factor. Therefore, we should raise the awareness of prevention and treatment of hepatic fibrosis and gradually develop a set of basic countermeasures against hepatic fibrosis and standardize its implementation. This paper highlighted some misunderstandings in current prevention and treatment of hepatic fibrosis, and pointed out the necessity and urgency of prevention and treatment of liver fibrosis.

Key Words: Liver fibrosis; Prevention and therapy; Cytokines; Hepatic stellate cell

Chang XM, Jia A. Emphasis on prevention and treatment of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1833-1836

摘要

肝纤维化是慢性肝病、肝硬化的共同病理基础。鉴于我国属HBV感染高流行区, HCV及其他病因引致的肝病也渐呈增高趋势, 对HBV、HCV引起的肝病目前尚乏特效的清除病毒措施, 肝病过程中由细胞因子和肝星状细胞(HSC)引发的“瀑布式”效应也不因原始致病因子的清除而停止。因此, 应提高对肝纤维化防治的认识并逐渐探索出一套防治肝纤维化的基本对策并规范实施。本文浅析目前肝纤维防治中的一些误区, 指出防治肝纤维化的必要性及紧迫性。

关键词: 肝纤维化; 防治; 细胞因子; 肝星状细胞

袁新明, 贾皓. 注重对肝纤维化的防治. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1833-1836
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1833.asp>

0 引言

肝纤维化是慢性肝病、肝硬化的病理基础, 也是慢性肝病、肝硬化等进一步恶化的重要原因。在我国, 肝炎病毒性肝损害、特别是乙肝和丙肝病毒的持续感染是造成肝纤维化的主要原因。在当前尚无特效方法根治原发疾病的情况下, 减轻肝纤维化反应便成为十分重要的治疗目标。

1 充分认识肝纤维化防治的必要性

据世界卫生组织报道^[1]全球约20亿人曾感染过HBV, 其中3.5亿人为慢性HBV感染者, 每年约有100万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌。我国属HBV感染高流行区, 每年有50万到100万新发病例, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%。而这些人中相当大一部分为无症状HBV携带者, 对这类肝功正常的HBV携带病例目前尚无特效的清除病毒措施。过去也曾认为此类患者不需治疗。但是, 临床发现, 这类肝功正常的所谓HBV携带者, 若干年后部分患者发展为不可逆的失代偿期肝硬化, 造成严重后果。山东省立医院赵洪涛 *et al*^[2]在1994年就对466例HBV无症状携带者进行过肝活检, 结果显

■背景资料

肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段。早期诊断肝纤维化并寻找有效的治疗方法以阻断和逆转肝纤维化的发生和发展, 对慢性肝病的治疗具有十分重要的意义。

■同行评议者

秦波, 教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科; 张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

■研发前沿

国内外学者对肝纤维化发生的机制及抗肝纤维化治疗做了大量研究,但目前对肝纤维化的防治存在一些误区。

示仅22.1%的病例肝组织显示正常, 37.34%的病例表现非特异性炎症, 40.51%病例为慢性活动性肝炎并有肝纤维化发生。证明了乙肝肝纤维化防治的复杂性和严重性。另据WHO统计, 全球HCV的平均感染率约为3%, 估计有1.7-2.0亿人感染HCV, 每年新发丙型肝炎病例3.5万例^[3]。全国血清流行病学调查资料显示^[4], 我国约3000万人感染HCV, 一般人群抗HCV阳性率为3.2%。HCV感染慢性化机率高、进展快, 可导致肝脏慢性炎症反应、坏死和纤维化, 部分患者发展为肝硬化, 甚至肝癌^[5]。此外, 药物、酒精、慢性感染、淤血、脂肪肝及其他代谢性疾病引致的肝纤维化也渐呈增高趋势。

临床大量病例显示, 有些久治不愈的慢性病毒性肝炎患者进展为肝硬化, 部分不需治疗的所谓“病毒携带者”最终以失代偿期肝硬化的结局就诊, 还有部分患者在体格检查时被诊断为肝硬化或因其他疾病就诊时发现肝功能已处于失代偿阶段。而失代偿期肝硬化的治疗几乎是针对并发症的治疗, 5年生存率仅20%左右。因此, 在肝脏病的早期阶段加强对肝纤维化的防治, 是防止肝硬化发生、预防疾病恶化的关键。

2 肝纤维化形成的机制

肝纤维化的实质是由于胶原和其他细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解失衡。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是ECM最重要的来源^[6]。各种细胞因子参与HSC的激活和调控^[7], 而金属蛋白酶(metalloproteinase, MMP)和金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)对ECM的降解分别起促进和抑制作用^[8]。

当肝脏遭受损伤时, 如毒物、乙醇、免疫等因素造成的理化损伤和免疫损伤, 可诱发单核/巨噬细胞释放多种效应因子, 如转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF β 1)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等细胞因子^[9]。上述细胞因子作用于HSC, 促使HSC活化成为“转化细胞”, 进而转变为“肌成纤维细胞”, 后者被称为活化的HSC, 被活化HSC先在细胞内形成前胶原, 通过细胞微管分泌到细胞外形成胶原分子, 相互交联而成微纤维, 再经缩合而成稳定的胶原纤维。包括I型胶原、II型胶原、III型胶原、IV型胶原、透明

质酸、层黏蛋白等。上述纤维组织在肝内广泛形成即可造成肝纤维化, 进而发生肝硬化。此外, 上述多种细胞因子之间又有相互促进、相互协同的作用。被激活的HSC也可分泌多种细胞因子, 再作用于未被激活的HSC使之活化, 从而形成了细胞因子的网络作用。这种多种细胞因子之间相互促进及对HSC的相互协同作用产生的放大效应, 被称为“瀑布式效应”^[10]。这种效应决定了肝纤维过程一旦启动, 就难以停止, 在临床上表现为病程迁延的慢性过程。

肝纤维化是肝内ECM过度沉积的结果, 但更大程度上是肝病后期胶原的降解减少所致。在细胞外基质降解过程中起主导作用的是MMP和TIMP。MMP家族包括MMP-1、MMP-2和MMP-3。MMP-1以酶原形式在HSC内合成, 作用底物是I、II、III型胶原, MMP-2在HSC、枯否细胞、窦内皮细胞内合成, 作用底物比较广泛, 可作用于蛋白多糖, 也可降解基底膜成分IV型胶原、层黏蛋白和纤维连接蛋白。在肝纤维化早期MMP活性不强或只有轻微增强, 在肝纤维化发展过程中, MMP活性逐渐增强, 至纤维化晚期, 其活性逐渐降低。TIMP家族包括TIMP-1、TIMP-2和TIMP-3, 可与相对应的MMP形成1:1复合物, 从而抑制MMP的活性, 是抑制胶原降解的主要物质^[11]。越近肝纤维化晚期, 其活性越强^[12]。这就决定了晚期肝纤维化的不可逆性。因此, 肝纤维化的防治应该强调早期干预、长期治疗。

3 目前肝纤维化防治的现状和误区

我国处于乙型肝炎高发区, 尽管近年来治疗病毒性肝炎的药物有一定进展, 但目前对乙肝和丙肝的治疗手段仍十分有限。抗病毒药物只能从最大程度上抑制病毒复制, 控制病情发展, 治疗适应症窄, 治愈率仅30%-40%。加之我国大部分地区仍处于经济不发达状态, 医保覆盖面及支撑程度有限, 国民就诊意识不强, 医务人员对肝纤维化防治的知识掌握较少, 使许多原本可以早期防治的肝病逐渐进展为晚期肝硬化, 带来沉重的社会负担和家庭负担, 已成为阻碍社会发展的一大顽疾。

目前对肝纤维化的防治存在以下误区: (1) 抗病毒治疗可替代抗纤维化治疗: 抗病毒治疗可在一定程度上抑制病毒复制, 减轻肝脏损伤和炎症反应, 减少细胞因子的释放, 这是最基本治疗。但是抗病毒治疗的适应症窄, 疗效有限,

■创新盘点

本文较全面的分析总结了当前对肝纤维化认识及治疗中的一些误区, 强调了早期抗肝纤维化的重要性和必要性。

并非杀灭肝炎病毒, 抑制病毒效果也有限, 因而不能完全阻止肝纤维化的形成. 特别对那些无抗病毒适应症及抗病毒疗效不好的患者更是如此; (2)保肝治疗可替代抗肝纤维化治疗: 抗炎药、抗肝损害药物可以减轻肝脏炎症反应, 同时减少纤维化组织的形成, 对防治肝纤维化有积极的作用. 但是, 肝内炎症反应并不一定与肝功损害相平行^[1]. 部分肝病患者只有通过肝脏活组织穿刺才能发现肝脏炎症的存在, 造成临床对活动性肝病判断上的偏差. 此外, 某些肝纤维化可不经炎症期阶段而发生^[13]; (3)有肝硬化指征时再抗肝纤维化治疗: 早期肝纤维化时汇管区结缔组织逐渐向肝小叶内延伸, 小叶内结缔组织增多, 尚未达中央静脉. 此时, 形成的纤维化组织隔比较纤细. 病因消除后, 肝内结构可恢复正常. 当肝硬化出现时, 纤维结缔组织已将肝小叶重新分隔包绕, 形成假小叶. 此时, 肝内纤维间隔粗大, 胶原组织韧性很强、稳定、不溶^[14]. 因此, 当肝硬化出现时肝内纤维组织将不易降解, 已失去最佳治疗时机; (4)动态观察, 不需治疗: 临床上常认为肝功正常的所谓“小三阳”或“大三阳”患者不需治疗. 但实际情况是这些人群中相当一部分若干年后发展为肝硬化. 其原因可能是这部分患者肝功与肝脏病理学表现并不平行, 这部分患者占据了肝硬化患者的相当比例, 给以往的肝病防治理念带来了严峻的挑战.

4 肝纤维化防治的基本策略

肝纤维化是对损伤的修复反应, 肝纤维化是可以预防、可以逆转的. 要立足于早用药、长程用药. 特别是对那些无抗病毒适应征或根本治疗无望的病毒性肝炎患者, 要在积极保肝治疗的同时, 早期长程使用防治肝纤维化药物. 在观念上要树立以下观点: (1)彻底治疗原发病不能完全代替抗纤维化治疗^[13]: 当肝脏炎症反应时, 大量细胞因子释放, HSC通过自分泌和旁分泌产生的放大效应, 不断促使ECM合成、分泌和沉积. 肝纤维化不因原来的致病因子终止而停止发展. 临床上可见某些慢性乙肝、丙肝患者, HBV DNA、HCV RNA已转阴, 但肝纤维化仍在发展中, 某些酒精性肝病患者虽已戒酒, 但肝纤维化和肝硬化仍在继续发展, 证明原始致病因子祛除后肝纤维化仍在继续; (2)抗炎症、抗肝损害药不能完全代替抗肝纤维化治疗: 抗肝损害药物保护肝细胞膜、稳定细胞器、减轻肝脏

炎症反应, 也可以减轻肝纤维化的形成, 但该类药物对非炎症性肝纤维化无效. 所谓抗肝纤维化应该对肝脏ECM的合成、分泌和沉积具有直接抑制作用, 对MMP具有促进分泌作用. 这些都是抗肝损害药物所不能及的; (3)不同程度不同病期的肝纤维化治疗方法应不同: 急性期患者, 若能及时去除原发病因, 肝纤维化多能逆转或终止, 不需抗肝纤维化治疗; 慢性肝病患者除考虑治疗原发病和保肝治疗外, 必须抗肝纤维化治疗; 至肝硬化特别是早期肝硬化时, 需采取综合治疗方法, 特别是对MMP的激活治疗应予重视; 对肝功正常的所谓“病毒携带者”, 应给予长期抗肝纤维化治疗, 有条件者应定期进行肝组织穿刺活检.

抗肝纤维化的治疗旨在减轻肝纤维化程度、逆转纤维化组织. 合理的治疗方案首先是尽可能祛除致病因子, 其次为抑制胶原纤维形成的各个环节, 促进其降解和吸收. 目前比较成熟并经实验证明具有抗肝纤维化的药物有: (1)干扰素: 干扰素 α 的抗病毒作用已被充分肯定, 近年来实验证明干扰素 α 具有抑制HSC活化、诱导激活的HSC凋亡和抑制TGF- β 1生成的作用^[15], 干扰素 γ 也能抑制HSC的活化增殖, 降低 α -肌动蛋白和I、III型胶原及纤维连接蛋白的mRNA水平^[16]. 干扰素具有抗肝炎病毒和抗肝纤维化双重效应; (2)秋水仙碱: 属抗微管药物, 抑制微管蛋白聚合, 从而干扰细胞的胶原分泌. 他还能刺激胶原酶的活性, 促进胶原降解. 国内外多数资料报道其抗肝纤维化作用肯定. 但由于该药物亦系抗肿瘤药物, 能影响蛋白质的合成, 肿瘤组织及正常组织同样可受到干扰, 故毒性较大, 限制了临床应用; (3)青霉胺: 青霉胺含有还原型巯基, 对金属离子有较强的络合作用, 能络合铜、铝、汞等金属, 用于治疗肝豆状核变性及原发性胆汁性肝硬化; (4)螺内酯: 实验研究发现螺内酯能抑制HSC的活化、阻断ECM的合成, 并能降低TGF β 1和PDGF的活性. 动物实验显示有明显的预防肝纤维化的作用^[17-18]. 但用于人类的疗效及剂量尚需进一步探索; (5)其他: 近年来研究发现磷脂酰胆碱能提高MMP水平, 促进胶原降解; 二甲基前列腺素能减轻肝纤维化及脂肪沉积, 抑制巨噬细胞释放炎症因子; 维甲酸类药物能减少I型胶原及其mRNA的合成; 脯氨酸-4-羟化酶抑制剂、脯氨酸类似物、精氨酸及其类似物等均从不同机制起到一定防治肝纤维化作用, 但其疗效尚需进一步证实; (6)中医中

■应用要点

强调抗肝纤维化治疗要立足于早用药、长程用药. 特别是对那些无抗病毒适应征或根本治疗无望的病毒性肝炎患者, 要在积极保肝治疗的同时, 早期长程使用防治肝纤维化药物.

■同行评价

本文论据充足,观点新颖,具有重要的临床和研究指导价值。

药:对肝纤维化的中医治疗多以活血化瘀为主,兼以益气补血、养血柔肝或滋补肝肾。国内研究发现,抗肝纤维化比较有效的单味中药有丹参、黄芪、柴胡、桃仁、当归、冬虫夏草、齐墩果酸等。各种中药复方制剂其临床效果已得到充分证实。中药抗肝纤维化作用靶点广泛,具有抑制炎症反应、减轻肝细胞变性坏死、减少细胞因子分泌、抑制HSC活化和胶原分泌的作用。有些制剂还具有增加胶原酶活性、促进胶原降解的作用^[19-20],临床应用已取得初步效果。

由于对肝纤维化的认识有限,目前临床防治肝纤维化的工作尚未普及,真正用于临床的抗肝纤维化药物仍以中药经典方剂为多,但长期使用的效果已初露端倪。当务之急是提高防治肝纤维化的认识并组织以循证医学为基础的防治肝纤维化大规模临床试验,以期指导临床。

5 参考文献

- 慢性乙型肝炎防治指南. 中华医学会分会, 中华医学会感染病分会. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431
- 赵洪涛, 冯凯, 任万华, 吕晓霞. HBV慢性无症状携带者临床、肝活检、血清标志物的三年随访动态观察. 中华消化病杂志 1994; 14: 80-82
- Desenclos JC. Epidemiology of hepatitis C. *Rev Prat* 2000; 50: 1066-1070
- 戴志澄, 祁国明. 中国病毒性肝炎: 血清流行病学调查(上卷). 北京: 科学技术文献出版社, 1997: 60-71
- Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31: 777-782
- Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
- Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 2007; 45: 25-33
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7413-7420
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL, Spinale FG. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002; 8: 390-398
- Bai K, Guo CJ. The plasma levels of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 and the protein expressions of alpha-SMA and MMP-1 and TIMP-1 in patients with different grades of liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 459-461
- 叶维法, 钟振义. 当代肝脏疾病治疗学. 第1版. 四川: 四川科学技术出版社, 2000: 319-331
- 张盈涛, 裴新明, 李欣, 厉英超, 和水祥. 螺内酯在预防大鼠肝纤维化形成中的作用. 西安交通大学学报(医学版) 2002; 23: 575-578
- 裴新明, 常英, 贾皓, 张盈涛, 厉英超. 干扰素 α 对实验大鼠肝纤维化的治疗作用. 中国现代医学杂志 2003; 13: 12-18
- Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med* 1994; 42: 660-670
- 裴新明, 张盈涛, 贾皓, 常英, 厉英超. 螺内酯防治实验性大鼠肝纤维化作用研究. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 315-316
- 张盈涛, 裴新明, 李欣, 李恒力. 螺内酯对肝纤维化大鼠 I / III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1120-1123
- 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 刘尔瑜. 复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察. 胃肠病学和肝病杂志 1993; 1: 69-72
- 王宝恩. 肝脏病学新进展-基础与临床. 第1版. 北京: 北京出版社, 1996: 147-162

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 2008-06-18)

5-Aza-dC和TSA对胃癌细胞系*p16*和*hMLH-1*基因甲基化水平及表达的影响

朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋

朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科、普通外科教研室、胃肠肿瘤外科 辽宁省沈阳市110001

朱新江, 中国医科大学硕士在读, 主要从事胃肠癌转移的分子学机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572162, No. 30271477

教育部高校博士点基金资助项目, No. 20050159001

作者贡献分布: 朱新江、孟春风及彭过对此文所作贡献均等; 此课题由戴冬秋设计; 研究过程由朱新江、孟春风及彭过操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由戴冬秋及孟春风提供; 数据分析及论文写作由朱新江完成。

通讯作者: 戴冬秋, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科, 辽宁省胃癌分子病理重点实验室, daidq63@163.com

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-04-06

Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression and methylation of *p16* and *hMLH-1* gene in human gastric cancer cell lines

Xin-Jiang Zhu, Chun-Feng Meng, Guo Peng, Dong-Qiu Dai

Xin-Jiang Zhu, Chun-Feng Meng, Guo Peng, Dong-Qiu Dai, Department of Surgical Oncology, Research Unit of General Surgery, Department of Gastrointestinal Oncosurgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572162, No. 30271477; and Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20050159001

Correspondence to: Dr. Dong-Qiu Dai, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Northern Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. daidq63@163.com

Received: 2007-12-21 Revised: 2008-04-06

Abstract

AIM: To investigate effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) and trichostatin A (TSA) on the expression and methylation of *p16* and *hMLH-1* gene in gastric carcinoma cells.

METHODS: Human gastric cancer cell lines MKN-45 and MGC-803 were cultured in vitro in RPMI 1640 and then treated with different concentrations of 5-Aza-dC and TSA. The methylation

of *p16* and of *hMLH-1* gene in the two kind of cell lines was detected using methylation-specific-polymerase chain reaction (MSP), and the expression levels of *p16* and *hMLH-1* gene were detected using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Reexpression or raised expressions of *p16* and *hMLH-1* mRNA was detected in MGC-803 and MKN-45 gastric cancer cell lines after treatment with 5-Aza-dC alone, or in combination with TSA, or with TSA alone. The two cell lines showed a characteristic DNA methylation status in each promoter region of *p16* gene and *hMLH-1* gene. *p16* gene was hypermethylated in MGC-803 and MKN-45; *hMLH-1* gene was hypermethylated in MGC-803, but hemimethylated in MKN-45. The methylation of *p16* and *hMLH-1* gene in MKN-45 and MGC-803 cells was reversed after either 5-Aza-dC treatment or TSA treatment.

CONCLUSION: Aberrant methylation of *p16* and *hMLH-1* gene is a common event in the occurrence and progression of gastric cancer. The methylation of promoter region in CPG island is a main cause for *p16* and *hMLH-1* gene transcriptional inactivation. Significantly raised reexpression of methylated tumor suppressor genes was detected after either treatment with 5-Aza-dC alone or in combination with TSA.

Key Words: Gastric carcinoma; DNA methylation; 5-Aza-2'-deoxycytidine; Trichostatin A; *p16* gene; *hMLH-1* gene

Zhu XJ, Meng CF, Peng G, Dai DQ. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression and methylation of *p16* and *hMLH-1* gene in human gastric cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1837-1841

摘要

目的: 探讨5-Aza-dC及TSA对胃癌细胞系中抑癌基因*p16*和*hMLH-1*基因甲基化水平和基因表达的影响。

■背景资料

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤,在我国死亡率居恶性肿瘤的首位,约50%的胃癌患者确诊时已属晚期,癌细胞的转移是影响疗效的主要因素。国内外大量的资料显示,胃癌的发生与其他恶性肿瘤一样是多基因、多阶段变异累积形成的病理过程。近来,在肿瘤学研究发现启动子区高甲基化异常是导致许多肿瘤抑制基因表达异常的内在机制,癌基因的激活和抑癌基因的失活为其中两个重要的分子事件。目前,普遍认为DNA甲基化除缺失与突变之外导致基因失活的第三种机制,在肿瘤的发生发展起着不可忽视的作用。由于高甲基化而不表达的抑癌基因,如果能应用去甲基化制剂逆转甲基化异常状态,使之重新表达,理论上即可发挥起抑制肿瘤生长的功能。

■同行评议者

熊斌,教授,武汉大学中南医院肿瘤科

■ 研究前沿

肿瘤的发生常涉及多个抑癌基因的失活, 针对单一基因的治疗不足以抑制肿瘤生长, 去乙酰化酶或甲基化抑制剂对于整个基因组而不是特定的基因, 可同时恢复多个抑癌基因的表达, 并降低基因突变的发生率, 提高基因组稳定性, 可成为药物开发提供新的靶点, 将表遗传学药物与基因药物联用将为肿瘤治疗的治疗开辟新的领域。

方法: 5-Aza-dC及TSA处理体外培养的MKN-45细胞和MGC-803细胞, 应用逆转录PCR(RT-PCR)法及甲基化特异性PCR(MSP)法分别检测两株细胞药物干预前后抑癌基因*p16*和*hMLH-1*的表达及甲基化情况。

结果: MKN-45和MGC-803细胞系经TSA, 5-Aza-dC及联合作用后使原来不表达或有弱表达的抑癌基因*p16*和*hMLH-1*重新表达或表达增强。胃癌细胞系MKN-45和MGC-803均显示*p16*、*hMLH-1*基因启动子区存在高甲基化, 其中*p16*基因在两种胃癌细胞系中均表现为甲基化, *hMLH-1*基因在胃癌细胞系MGC-803中表现为甲基化而在胃癌细胞系MKN-45中表现为半甲基化。在5-Aza-dC及TSA的作用下, MKN-45和MGC-803细胞系中*p16*及*hMLH-1*基因的甲基化状态得到逆转。

结论: 胃癌细胞系中抑癌基因*p16*和*hMLH-1*基因启动子甲基化可能是导致其基因失活的主要原因, 5-Aza-dC单独作用和5-Aza-dC及TSA联合应用效果相似, 均能显著增强甲基化的肿瘤抑制基因的重新表达。

关键词: 胃癌; DNA甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; Trichostatin A; *p16*基因; *hMLH-1*基因

朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋. 5-Aza-dC和TSA对胃癌细胞系*p16*和*hMLH-1*基因甲基化水平及表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1837-1841

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1837.asp>

0 引言

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 国内外大量资料显示, 胃癌的发生与其他恶性肿瘤一样是多基因多阶段变异累积形成的病理过程^[1-5]。抑癌基因启动子内CpG岛出现异常甲基化常导致其表达丧失或减少, 从而诱导肿瘤发生。*p16*及*hMLH-1*是已经确认的抑癌基因, 在细胞凋亡过程中起着重要作用^[6-9]。我们通过此二基因在MKN-45细胞系及MGC-803细胞系中药物干预前后的表达以及甲基化的状态探讨该抑癌基因的表达与其甲基化状态的相关性, 并分析肿瘤细胞的生物学行为改变, 以探讨胃癌的发生机制并寻求新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 MKN-45细胞系、MGC-803细胞系来自中国医科大学细胞生物教研室, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)及Trichostatin A(TSA)

为Sigma产品, 总RNA抽提试剂TRIzol购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自Promega公司, RPMI 1640培养基为Hyclone产品, Taq酶及dNTP均为TaKaRa产品, Wizard DNA Clean-up(Promega公司)。

1.2 方法 细胞接种于含10 mL/L小牛血清(56°C灭活30 min)、100×10³ U/L青霉素及100×10³ U/L链霉素的pH7.2的RPMI 1640培养液中, 在37°C、含50 mL/L CO₂的湿润空气的恒温密闭式培养箱中培养。实验时细胞处于对数生长期, 活细胞数达95%-100%。对照组为同期培养不加药的胃癌细胞; 实验组: (1)5-Aza-dC组: 加5 μmol/L 5-Aza-dC培养72 h; (2)TSA组: 加TSA 300 nmol/L培养24 h; (3)联合组: 加5 μmol/L 5-Aza-dC培养48 h后加TSA 300 nmol/L继续培养24 h。

1.2.1 RT-PCR分析*p16*及*hMLH-1*基因MRNA的表达: 用TRIzol试剂提取各组MKN-45细胞及MGC-803细胞总RNA, 用逆转录酶和Oligo(dT)20引物合成cDNA。*p16*及*hMLH-1*基因引物由上海博亚生物公司合成(表1), 以GAPDH为内参。PCR反应条件: 94°C 3 min预变性后开始35个循环: 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 45 s, 最后于72°C延伸10 min。扩增完毕在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳分离, EB染色, 使用凝胶成像分析系统检测积分吸光度值, 将各基因与GAPDH吸光度比值作为其mRNA水平的相对值。每种细胞每个基因至少重复实验3次, mRNA表达水平取其平均值进行统计分析。

1.2.2 甲基化特异性PCR(MSP)分析*p16*及*hMLH-1*基因甲基化: 蛋白酶K-苯酚抽取法从细胞中抽取总DNA, 紫外分光光度计检测DNA量和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性。稀释2 μg DNA于50 μL水中, 加入NaOH, 42°C变性30 min后, 加入新鲜配置的亚硫酸氢钠和氢醌及石蜡油覆盖均匀, 55°C水浴16 h。用DNA纯化试剂盒纯化(按说明书步骤)后将DNA重悬于50 μL水中, 再加入NaOH, 37°C水浴15 min, 然后用NaAc、无水乙醇沉淀回收DNA, 干燥, 并重悬于50 μL水中, -20°C用箔包裹保存。采用甲基化特异性PCR扩增的方法, PCR反应条件(以*p16*为例): 94°C 5 min预变性后开始35个循环: 95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 60 s, 最后于72°C延伸10 min。扩增完毕在20 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, EB染色, 使用凝胶成像分析系统分析电泳结果。*p16*及*hMLH-1*基因甲基化及非甲基化引物序列及产物大小(表2)。

■ 创新盘点

胃癌相关抑制基因启动子CPG岛DNA甲基化与肿瘤抑癌基因沉默关系的研究, 揭示了胃癌相关抑癌基因失活的表遗传学机制, 此为国际生物学研究的热点之一。体外研究5-Aza-dC及TSA调控和恢复沉默的胃癌相关抑制基因表达的情况, 为恶性肿瘤的防治提供新的靶点, 为两药物的胃癌的临床应用提供实验依据。

表 1 *p16*及*hMLH-1*基因RT-PCR引物序列

基因	正向引物顺序(5'-3')	反向引物顺序(5'-3')	产物大小(bp)	退火温度(°C)	循环次数
<i>p16</i>	CAACGCACCGAATAGTTACGG	GCGCAGTTGGGCTCCG	105	55	38
<i>hMLH-1</i>	AGTGGCTGGACAGAGGAAGA	GATCAGGCAGGTTAGCAAGC	463	55	38
GAPDH	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA	GCCAGTAGAGCAGGGATGATG	251	55	38

表 2 *p16*及*hMLH-1*基因甲基化及非甲基化引物序列

基因	正向引物顺序(5'-3')	反向引物顺序(5'-3')	产物大小(bp)	退火温度(°C)	循环次数
<i>p16</i>	M TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCAGCGACCGTAA	150	60	35
	U TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	60	35
<i>hMLH-1</i>	M GATAGCGATTTTTAACGC	TCTATAAATTACTAAATCTCTTCG	74	52	35
	U AGAGTGGATAGTGATTTTTAATGT	ACTCTATAAATTACTAAATCTCTTCA	115	52	35

■应用要点

检测特定基因甲基化状态可为胃癌早期筛查、发现残余病灶、判断是否转移及预后提供帮助。目前, 去甲基化诊断治疗成为全世界肿瘤研究的热点, 为攻克肿瘤这一顽疾提供新的思路。但迄今为止, 用于胃癌甲基化标记物的基因还很少, 某些机制尚未明确, 仍需进一步研究。

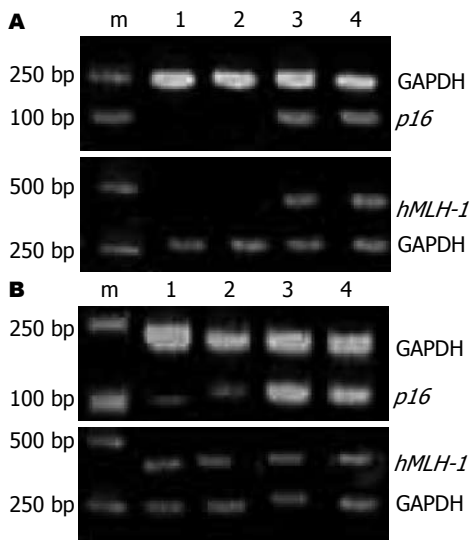


图 1 胃癌细胞系5-Aza-dC和TSA处理前后*p16*、*hMLH-1*基因mRNA表达。A: MGC-803; B: MKN-45。m: marker DL2000; 1: 对照组; 2: TSA组; 3: 5-Aza-dC组; 4: 联合组。

2 结果

2.1 RT-PCR结果 *p16*基因在MGC-803细胞中无表达, 经TSA作用后无表达, 5-Aza-dC及联合作用后有较强表达(相对值为0.413, 0.546); 在MKN-45细胞中有很弱表达(相对值0.16), 经TSA, 5-Aza-dC及联合作用后有不同程度表达(相对值为0.174, 0.876, 0.858)。

*hMLH-1*基因在MGC-803中无表达, 经TSA作用后仍无表达, 5-Aza-dC及联合作用后有较强表达(相对值为0.89, 0.91); 在MKN-45细胞中有很弱表达(相对值1.21), 经TSA, 5-Aza-dC及联合作用后有不同程度表达(相对值为1.1, 1.22, 1.23)。

总之, *p16*基因及*hMLH-1*基因在MGC-803中不表达, 而在MKN-45细胞中弱表达。5-Aza-

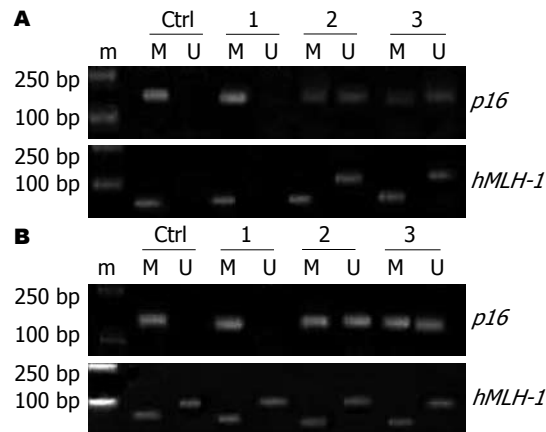


图 2 胃癌细胞系5-Aza-dC和TSA处理前后的*p16*、*hMLH-1*基因启动子甲基化表达。A: MGC-803; B: MKN-45。m: marker DL2000; Ctrl: 对照组; 1: TSA组; 2: 5-Aza-dC组; 3: 联合组。

dC能使MGC-803和MKN-45细胞中沉默的*p16*基因的重新表达, TSA对基因表达无明显影响, 5-Aza-dC及TSA联合应用与5-Aza-dC单独效果相似。对于*hMLH-1*基因在MGC-803细胞中TSA对基因表达无影响, 5-Aza-dC及联合作用后能使其重新表达。但是, 在MKN-45细胞中TSA、5-Aza-dC及联合作用均对*hMLH-1*基因的表达无影响(图1)。

2.2 胃癌细胞系经5-Aza-dC和TSA处理前后的*p16*、*hMLH-1*基因启动子甲基化分析 以研究对象基因组DNA模板, 经MSP扩增后, 无甲基化条带而出现非甲基化条带, 判定为非甲基化; 无非甲基化条带而出现甲基化条带, 判定为甲基化; 甲基化条带和非甲基化条带同时出现, 判定为半甲基化(图2)。(1)在MGC-803和MKN-45细胞中, *p16*基因启动子区CpG岛表现为甲基化,

■名词解释

1 DNA甲基化: 指在DNA甲基转移酶(Dnmt)的作用下,以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)二核苷酸的胞嘧啶中5位碳原子上并与其3'端的鸟嘌呤形成mCpG,且在双链对称出现.癌基因多为不充分甲基化,导致重新开放或异常表达;抑癌基因多为过度甲基化,从而表达受抑制.

2 组蛋白乙酰化: 是可逆的动态过程,组蛋白乙酰基转移酶(HAT)将乙酰辅酶A(乙酰CoA)乙酰基部分转移到核心组蛋白氨基末端上特定Lys残基的-氨基基团.氨基上的正电荷被消除,这时DNA分子本身所带有的负电荷有利于DNA构象的展开,核小体的结构变得松散.这种松散的结构促进了转录因子和协同转录因子与DNA分子的接触,因此组蛋白乙酰化可以激活特定基因的转录过程.

在MGC-803和MKN-45细胞中,应用5-Aza-dC能使*hMLH-1*基因启动子区CpG岛发生去甲基化.联合给予5-Aza-dC及TSA的作用和单独给予5-Aza-dC相似,而TSA不影响*p16*基因DNA甲基化.(2)在MGC-803细胞中,*hMLH-1*基因启动子区CpG岛表现为甲基化(仅出现甲基化条带),在MKN-45细胞中表现为半甲基化(同时出现甲基化和非甲基化条带).在MGC-803细胞中,应用5-Aza-dC能使*hMLH-1*基因启动子区CpG岛发生半甲基化(出现甲基化及非甲基化条带).在MKN-45中,药物对DNA甲基化无影响.

3 讨论

近几年,表遗传学改变的研究取得了长足进展,成为胃肠癌临床基础研究的一个热点领域.表遗传学是研究非DNA序列变化引起的,可遗传的基因表达的改变.表遗传学的研究对象不是基因组核苷酸序列所携带的遗传信息,而是研究基因表达在时间和空间上的调控问题,包括DNA甲基化、组蛋白修饰、基因组印迹、染色体重塑、基因表达重新编程及X染色体失活等,其中最主要的两个研究内容是DNA甲基化和组蛋白乙酰化^[10].

DNA甲基化修饰是脊椎动物唯一的DNA自然修饰方式,DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的作用下,以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)二核苷酸的胞嘧啶中5位碳原子上并与其3'端的鸟嘌呤形成mCpG,且在双链对称出现.癌基因多为不充分甲基化,导致重新开放或异常表达;抑癌基因多为过度甲基化,从而表达受抑制^[11].

组蛋白乙酰化及其逆过程,分别由组蛋白乙酰基转移酶(HAT)及去乙酰化转移酶(HDAC)催化的,HAT可将乙酰辅酶A的乙酰基部分转移到核心组蛋白氨基末端特定的赖氨酸残基,中和其正电荷,使核小体DNA易于接近转录因子.许多研究已证实了组蛋白高/低乙酰化在肿瘤发生中起重要作用:组蛋白的乙酰化促进基因转录,而去乙酰化抑制基因转录^[12].

本实验证实胃癌细胞株MGC-803及MKN-45中导致*p16*基因和*hMLH-1*基因沉默得主要原因为DNA甲基化,应用5-Aza-dC作用于MSP方法证实*p16*,*hMLH-1*基因存在甲基化的MGC-803细胞和MKN-45细胞,发现该药物能成功逆转两基因启动子得甲基化状态,使该基因

得以重新表达,TSA组效果较差,联合用药组得效果与5-Aza-dC效果相似.

本实验应用的干预药物5-Aza-dC是一种嘧啶类药物,应用与治疗复发性,顽固性白血病和慢性髓性白血病危象有明显疗效,但在实体瘤中作用尚不清楚.制滴毒素A(TSA)是一种非特异性HDAC抑制剂,Suzuki *et al*^[13]应用TSA(500 μg/L)加入到八个胃癌细胞系中,发现TSA可以明显抑制全部胃癌细胞系的生长,并且可以诱导胃癌细胞的凋亡.Cameron *et al*^[14]在结肠癌细胞系的研究中显示:对*p16*,*TIMP-3*,*p15*和*hMLH-1*基因启动子过度甲基化的结肠癌细胞,单用HDAC抑制剂无法使失活的基因重新表达,但如果先用小剂量的DNA甲基化抑制剂处理使基因获得轻度的重新表达,再用HDAC抑制剂处理后,则可使结肠癌细胞基因重新表达显著增强,提示组蛋白的脱乙酰化和DNA的高甲基化共存于基因失活的过程之中.Shaker *et al*^[15]将HDAC的抑制剂与5-Aza-dC连用,降低剂量来减少5-Aza-dC的毒副作用,并达到协同增效作用.但DNA的高甲基化在导致这些基因失活中可能扮演主导作用.

总之,肿瘤发病机制不仅体现在基因突变或缺失而导致的遗传学改变,还体现在以DNA甲基化为代表的表遗传学改变,深入研究DNA甲基化与基因表达的关系及作用机制为胃癌的早期诊断及去甲基化治疗提供了新的思路.

4 参考文献

- 1 Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4628-4635
- 2 Nakajima T, Maekita T, Oda I, Gotoda T, Yamamoto S, Umemura S, Ichinose M, Sugimura T, Ushijima T, Saito D. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2317-2321
- 3 Li M, Liu W, Zhu YF, Chen YL, Zhang BZ, Wang R. Correlation of COX-2 and K-ras expression to clinical outcome in gastric cancer. *Acta Oncol* 2006; 45: 1115-1119
- 4 Tang LP, Cho CH, Hui WM, Huang C, Chu KM, Xia HH, Lam SK, Rashid A, Wong BC, Chan AO. An inverse correlation between Interleukin-6 and select gene promoter methylation in patients with gastric cancer. *Digestion* 2006; 74: 85-90
- 5 Ma B, Zhao JS, Ding DY. Application of proteomics in the research of discrepancy proteins in gastric cancer. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2006; 9: 534-537
- 6 关志宇,戴冬秋.胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14:

- 138-143
- 7 Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung SC, Sung JJ, To KF. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1761-1766
- 8 Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 236-240
- 9 Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 206-215
- 10 朱新江, 戴冬秋. 表遗传学与胃肠道肿瘤. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3251-3256
- 11 滕玥, 戴冬秋. 胃癌表遗传学的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1814-1818
- 12 Linggi BE, Brandt SJ, Sun ZW, Hiebert SW. Translating the histone code into leukemia. *J Cell Biochem* 2005; 96: 938-950
- 13 Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2000; 88: 992-997
- 14 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 103-107
- 15 Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler RL. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res* 2003; 27: 437-444

■同行评价

本研究设计合理, 研究方法可靠, 结果和结论可信, 有一定的学术价值和临床应用价值。

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 •

中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2008-10-09/12在西安市召开第八次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. 根据以下分类请在论文摘要右下角标明: 功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); 幽门螺杆菌及其相关疾病; 胰腺疾病; 肝胆疾病; 胃肠道肿瘤; 炎症性肠病; 胃肠激素; 消化疾病介入治疗; 青年委员会专场(全部用英文交流).

2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1963-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理. (3)报送的论文要求电脑打印稿, 经所在单位审查盖章, 通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议将不再接受书面投稿. (4)截稿日期: 2008-07-15(以当地邮戳为准), 文责自负. 会议网址: <http://www.csgd.org.cn>.

希望各省、自治区、直辖市医学会消化病学分会委员积极、认真组织所在地区的相关医生踊跃投稿并参会.

5-氮杂胞苷抑制肝癌细胞恶性表型和逆转甲基化状态的作用及机制

董科, 李波, 覃扬, 俞小炯, 温尔刚

■背景资料

肝癌的发生发展是一个涉及到多基因改变的多阶段复杂过程, 肝癌形成后表现出大量的遗传学和表遗传学改变。表遗传修饰主要包括DNA甲基化/去甲基化和组蛋白乙酰化/去乙酰化, 在肿瘤发生发展中起着重要作用。DNA甲基化是肝癌中*p16*基因失活的主要机制。肿瘤相关基因的异常甲基化在癌形成中起着持续的、可逆的潜在作用, 这种异常甲基化可以通过临床的治疗来逆转, 使其恢复正常状况。因此, 抑癌基因的去甲基化成为临床治疗肿瘤的一个新的途径, 5-氮杂胞苷是研究DNA甲基化在细胞分化和基因活化中所起作用的一个重要工具。

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科; 杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染病科

董科, 俞小炯, 温尔刚, 四川省医学科学院; 四川省人民医院普外二科 四川省成都市 610072

李波, 四川大学华西医院普外二科 四川省成都市 610000
覃扬, 四川大学基础与法医学院分子生物学实验室 四川省成都市 610000

董科, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础和临床研究。

作者贡献分布: 此课题由董科设计; 李波指导; 研究过程由董科, 覃扬, 俞小炯及温尔刚操作完成; 本论文写作由董科完成。

通讯作者: 温尔刚, 610072, 四川省成都市, 四川省医学科学院; 四川省人民医院普外二科. dongke1134@hotmail.com

电话: 028-89820780

收稿日期: 2007-11-04 修回日期: 2008-05-07

Effects of 5-azacytidine on the growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells and reversion of *p16* hypermethylation

Ke Dong, Bo Li, Yang Qing, Xiao-Jiong Yu, Er-Gang Wen

Ke Dong, Xiao-Jiong Yu, Er-Gang Wen, Department of Hepatobiliary Surgery, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Bo Li, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Yang Qing, Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Er-Gang Wen, Department of General Surgery, Sichuan Provincial Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. dongke1134@hotmail.com

Received: 2007-11-04 Revised: 2008-05-07

Abstract

AIM: To investigate correlation between DNA methylation alteration and hepatocellular carcinoma as well as to explore mechanisms of 5-aza-CR inhibiting hepatoma cell lines and reversed methylation.

METHODS: Human hepatoma cell lines, HuH-7, and the murine xenograft model were treated with 5-aza-CR. Cell morphology changes were determined under phase contrast microscopy, cell growth speed was measured using MTT assay,

cell cycle distribution and apoptosis rate were estimated using flow cytometry, methylation status of *p16* was determined using methylation-specific PCR and mRNA expression of *p16* was determined using RT-PCR.

RESULTS: After treatment with 5-aza-CR, significant inhibiting effects were detected both in hepatoma cell lines HuH-7 and the murine xenograft model cells. In the treatment group, G_1 of HuH-7 increased by $41.1\% \pm 3.2\%$, S and $G_2 + M$ decreased by $39.0\% \pm 1.4\%$ and $2.2\% \pm 0.7\%$, respectively, and apoptosis rate increased by $30.0\% \pm 4.5\%$. In the murine xenograft model group, G_1 increased by $27.4\% \pm 3.1\%$, S and $G_2 + M$ decreased by $25.8\% \pm 2.1\%$ and $1.6\% \pm 1.8\%$, respectively, and apoptosis rate increased by $2.9\% \pm 0.6\%$. Only methylating PCR product appeared before treatment with drugs, Conversely while only demethylating PCR amplification product was detected after drug treatment. For the murine xenograft model group, methylated PCR product was detected in the control group, however, methylated and demethylated PCR amplification products were observed in the experimental group. Both cell and xenografted nude mice presented the expression of *p16* mRNA in experimental group. No expression of *p16* mRNA was detected in the control group.

CONCLUSION: 5-aza-CR inhibits tumor cell growth, decreases cell cycle and increases mRNA expression of *p16* in hepatoma cell lines both *in vitro* and *in vivo*. 5-aza-CR inhibits the malignant phenotypes of human hepatocellular carcinoma cells and reverses hypermethylation of *p16*.

Key Words: 5-aza-CR; Hepatocellular carcinoma; *p16* gene; Methylation-specific PCR; Xenograft

Dong K, Qing Y, Yu XJ, Wen EG. Effects of 5-azacytidine on the growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells and reversion of *p16* hypermethylation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1842-1848

摘要

目的: 探讨DNA异常甲基化与肝细胞肝癌间的作用及机制

相关性及5-氮杂胞苷(5-aza-CR)抑制肝癌细胞恶性表型和逆转甲基化状态的作用及其机制。

方法: 用5-aza-CR处理肝癌细胞株HuH-7和裸鼠移植瘤模型, 然后用相差显微镜观察药物处理前后细胞形态变化, MTT法观察细胞生长速度变化, 流式细胞仪检测细胞周期、细胞凋亡率, 甲基化特异性PCR(MSP)检测*p16*基因5'CpG岛甲基化状态, RT-PCR法检测*p16* mRNA的表达情况。

结果: 5-aza-CR对肿瘤细胞HuH-7和裸鼠移植瘤细胞均有明显的抑制作用; 实验组HuH-7细胞周期G₀/G₁期延长41.1%±3.2%, S期缩短39.0%±1.4%, G₂期缩短2.2%±0.7%, 凋亡细胞增加30.0%±4.5%; 裸鼠移植瘤细胞周期G₀/G₁期延长27.4%±3.1%, S期缩短25.8%±2.1%, G₂期缩短1.6%±1.8%, 凋亡细胞增加2.9%±0.6%; 对照组HuH-7与裸鼠细胞仅甲基化引物扩增出特异PCR条带, 实验组HuH-7细胞仅非甲基化引物扩增出特异PCR条带, 而实验组裸鼠细胞甲基化和非甲基化引物均扩增出特异PCR条带; 实验组肿瘤细胞HuH-7和裸鼠移植瘤细胞的*p16* mRNA均有表达, 而对照组则无表达。

结论: 5-aza-CR在体外和体内均有抑制肝癌细胞生长、阻滞细胞周期G₁/S和促进*p16* mRNA表达的作用; 5-aza-CR可抑制肝癌细胞恶性表型和逆转*p16*甲基化状态。

关键词: 5-氮杂胞苷; 肝癌; *p16*基因; 甲基化特异性PCR; 移植瘤

董科, 李波, 覃扬, 俞小炯, 温尔刚. 5-氮杂胞苷抑制肝癌细胞恶性表型和逆转甲基化状态的作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1842-1848
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1842.asp

0 引言

肝癌是危害人类健康的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率均很高, 肝癌的发生发展是一个涉及到多基因改变多阶段的复杂过程, 肝癌形成后表现出大量的遗传学改变和表遗传学改变(epigenetic alterations), 表遗传学改变是基因表达的主要修饰方式之一, 在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[1-2]. 如DNA损伤修复、细胞周期调控、血管生成及细胞凋亡等都与其调控区的CpG岛甲基化有密切关系. 肿瘤相关基因的异常甲基化在癌形成中起着持续可逆的潜在作用, 这种情况与基因缺失或畸变不同, 这种异常

甲基化可以通过临床的治疗来逆转, 使其恢复正常状况^[3-4]. 许多研究证明HCC中, CpG岛甲基化发生率较高, 而缺失、突变却相对少见, 可见DNA甲基化是肝癌中*p16*基因失活的主要机制. 于是, 我们用5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza-CR)处理HuH-7肝癌细胞株(已证实为*p16*基因CpG岛甲基化)和裸鼠HuH-7细胞移植瘤^[5-6], 在体外和体内观察其恶性生物学行为与甲基化状态的变化, 分析其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系HuH-7细胞购于武汉大学保藏中心细胞库裸鼠, 雌雄不分, 4-6 wk龄, 体质量15-20 g, 购于四川大学华西实验动物中心; 所选用的甲基化、非甲基化特异引物序列和*p16* RT-PCR引物根据基因序列并参照国外文献设计^[7], 内参照β2微球蛋白(β2-MG)引物(表1), 引物均委托上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 体外实验: (1)选用HuH-7细胞株, 取对数生长期细胞调节细胞浓度为 5×10^7 个/L, 进行MTT实验, 试验组加入不同浓度的5-aza-CR, 使其终浓度分别为1、2、4、8、10 μmol/L, 绘制HuH-7细胞生长曲线. (2)取处于对数生长期的HuH-7细胞, 调细胞浓度到 5×10^8 个/L, 加入5-aza-CR, 药物终浓度为5 μmol/L, 对照组不加药. 培养5 d, 送FCM检测, 分析细胞周期和凋亡峰. (3)未经药物处理(对照组)和经5 μmol/L 5-aza-CR处理(实验组)5 d后的HuH-7细胞基因组DNA进行甲基化特异性PCR(MSP)扩增^[7], 反应体系中(25 μL): 双蒸水11 μL, 10×PCR Reaction Buffer 2.5 μL, dNTP 2.5 μL, 上、下游引物各1 μL(20 mmol/L), DNA 5 μL, Taq聚合酶2 U(2 U/2 μL). 反应条件为: 95℃变性5 min, 95℃变性45 s, 65℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 循环扩增35次. (4)逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR): 经β2-MG PCR扩增后的cDNA再进行*p16*基因PCR扩增. 反应体积为30 μL, 其中10×PCR Buffer 3 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 25 mmol/L dNTPmix 3.6 μL, 20 μmol/L Sense 0.75 μL, 20 μmol/L Antisense 0.75 μL, Taq多聚酶(5 U/1 μL)1 U(0.2 μL), 稀释RT产物: cDNA 1.2 μL. 反应条件为: 预变性94℃, 5 min; 变性94℃ 30 s, 退火58.5℃ 30 s, 72℃延伸1 min, 进行35个循环; 后延伸72℃冷延伸10℃。

1.2.2 体内实验: (1)裸鼠人肝癌模型的制作: 将对数期生长HuH-7细胞调整浓度为 $5 \times 10^6/0.2$

■ 研究前沿

有研究者用5-脱氧氮杂胞苷处理肝癌细胞株, 细胞生长受到抑制, 进一步研究发现其甲基转移酶mRNA表达降低、*p16* mRNA、蛋白表达均增高, 并使肝癌细胞阻滞于G₁期, 但未对用药前后肿瘤细胞的甲基化状态作进一步的研究, 也未进行相关的体内实验研究。

■创新盘点

本课题前期研究阐明启动子区异常甲基化是HCC中*p16*基因失活的重要原因,与HCC有明确的相关性.该论文通过体外和体内实验,来进一步研究*p16*基因去甲基化,对肿瘤细胞凋亡、细胞周期、*p16* mRNA、P16蛋白和*p16*基因的甲基化状态的影响.目前采用动物模型来作这方面的对比研究还少见报道.

表 1 *p16*基因引物序列和片段大小

		引物序列	片段大小(bp)
<i>p16</i>	Sense	5'-ATGGAGCCTTCGGCTGACTG-3'	404
	Antisense	5'-CGGGCATGGTTACTGCTCTG-3'	
$\beta 2$ -M	Sense	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTCTGG-3'	335
	Antisense	5'-GCTTACATGTCTCGATCCCACTTAA-3'	
<i>p16M</i>	Sense	5'-TTATAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	150
	Antisense	5'-GACCCCGAACC GCGACCGTAA-3'	
<i>p16U</i>	Sense	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	151
	Antisense	5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'	

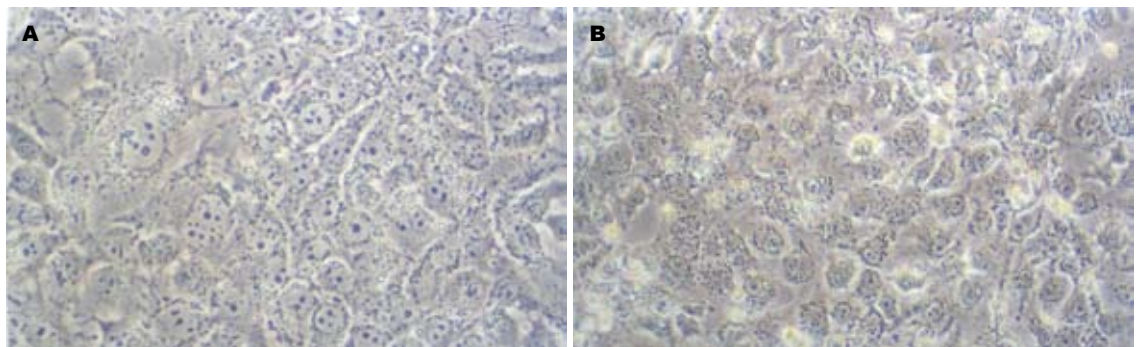


图 1 细胞形态光镜观察图. A: 对照组; B: 实验组.

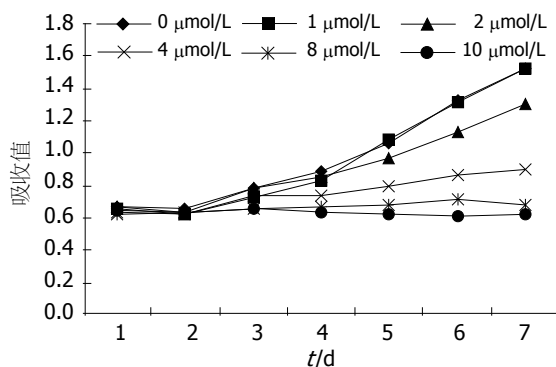


图 2 HuH-7细胞在5-aza-CR作用下的生长曲线.

mL细胞悬液,接种于裸小鼠右侧腋下.共接种14只裸鼠,实验组和对照组各7只,实验组:接种裸小鼠1 wk后,经腹腔内注入5-aza-CR 1.5 $\mu\text{g/g}$,每天一次,连续3 d;对照组:腹腔内只给等体积生理盐水,每天一次,连续3 d.5 wk后处死裸小鼠,并计算两组瘤体体积大小和抑瘤率,抑瘤率(%) = (1-实验组平均瘤体体积/对照组平均瘤体体积) $\times 100\%$, $P < 0.05$ 有意义.标本送检测.(2)实验组和对照组移植瘤组织细胞DNA *p16*基因甲基化状态的检测:取移植肿瘤组织并提取DNA,提取的两组裸鼠移植瘤DNA按体外实验部分的方法检测*p16*基因甲基化状态,反应体系和反应条件亦同体外实验部分.(3)裸鼠组织细胞RNA的

提取和RT-PCR:裸鼠肝癌移植瘤组织用TRIzol Reagent提取RNA,以后按体外实验部分进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR).

统计学处理 对计量资料及计数资料分别进行 t 检验和方差分析.

2 结果

2.1 药物处理前后细胞形态改变 光镜见:对照组细胞呈多角形、核大、细胞数量和增殖速度明显快于实验组;实验组细胞大小趋于均匀,形态趋于规则,核浆比例降低,增值分裂减慢,部分细胞有凋亡和坏死(图1).

2.2. 5-aza-CR对HuH-7细胞的生长抑制作用 对照组细胞生长曲线呈快速上升趋势,实验组当药浓度上升至4 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,细胞生长速度较对照组明显缓慢(图2).

2.3 HuH-7细胞经药物处理前后的细胞周期和凋亡值 HuH-7细胞经5-aza-CR处理前后细胞周期和凋亡率有明显改变:5-aza-CR对肿瘤细胞HuH-7有明显的抑制作用,实验组细胞的细胞周期发生了明显改变, G_0/G_1 期延长了41.1% \pm 3.2%, S期缩短了39.0% \pm 1.4%, G_2 期缩短了2.2% \pm 0.7%,凋亡细胞增加了30.0% \pm 4.5%(图3-4).

2.4 5-aza-CR对HuH-7细胞*p16*甲基化状态的影

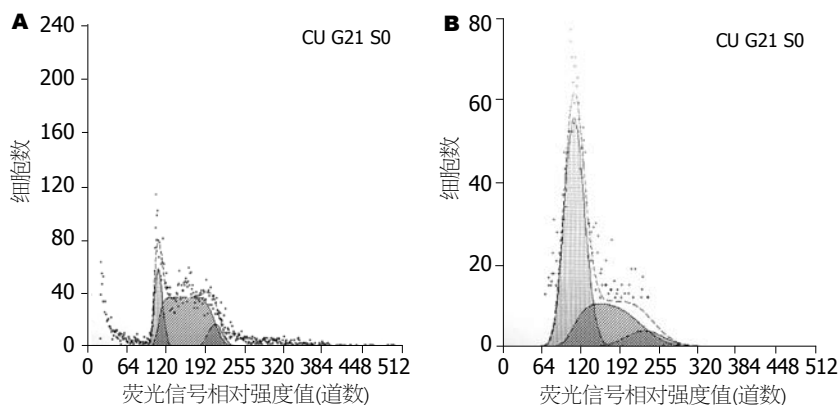


图 3 流式细胞术检测 HuH-7 细胞用药前后细胞周期. A: 用药前; B: 用药后. A 中 3 个峰: 为 G₁、S、G₂ 期, 所占百分比: 19.6%、70.1%、10.3%. B 中 3 个峰: 为 G₁、S、G₂ 期, 所占百分比依次是 60.7%、31.2%、8.1%.

应用要点
通过 5-aza-CR 对肝癌细胞在体外和体内作用的研究, 检测细胞增殖、细胞周期、凋亡、p16 甲基化状态改变、P16 蛋白和 p16 mRNA 表达变化. 探讨 DNA 甲基化异常与肝细胞肝癌间的相关性及 5-aza-CR 抑制肝癌细胞恶性表型和逆转甲基化状态的作用及其机制, 对肝癌的发病机制探讨、基因和药物治疗均有一定的指导意义.

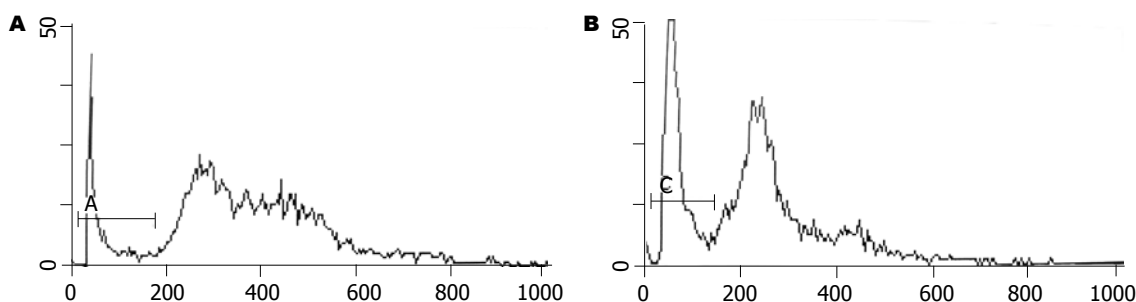


图 4 流式细胞术测 HuH-7 细胞用药前后细胞凋亡峰值. A: 用药前; B: 用药后. 对照组图中所示凋亡峰值为(A): 14%; 实验组图中所示凋亡峰值为(C): 44.9%.

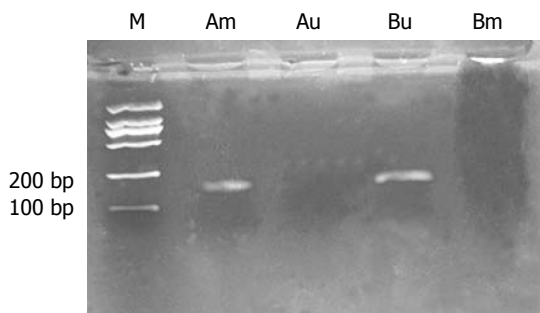


图 5 p16 基因甲基化特异性 PCR 产物电泳图. M: 分子质量 Marker; A: 未经药处理的 HuH-7 细胞 DNA; B: 经药处理的 HuH-7 细胞 DNA; m: 甲基化引物; u: 非甲基化引物.

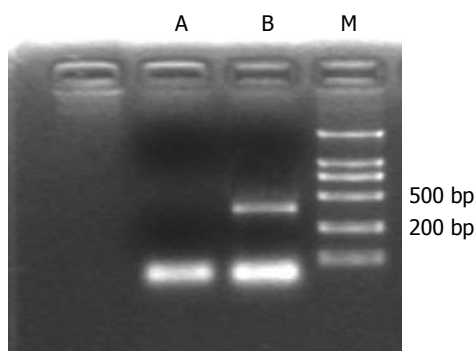


图 6 HuH-7 细胞 p16 mRNA 表达情况. M: DL2000 分子量 Marker; A: 未用药处理的细胞; B: 经药物处理的细胞.

响 MSP 电泳结果可见, 对照组细胞仅甲基化引物扩增出特异 PCR 条带(Am 道 150 bp), 实验组仅非甲基化引物扩增出特异 PCR 条带(Bu 道)(图 5).

2.5 用 5-aza-CR 处理前后 HuH-7 细胞 p16 mRNA 表达变化 实验组细胞有 p16 mRNA 表达(B 道 404 bp), 而对照组没有 p16 mRNA 表达(A 道)(图 6).

2.6 裸鼠移植瘤体积的大小 5 wk 后, 处死裸鼠, 实验组和对照组移植肿瘤以及切除移植瘤体积大小对比结果见图 7, 抑瘤率(%) = $(1-4.45/8.13) \times 100\% = 42.44$ (表 2).

2.7 裸鼠甲基化状态的改变和程度 对照组甲基化引物扩增阳性(Am 道 150 bp), 而非甲基化引物扩增阴性(Au 道); 实验组甲基化引物和而非甲基

表 2 两组移植瘤体积大小比较(cm³)

裸鼠编号	1	2	3	4	5	6	7	mean ± SD
对照组	8.91	9.56	4.91	4.47	9.56	9.19	10.32	8.13 ± 0.32
实验组	4.28	3.44	6.37	3.48	6.16	5.46	1.92	4.45 ± 0.25

化引物扩增均阳性(Bm 和 Bu 道)(图 8).

2.8 移植瘤细胞周期和凋亡值 该药对裸鼠移植瘤亦有明显抑制作用: 实验组和对照组比较, 凋亡细胞增加 2.9% ± 0.6%, 细胞周期发生了明显改变, G₀/G₁ 期延长了 27.4% ± 3.1%, S 期缩短了 25.8% ± 2.1%, G₂ 期缩短了 1.6% ± 1.8%(图 9-10).

2.9 实验组和对照组裸鼠移植瘤组织细胞 p16

■名词解释

MSP: 甲基化特异性PCR. 其原理是基于亚硫酸氢盐和氢醌能将DNA链上的C碱基变成U碱基; 而当C碱基被甲基化后, 这一转化将不会发生. 这样, 甲基化与非甲基化的DNA序列经过亚硫酸氢盐修饰后, 即可通过序列特异的引物区分开来.

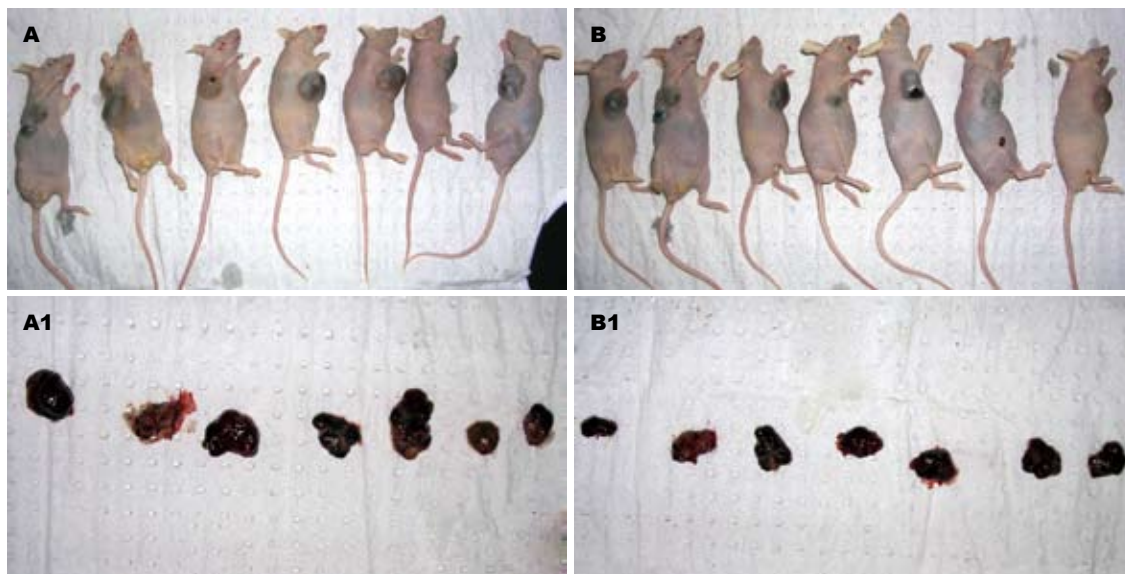


图7 5 wk后移植肿瘤大小. A, A1: 对照组; B, B1: 实验组.

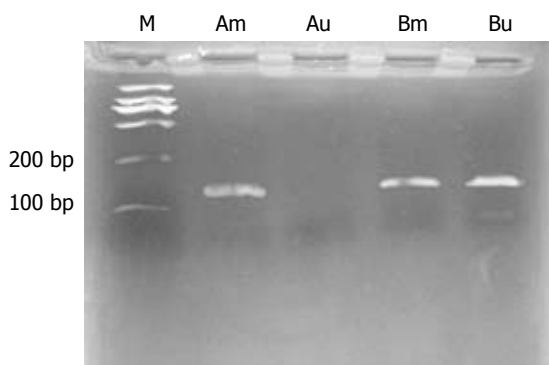


图8 *p16*基因甲基化特异性PCR产物电泳图. M: 分子质量Marker; A: 对照组的HuH-7裸鼠移植瘤组织细胞DNA; B: 实验组HuH-7裸鼠移植瘤组织细胞DNA; m: 甲基化引物; u: 非甲基化引物.

mRNA的表达 实验组HuH-7移植瘤细胞有*p16*mRNA表达(B1和B2道, 404 bp); 而对照组HuH-7移植瘤细胞没有*p16* mRNA表达(A1和A2道)(图11).

3 讨论

我们用四唑盐比色法(MTT)检测HuH-7细胞在用药物处理后的生长曲线. 用一定浓度5-aza-CR处理后,*p16*基因异常甲基化就可能得以逆转, 其抑癌功能可能就得以表现. 然而, 我们发现: 在5-aza-CR浓度为2 $\mu\text{mol/L}$ 以下时, 实验组与对照组相比, 其抑制作用无显著性差异($P>0.05$); 但当5-aza-CR浓度达到4 $\mu\text{mol/L}$ 或以上时, 与对照组相比, 则抑制作用有显著性差异($P<0.01$), 具统计学意义. 这说明该药物要达一定浓度, 才有抑制肿瘤细胞生长的作用. MTT结果表明:

5-aza-CR对HuH-7细胞生长的抑制作用有时间及浓度依赖作用, 即随着药物浓度的增加, 作用时间的延长, 细胞生长缓慢、停滞, 甚至死亡. 这说明低浓度的5-aza-CR可能不能改变*p16*基因的异常甲基化状态, 其抑制肿瘤增殖功能尚未表现出来.

流式细胞术检测结果: 细胞 G_0/G_1 期延长, 分别由19.6%增加到60.7%, 而 G_2 期和S期均缩短; G_2 期分别由10.0%减少到8.1%; S期分别由70.1%减少到31.2%. 这提示5-氮杂胞苷可能将通过 G_0/G_1 期而进入S期的HuH-7细胞阻滞于 G_1 期, 从而导致DNA合成期(S期)细胞含量相对下降; 细胞凋亡率增加了30.9%, 说明5-aza-CR具有诱导凋亡的作用. 5-aza-CR可改变肿瘤细胞周期, 使 G_0/G_1 期延长, S期缩短, 这与大多数5-aza-CR的实验结果是相同的^[9-13].

迄今已有许多事实证明, 在许多肿瘤中, 包括肝细胞癌, 对*p16*基因来说, 除了缺失、突变外, *p16*基因甲基化是一种普遍现象. 如图5所示, 以5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CR处理HuH-7细胞5 d后, 均使*p16*基因完全去甲基化, 非甲基化引物扩增阳性. 5-aza-CR同5-脱氧杂氮胞苷一样对*p16*基因是一个有效的去甲基化药物^[10-11].

*p16*基因mRNA的表达情况决定了*p16*蛋白的表达. 我们应用RT-PCR技术检测HuH-7肝癌细胞, 经5-aza-CR药物处理后, *p16*基因mRNA出现表达, 而未经药物处理的细胞未出现*p16* mRNA的表达. 说明5-aza-CR处理后, 肝癌细胞生长抑制和恶性程度降低是因为5-aza-CR去甲基化作用, 诱导因高甲基化而处于静止状态的

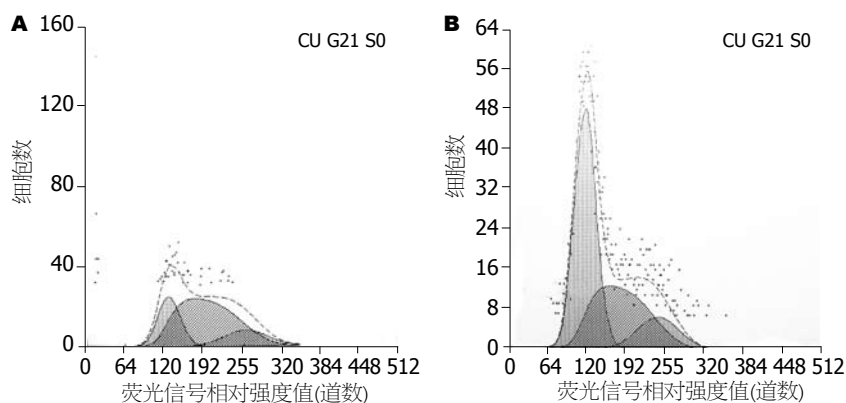


图 9 HuH-7细胞裸鼠移植瘤细胞周期。A: 对照组; B: 实验组。A中所示3个峰: G₁、S、G₂期, 所占百分比: 23.6%、61.5%、14.9%。B中所示3个峰: G₁、S、G₂期, 所占百分比: 51.0%、35.7%、13.3%。

■同行评价
本文设计合理, 研究方法正确, 图表清楚, 书写规范, 有一定的学术价值及潜在应用价值。

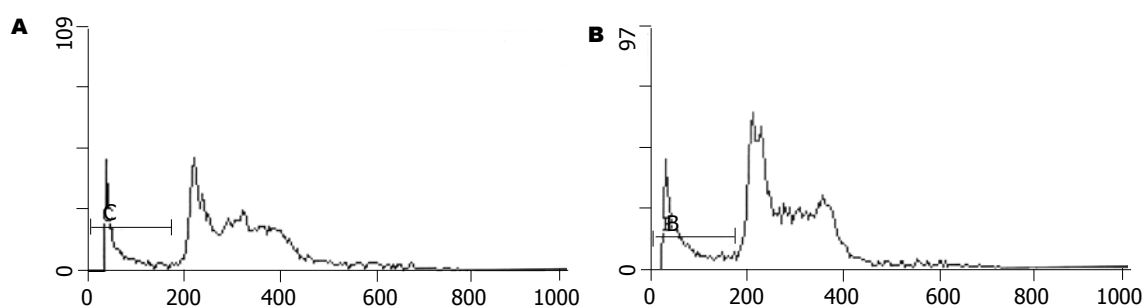


图 10 HuH-7细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡峰值。A: 对照组; B: 实验组。对照组HuH-7细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡峰值(C)15.5%。实验组HuH-7细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡峰值(B)18.4%。

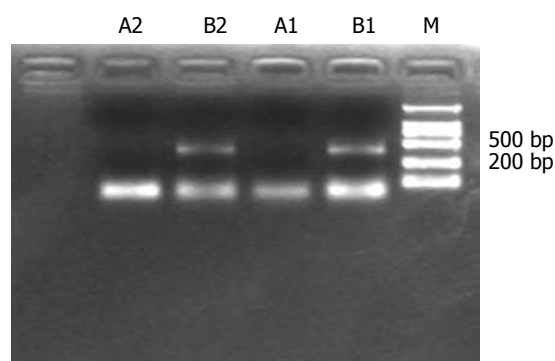


图 11 HuH-7移植瘤细胞p16 mRNA的表达情况。M: DL2000分子质量marker; A1, A2: 对照组标本; B1, B2: 实验组标本。

基因重新表达, 尤其是抑癌基因p16的表达。提示高甲基化状态及p16基因失活在肝癌的发生发展中起重要作用。

HuH-7裸鼠移植瘤经5-aza-CR处理后, 肿瘤细胞生长受到抑制, 裸鼠致瘤性也明显降低, 其抑瘤率达45%。进一步用MSP检测p16基因甲基化状态发现, 对照组甲基化引物扩增阳性, 而非甲基化引物扩增阴性; 实验组甲基化引物和非甲基化引物扩增均阳性。说明该药部分改变了p16基因的甲基化状态, 也就是说只有部分肿瘤细胞的p16基因的甲基化改变得以逆转, 从而表现为甲基化引物和非甲基化引物扩增均有条带。进一步研究发现实验组p16 mRNA表达均增高,

说明5-aza-CR处理后, p16基因功能得以恢复或部分恢复, P16蛋白重新表达, 使细胞阻滞于G₁期, 在其他凋亡诱导因子的协同作用下, 抑制肿瘤细胞生长。同样提示高甲基化状态及p16基因失活在肝癌的发生发展中起重要作用。当然, 绝非仅仅p16抑癌基因, 还可能其他基因存在异常高甲基化, 如肖文华 *et al*^[14], 在以往的研究中发现肝癌中17P13.3位点CpG岛、PYNZ 22.1基因CpG位点及Rb基因存在异常高甲基化。Zhong *et al*^[15]研究发现HuH-7还存在RASSF1A基因启动子区CpG岛的异常甲基化, 用5-脱氧杂氮胞苷处理后, 其基因功能得以恢复。因此, 5-aza-CR去甲基化作用是否也恢复了这些抑癌基因的功能, 尚待进一步研究。用5-aza-CR注射裸鼠腹腔后, 实验组甲基化检测结果是甲基化引物和非甲基化引物扩增均阳性, 而体外实验的实验组甲基化检测结果是甲基化引物扩增阴性, 非甲基化引物扩增则阳性。说明腹腔内给药只能部分改变p16基因的甲基化状态, 也就是说只有部分裸鼠肿瘤细胞的p16基因的甲基化改变得以逆转。为什么会出现这种结果? 我们分析是: (1) 给药剂量不够, 达不高有效的血浓度。(2) 给药后裸鼠饲养时间较短, 使有些肿瘤细胞的异常甲基化还没逆转过来。(3) 给药次数过少使药物的作用时间过短。或许还有其他我们不能解释的原因。

总之, 经药物处理的细胞株和裸鼠, 其光镜下、生长曲线、移植瘤大小、细胞周期的变化和p16 mRNA表达等, 提示5-aza-CR可抑制肝癌细胞的恶性表型。

4 参考文献

- Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3: 573-588
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
- Herranz M, Esteller M. DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol* 2007; 361: 25-62
- Fojtova M, Piskala A, Votruba I, Otmar M, Bartova E, Kovarik A. Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer. *Pharmacol Res* 2007; 55: 16-22
- Cui X, Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Hatakeyama K, Hirano S. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells. *Hum Pathol* 2006; 37: 298-311
- Luan J, Qin Y, Xu D, Sun ZL, Sun ZF. Growth inhibition and demethylation by a component of natural drug, CDP, in cancer cell lines. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2005; 36: 834-838
- 董科, 李波, 覃扬, 刘建余, 李承志, 孙芝琳. 胰腺组织 p15、p16 抑癌基因 CpG 岛甲基化研究. *中德临床肿瘤学杂志* 2005; 4: 213-217
- Hui AM, Sakamoto M, Kanai Y, Ino Y, Gotoh M, Yokota J, Hirohashi S. Inactivation of p16INK4 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 575-579
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530
- Poirier F, Pontet M, Labas V, le Caer JP, Sghiouar-Imam N, Raphael M, Caron M, Joubert-Caron R. Two-dimensional database of a Burkitt lymphoma cell line (DG 75) proteins: protein pattern changes following treatment with 5'-azacytidine. *Electrophoresis* 2001; 22: 1867-1877
- Koh E, Bandle R, Clair T, Roberts DD, Stracke ML. Trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine switch S1P from an inhibitor to a stimulator of motility through epigenetic regulation of S1P receptors. *Cancer Lett* 2007; 250: 53-62
- 刘建余, 覃扬, 孙芝琳, 孙泽芳. 人原发性肝癌中 p16、p15 基因 5' CpG 岛甲基化的研究. *四川大学学报* 2002; 39: 127-132
- Qin Y, Liu JY, Li B, Sun ZL, Sun ZF. Association of low p16INK4a and p15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1276-1280
- 肖文华, 刘为纹, 吕有勇, 高崇峰. 肝细胞癌多种抑癌基因失活机理的研究. *第三军医大学学报* 1997; 8: 324-327
- Zhong S, Yeo W, Tang MW, Wong N, Lai PB, Johnson PJ. Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3376-3382

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^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年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 2008-06-18)

胰腺癌细胞基因组范围内的基因缺失

林连捷, 王玉峰, 郑长青, 金玉, 胡刚正, 刘香, 林艳

林连捷, 郑长青, 金玉, 胡刚正, 刘香, 林艳, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
王玉峰, 沈阳二四五医院药剂科 辽宁省沈阳市 110042
林连捷, 2007年中国医科大学博士, 讲师, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的分子生物学和遗传学研究。
作者贡献分布: 此课题由林连捷和郑长青设计; 研究过程由林连捷, 王玉峰, 金玉, 胡刚正, 刘香, 林艳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由林连捷, 王玉峰, 郑长青提供; 数据分析由林连捷完成; 本论文写作由林连捷完成。
通讯作者: 林连捷, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科. audreylin73@hotmail.com
电话: 024-83956383
收稿日期: 2008-02-03 修回日期: 2008-03-19

Genome-wide gene loss in human pancreatic cancer cells

Lian-Jie Lin, Yu-Feng Wang, Chang-Qing Zheng, Yu Jin, Gang-Zheng Hu, Xiang Liu, Yan Lin

Lian-Jie Lin, Chang-Qing Zheng, Yu Jin, Gang-Zheng Hu, Xiang Liu, Yan Lin, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Yu-Feng Wang, Pharmacy Department, the 245th Hospital of Shenyang, Shenyang 110042, Liaoning Province, China
Correspondence to: Lian-Jie Lin, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. audreylin73@hotmail.com
Received: 2008-02-03 Revised: 2008-03-19

Abstract

AIM: To investigate genome-wide loss of heterozygosity (LOH) and homozygous deletion in human pancreatic cancer cell lines.

METHODS: Genome-wide LOH and homozygous deletion in 17 pancreatic cancer cell lines were studied using high-density single nucleotide polymorphism array and the data were analyzed using a special analytical software. PCR was performed to verify homozygous deletion following screening for potential genetic domains associated with development of pancreatic cancer.

RESULTS: A total of 26 homozygous deletions were verified by PCR and the accuracy of the chip was 83.9% (26/31). On average, 1.29 genes were involved in each region. Each pancreatic cancer cell line had different LOH. Different

chromosome arms presented with various LOH frequency with the most common abnormalities in 9p and 18q, occurring in 16 cell lines (94.1%).

CONCLUSION: Genome-wide LOH and homozygous deletions are common in pancreatic cancer cell lines, indicating existence of novel tumor suppressor genes.

Key Words: Single nucleotide polymorphism array; Loss of heterozygosity; Homozygous deletion; Pancreatic cancer

Lin LJ, Wang YF, Zheng CQ, Jin Y, Hu GZ, Liu X, Lin Y. Genome-wide gene loss in human pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1849-1854

摘要

目的: 研究胰腺癌细胞基因组范围内的纯合性缺失和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH).

方法: 应用高密度单核苷酸多态性芯片和专用分析软件, 检测17种胰腺癌细胞株基因组范围内的纯合性缺失和LOH, 并筛选可能与胰腺癌发生、发展有关的基因区域, 用PCR验证纯合性缺失。

结果: 经过PCR验证, 26个区域确实为纯合性缺失, 芯片的准确度为83.9%(26/31)。这些缺失区域中, 平均每个区域只涉及1.29个基因。每一种细胞都有不同程度的LOH; 不同染色体臂出现LOH频率不同, 出现频率最高的为染色体臂9p和18q, 均为94.1%。

结论: 胰腺癌全基因组范围内出现多处LOH和纯合性缺失, 这些区域可能含有新抑癌基因。

关键词: 单核苷酸多态性芯片; 杂合性缺失; 纯合性缺失; 胰腺癌

林连捷, 王玉峰, 郑长青, 金玉, 胡刚正, 刘香, 林艳. 胰腺癌细胞基因组范围内的基因缺失. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1849-1854
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1849.asp>

■背景资料

高密度单核苷酸多态性芯片可以同时检测基因组范围内的基因数目异常和杂合性缺失, 提供基因异常的高解析度的图谱。

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科; 刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■研发前沿

胰腺癌细胞株的全基因组范围内,同时研究纯合性缺失和杂合性缺失可以提供更准确的抑癌基因的候选区域,甚至精细到具体基因。

0 引言

自20世纪50年代以来,世界各国就展开了对肿瘤发生机制的探讨,70年代末,分子生物学尤其是分子遗传学的兴起为肿瘤的研究带来曙光,自80年代末期开始,人类基因组计划的实施和遗传学的进步更是大大推动了肿瘤生物学的研究,数个抑癌基因被发现和克隆,如*p53*, *Rb*, *p16*等。染色体异常是肿瘤的重要特点,包括原癌基因的扩增和抑癌基因的缺失等,染色体异常分析在肿瘤研究中有重要意义。理想的分析方法是每个肿瘤标本进行全基因组的测序,与其正常对照组织进行对比。但目前的技术和资金所限,尚缺乏可行性。近年来,比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)成为检测基因组范围内基因拷贝数异常的主要方法,而杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)的研究也成为定位和发现抑癌基因的有效手段。两种方法各有其优缺点,如果两者结合能够得到更多的信息。新近出现的高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)芯片,可以同时检测基因拷贝数异常和LOH,提供了基因异常的高解析度的图谱^[1]。为了揭示胰腺癌发生的分子机制,发现新的抑癌基因候选基因,我们应用高密度的SNP分析芯片,研究17种胰腺癌细胞株基因组范围内的纯合性缺失及LOH。

1 材料和方法

1.1 材料

人类胰腺癌细胞株17种,其中AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, HPAF-II, Hs 700T, Hs 766T, PANC-1, Panc 02.03, Panc 03.27, Panc 05.04, Panc 08.13, Panc 10.05, SU.86.86和SW 1990来自美国细胞库American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA), MIA PaCa-2来自日本细胞库Japanese Collection of Research Bioresources(JCRB, Osaka, Japan), 细胞株培养液购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取:

应用试剂盒PUREGENE DNA Isolation Kit(Gentra Systems, Minneapolis, MN)根据说明书提取细胞基因组DNA: 收集 2×10^6 细胞装入1.5 mL Eppendoff管, 加入300 μ L 细胞溶解液, 混匀, 加入1.5 μ L RNase A液, 37°C 温育30 min, 加入100 μ L 蛋白沉淀液, 反复离心取上清, 直至没有沉淀为止。加入600 μ L的1000 mL/L乙醇, 轻柔手摇50次, 混合。离心后去上清, 试管中加入300 μ L的700 mL/L乙醇。多次颠倒试

管, 洗DNA沉淀。离心, 倒除乙醇, DNA于空气中干燥10-15 min。加入50 μ L的DNA水化液。分光光度计测其浓度和纯度。

1.2.2 芯片制作和分析:

Affymetrix基因芯片系统包括全自动芯片洗涤工作站, 高分辨率芯片扫描仪和杂交箱。根据GeneChip Human Mapping 100 K Array操作手册, 从细胞株中提取DNA后, 250 ng DNA用2种限制性内切酶*Xba* I 或 *Hind*III消化, 末端连接adapter后进行PCR。PCR产物片段化后, 末端进行标志(labeling), 然后与Affymetrix公司的GeneChip[®] Human Mapping 100 K Mapping microarray上的探针杂交。检测基因芯片上近100 000个SNP探针的荧光信号, 应用分析软件Copy Number Analyzer for the Affymetrix GeneChip Mapping 100 K array (CNAG), 自动通过分析信号的强弱判定拷贝数目, 通过杂合性信号的有无分析胰腺癌基因组的LOH的存在与否^[2]。

1.2.3 纯合性缺失结果验证

分析17种胰腺癌细胞的数据, 筛选可能与胰腺癌发生、发展有关的基因, 用PCR验证纯合性缺失。设计基因特异的引物扩增细胞株的DNA, 同时提取健康人的DNA作为正常对照, 蒸馏水作为阴性对照。引物设计是应用软件GENETYX-WIN Ver 7.0, 并由Invitrogen(Carlsbad, CA)公司合成。PCR仪是Applied Biosystems(Foster City, CA)GeneAmp PCR System 9600。

2 结果

2.1 胰腺癌细胞株的基因组图谱

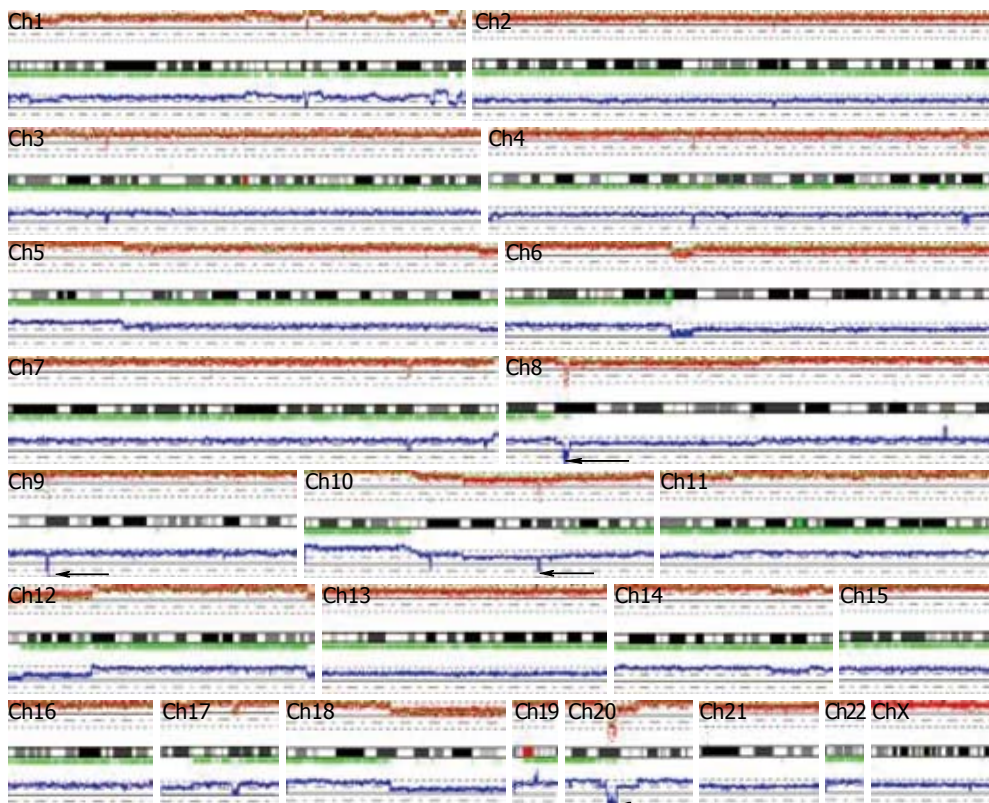
应用SNP芯片和CNAG软件详细分析胰腺癌细胞株的基因组的异常变化, 绘制了基因组图谱。Hs 766T细胞株的全基因组图谱, 红色的点是每个SNP的原始荧光信号, 蓝色曲线是5个连续的SNP点信号综合分析后得到的平均值(箭头所指处拷贝数为0, 即纯合性缺失), 染色体下方的绿色条表示杂合性信号, 无杂合性信号的区域表示LOH阳性(图1)。胰腺癌基因组出现多处DNA拷贝数异常, Hs 766T细胞株在8p, 9p, 10q及20p等多处出现纯合性缺失(经位点分析, 8p, 9p, 10q处无已知基因, 20p处有一个基因)。

2.2 胰腺癌细胞株的纯合性缺失

筛选可能与胰腺癌发生和发展有关的含基因区域31个, 应用特异性引物进行PCR扩增验证纯合性缺失, 经过PCR验证, 26个区域确实为纯合性缺失, 芯片的准确度为83.9%。经过PCR证实的26个有基因的

■相关报道

有学者应用芯片研究胰腺癌基因组异常, 提供了大量信息, 但是信息量过于繁多而粗糙, 难以确定具体基因, 有待提高解析度。例如应用2464个BAC clones芯片, 解析度为1.4 Mb; 结合BAC和cDNA芯片, 解析度大约1 Mb; 利用5400个BAC克隆芯片, 解析度大约420 kb; 26 000 cDNA芯片, 解析度大约60 kb。



■创新盘点
 较前研究, 本研究应用的芯片有2个主要优势: 第一、解析度高, 这样使候选基因范围缩小, 更易于确定抑癌基因, 即如表1中所示, 每个区域候选基因为1-4个; 第二、此芯片较传统芯片相比, 可以同时研究基因组范围内的基因数目异常和杂合性缺失。

图 1 应用SNP芯片和CNAG软件显示Hs 766T细胞的基因组图谱.

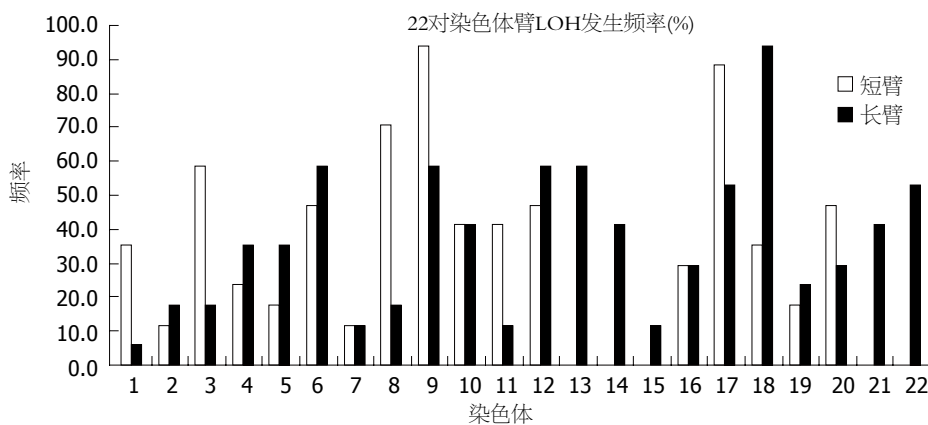


图 2 胰腺癌细胞株22对染色体臂杂合性缺失发生频率图.

纯合性缺失区域位置及所涉及基因和细胞. 这些缺失区域中, 14个区域只涉及1个基因, 11区域涉及2个基因, 1区域涉及4个基因, 平均每个区域1.29个基因(表1).

2.3 胰腺癌细胞株的基因组LOH情况 应用SNP芯片, 在检测基因拷贝数的同时, 根据杂合性信号的有无, 可以判定LOH的存在与否, 可以显示每种胰腺癌细胞株的每一条染色体臂LOH情况. 17种胰腺癌细胞基因组中, 每一种细胞都有不同程度的LOH, 其中Panc 08.13细胞的22条染色体臂发生LOH, 频率最高(50.0%), 其次是Hs 700T和MIA PaCa-2细胞21条染色体臂有LOH(47.7%). Panc 05.04出现频率最低, 只有5条

染色体臂发生LOH(11.4%).

胰腺癌细胞株基因组范围内不同染色体臂出现LOH频率不同, 图2显示22对染色体臂LOH出现频率. 高频率的(50%以上)LOH出现在染色体臂9p(16/17, 94.1%), 18q(16/17, 94.1%), 17p(15/17, 88.2%), 8p(12/17, 70.6%), 3p(10/17, 58.8%), 6q(10/17, 58.8%), 9q(10/17, 58.8%), 12q(10/17, 58.8%), 13q(10/17, 58.8%), 17q(9/17, 52.9%)和22q(9/17, 52.9%).

3 讨论

胰腺癌由于解剖位置特殊和生物学侵袭性高, 症状缺乏特异性, 易发生早期转移, 因而确诊时

应用要点

本研究为今后胰腺癌的研究提供了新的线索和方向,可以研究筛选出的基因在胰腺癌临床标本中的变化以及基因功能。

表 1 17种胰腺癌细胞株中经过PCR验证的含基因的纯合性缺失区域

染色体号	染色体区带	起始位置(kb)	终止位置(kb)	涉及基因	细胞株
3	3p14.2	60 152	60 449	<i>FHIT</i>	HPAF-II
3	3p14.2	60 215	60 273	<i>FHIT</i>	AsPC-1
6	6q22.33	129 215	129 220	<i>LAMA2</i>	MIA PaCa-2
6	6q25.3	156 991	157 399	<i>ARID1B</i>	MIA PaCa-2
8	8p22	15 119	15 775	<i>TUSC3</i>	MIA PaCa-2
8	8q23.3	114 310	114 656	<i>CSMD3</i>	MIA PaCa-2
9	9p22.1-p21.2	19 726	26 039	<i>MTAP, CDKN2A</i>	Capan-1
9	9p21.3	20 487	23 511	<i>MTAP, CDKN2A</i>	MIA PaCa-2
9	9p21.3	20 866	22 041	<i>MTAP, CDKN2A</i>	SU.86.86
9	9p21.3	21 204	22 895	<i>MTAP, CDKN2A</i>	BxPC-3
9	9p21.3	21 948	22 090	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	Panc 03.27
9	9p21.3	21 948	22 185	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	Panc 08.13
9	9p21.3	21 948	22 185	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	PANC-1
9	9p21.3	21 971	22 185	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	Panc 05.04
9	9q32	112 811	113 577	<i>DEC1, TNC, TNFSF15, TNFSF8</i>	BxPC-3
10	10p12.33-p12.31	18 233	18 738	<i>SLC39A12, CACNB2</i>	BxPC-3
10	10q22.1	72 560	73 052	<i>CDH23, PSAP</i>	BxPC-3
18	18q21.1	46 937	46 997	<i>RKHD2</i>	Panc 05.04
18	18q21.1	46 937	47 606	<i>RKHD2</i>	BxPC-3
18	18q21.2	49 275	49 712	<i>DCC</i>	MIA PaCa-2
18	18q21.2	49 977	49 987	<i>MBD2</i>	MIA PaCa-2
20	20p12.1	15 048	15 087	<i>C20orf133</i>	Hs 766T
21	21q22.3	41 752	41 802	<i>TMPRSS2</i>	BxPC-3
21	21q22.3	42 289	42 472	<i>ZNF295, UMODL1</i>	BxPC-3
23	xp11.3	42 956	43 424	<i>EFHC2</i>	MIA PaCa-2
23	Xq26.3	136 515	136 773	<i>FGF13</i>	Capan-1

多属晚期,除了手术之外,尚无其他的有效治疗方法.术后5年生存率不到5%^[3-4],是预后最差的消化道恶性肿瘤之一.同其他肿瘤一样,胰腺癌的发生、发展是一个多阶段,受多基因调控的过程,由多种肿瘤相关基因表达失常或肿瘤抑制基因失活所致.

基因组DNA的片段扩增或缺失在许多疾病的发生、发展中起重要作用.最初检测基因组范围内基因拷贝数异常的方法是CGH^[5],原理是用两份标记不同荧光素的样品(检测样品和对照样品)同时与中期染色体进行杂交,通过比较荧光信号强度,快速而又直观地检测实验样品和对照样品之间基因组DNA的拷贝数量的差异.在此基础上发展起来的比较基因组杂交芯片(array-CGH),将DNA克隆或cDNAs做成微阵列,代替中期染色体作为杂交靶,使分辨率提高从20 Mb提高到<1 Mb^[6]. Array-CGH中微阵列探针通常是PCR扩增的细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)克隆或cDNA分子.近期出现的一种含有32 433 BAC芯片解析度提

高到80 kb^[7].多位学者研究胰腺癌的基因组异常.有学者应用2464个BAC clones芯片,解析度为1.4 Mb^[8];有人结合BAC和cDNA芯片,解析度大约1 Mb^[9];有研究利用5400个BAC克隆芯片,解析度大约420 kb^[10];还有利用12 232个克隆cDNA芯片,解析度大约300 kb^[11];14 160 cDNA芯片,解析度大约100.1 kb^[12];26 000 cDNA芯片,解析度大约60 kb^[13].

除了解析度的限制,这种检测方法的主要缺陷是CGH只能检测到扩增或缺失这种拷贝数的异常,但不能发现Allelic homozygosity(AH),即一个等位基因缺失,而余下的一个等位基因扩增,基因数目没有变化,这需要研究LOH.所谓LOH即一个位点上两个多态性的等位基因中的一个出现突变或缺失,在肿瘤细胞中是一种常见的DNA变异.抑癌基因的杂合性缺失会导致肿瘤的发生,因此分析肿瘤组织LOH为定位和发现抑癌基因的有效手段.全基因组扫描LOH传统方法包括微卫星标记法(polymorphic microsatellite markers)和限制性片段长度多态性

标记(restriction fragment length polymorphisms, RFLPs). 但是这两种检测LOH方法的缺点是操作费时费力, 需要大量的样本DNA, 检测能力受制于标志物的量.

应用SNP芯片, 可以克服上述方法的缺点. SNP芯片的优点是需要的样本DNA量少, 解析度高, 可以在检测基因拷贝数的变化的同时, 判定LOH的存在与否. SNP主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性, 是人类可遗传的变异中最常见的一种, 占有已知多态性的90%以上. 2004年美国Matthew Meyerson研究小组首次应用SNP芯片研究人类肿瘤全基因组拷贝数目异常^[14], 此研究应用约10 000个SNP的芯片研究了肺癌和乳腺癌的基因组异常, 同时与传统CGH芯片进行了对比, SNP芯片解析度最高, 提供了更为精确的包含抑癌基因和癌基因的候选位点. Calhoun *et al*发现与微卫星标记法相比较, 应用SNP芯片可以提高120倍杂合性信号^[15], 有利于LOH的研究. SNP芯片引起了学者关注, 应用于膀胱癌^[16]、卵巢癌^[17]、肺癌^[18]及前列腺癌^[19-20]等肿瘤的研究.

我们所用的GeneChip[®] Human Mapping 100 K Mapping microarray芯片上近100 000个SNP探针的荧光信号, 这些SNP位点间的中位物理距离接近8.5 kb, 平均间距是23.6 kb, 这些高密度的探针, 使解析度明显提高, 有利于抑癌基因的筛选. 我们发现高频率的(50%以上)LOH出现在染色体臂9p, 18q, 17p, 8p, 3p, 6q, 9q, 12q, 13q, 17q和22q. 出现频率最高的9p和18q(16/17, 94.1%)上分别存在抑癌基因CDKN2A和SMAD4, 他们与胰腺癌的关系已经被广泛关注^[21-25]. 也有研究发现12q, 17p和18q的LOH与胰腺癌预后不良有关^[26]. 虽然一些高频率LOH的染色体臂上已经确定了抑癌基因的存在, 例如CDKN2A(9p), SMAD4(18q)及TP53(17p)等, 但是, 多数染色体臂上的杂合性缺失区域中需要进一步的研究. LOH研究提供了范围较广的抑癌基因的候选区域, 研究纯合性缺失可以提供更加小范围的候选区域. 经过验证的26个有基因的纯合性缺失区域, 平均每个区域1.29个基因, 这种高解析度为今后的研究提供了更加明确的方向. 这些纯合性缺失区域涉及的基因中, 9号染色体短臂上编码CDKN2A基因缺失出现频率最高, 此基因蛋白产物为P16蛋白, 是一种抑癌基因, 在胰腺癌及其他肿瘤中广泛研究^[21-22, 27-29]. FHIT基因是属于普遍脆性位点(common fragile sites, CFSs),

他是一种抑癌基因, 在胰腺癌等多种肿瘤癌变过程中发挥作用^[30-31]. 有些基因形成基底膜的成分, 或者在细胞连接, 血管形成中有一定作用, 例如CDH23, LAMA2. 近来的研究也发现CDH23在胰腺癌中纯合性缺失^[13], 但具体功能尚有待研究.

应用SNP芯片可以同时研究杂合性缺失和纯合性缺失, 提供一个更为精细的胰腺癌全基因组的“扫描图”. 本研究为今后胰腺癌的研究提供了新的线索和方向, 筛选出的基因在胰腺癌临床标本中的变化以及基因功能分析有待进一步研究.

4 参考文献

- Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, Law J, Berntsen T, Chadha M, Hui H, Yang G, Kennedy GC, Webster TA, Cawley S, Walsh PS, Jones KW, Fodor SP, Mei R. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* 2004; 1: 109-111
- Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 2005; 65: 6071-6079
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 15-36
- Yoshizawa K, Nagai H, Kurihara K, Sata N, Kawai T, Saito K. Long-term survival after surgical resection for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1153-1156
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-211
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; 36: 299-303
- Gysin S, Rickert P, Kastury K, McMahon M. Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44: 37-51
- Heidenblad M, Schoenmakers EF, Jonson T, Gorunova L, Veltman JA, van Kessel AG, Hoglund M. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2004; 64: 3052-3059
- Nowak NJ, Gaile D, Conroy JM, McQuaid D, Cowell J, Carter R, Goggins MG, Hruban RH, Maitra A. Genome-wide aberrations in pancreatic

■名词解释

单核苷酸多态性(SNP): 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性, 是人类可遗传的变异中最常见的一种, 他在人类基因组中广泛存在, 平均每500-1000个碱基对中就有一个, 是继限制性片段长度多态性和微卫星标记之后的第三代遗传标记.

■同行评价

本文选题新颖, 结构合理, 参考文献较新, 具有一定的临床价值。

- adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 161: 36-50
- 11 Mahlamaki EH, Kauraniemi P, Monni O, Wolf M, Hautaniemi S, Kallioniemi A. High-resolution genomic and expression profiling reveals 105 putative amplification target genes in pancreatic cancer. *Neoplasia* 2004; 6: 432-439
 - 12 Aguirre AJ, Brennan C, Bailey G, Sinha R, Feng B, Leo C, Zhang Y, Zhang J, Gans JD, Bardeesy N, Cauwels C, Cordon-Cardo C, Redston MS, DePinho RA, Chin L. High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9067-9072
 - 13 Bashyam MD, Bair R, Kim YH, Wang P, Hernandez-Boussard T, Karikari CA, Tibshirani R, Maitra A, Pollack JR. Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia* 2005; 7: 556-562
 - 14 Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C, Gray JW, Sellers WR, Meyerson M. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004; 64: 3060-3071
 - 15 Calhoun ES, Hucl T, Gallmeier E, West KM, Arking DE, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Chakravarti A, Hruban RH, Kern SE. Identifying allelic loss and homozygous deletions in pancreatic cancer without matched normals using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2006; 66: 7920-7928
 - 16 Koed K, Wiuf C, Christensen LL, Wikman FP, Zieger K, Moller K, von der Maase H, Orntoft TF. High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 34-45
 - 17 Thompson ER, Herbert SC, Forrest SM, Campbell IG. Whole genome SNP arrays using DNA derived from formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian tumor tissue. *Hum Mutat* 2005; 26: 384-389
 - 18 Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, Lin M, Beroukhi R, Garraway L, Beheshti J, Lee JC, Naoki K, Richards WG, Sugarbaker D, Chen F, Rubin MA, Janne PA, Girard L, Minna J, Christiani D, Li C, Sellers WR, Meyerson M. Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 2005; 65: 5561-5570
 - 19 Liu W, Chang B, Sauvageot J, Dimitrov L, Gielzak M, Li T, Yan G, Sun J, Sun J, Adams TS, Turner AR, Kim JW, Meyers DA, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 1018-1032
 - 20 Topping N, Borre M, Sorensen KD, Andersen CL, Wiuf C, Orntoft TF. Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer* 2007; 96: 499-506
 - 21 Li J, Weghorst CM, Tsutsumi M, Poi MJ, Knobloch TJ, Casto BC, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P. Frequent p16INK4A/CDKN2A alterations in chemically induced Syrian golden hamster pancreatic tumors. *Carcinogenesis* 2004; 25: 263-268
 - 22 Wada K. p16 and p53 gene alterations and accumulations in the malignant evolution of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 76-85
 - 23 Sunamura M, Lefter LP, Duda DG, Morita R, Inoue H, Yokoyama T, Yatsuoka T, Abe T, Egawa S, Furukawa T, Fukushima S, Oshimura M, Horii A, Matsuno S. The role of chromosome 18 abnormalities in the progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2004; 28: 311-316
 - 24 Jazag A, Ijichi H, Kanai F, Imamura T, Guleng B, Ohta M, Imamura J, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Arakawa Y, Miyagishi M, Taira K, Kawabe T, Omata M. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 2005; 24: 662-671
 - 25 Ijichi H, Otsuka M, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Kanai F, Arakawa Y, Seki N, Shimizu K, Miyazono K, Kawabe T, Omata M. Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 2004; 23: 1043-1051
 - 26 Yatsuoka T, Sunamura M, Furukawa T, Fukushima S, Yokoyama T, Inoue H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S, Horii A. Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6q/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2080-2085
 - 27 van Zutven LJ, van Drunen E, de Bont JM, Wattel MM, Den Boer ML, Pieters R, Hagemeyer A, Slater RM, Beverloo HB. CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2005; 19: 1281-1284
 - 28 Akervall J, Bockmuhl U, Petersen I, Yang K, Carey TE, Kurnit DM. The gene ratios c-MYC: cyclin-dependent kinase (CDK)N2A and CCND1: CDKN2A correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1750-1755
 - 29 Anzola M, Cuevas N, Lopez-Martinez M, Martinez de Pancorbo M, Burgos JJ. p16INK4A gene alterations are not a prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 397-405
 - 30 Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett* 2006; 232: 48-57
 - 31 Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Druck T, Ottey M, McCorkell KA, Huebner K. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Lett* 2006; 232: 27-36

编辑 李军亮 电编 郭海丽

联合应用热休克蛋白70与卡介苗对Hcaf细胞的抑制作用

杨野, 刘宇, 郭仁宣, 傅庆国

杨野, 中国医科大学附属第一医院干诊科 辽宁省沈阳市 110001

刘宇, 郭仁宣, 傅庆国, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

杨野, 医学博士, 主要从事肝胆肿瘤的外科治疗.

作者贡献分布: 刘宇, 郭仁宣及傅庆国对此文所作贡献均等; 此课题由杨野与刘宇设计; 研究过程由杨野, 刘宇及傅庆国操作完成; 本论文写作由杨野完成.

通讯作者: 杨野, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院干诊科, doctor_3047_cn@sina.com.cn

电话: 024-23256666

收稿日期: 2008-01-21 修回日期: 2008-03-18

Inhibitory effect of heat shock protein 70 combined with bacillus calmette-guerin on mouse hepatoma Hcaf cells

Ye Yang, Yu Liu, Ren-Xuan Guo, Qing-Guo Fu

Ye Yang, Ward of Cadre Care, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yu Liu, Ren-Xuan Guo, Qing-Guo Fu, the Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ye Yang, Ward of Cadre Care, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China, doctor_3047_cn@sina.com.cn

Received: 2008-01-21 Revised: 2008-03-18

Abstract

AIM: To investigate the anti-Hcaf cell efficacy induced by heat shock protein 70 (HSP70) and bacillus calmette-guerin (BCG), and to provide references for treatment of human malignant tumor using HSP70.

METHODS: Sixty-four mice were randomly and averagely divided into 4 groups: control group (injected with 50 μ L PBS), BCG group (immunized with 1 mg BCG), HSP70 group (immunized with 10 μ g HSP70) and combination group (immunized with 10 μ g HSP70 plus 1 mg BCG). Rat tumor model was induced by inoculation of Hcaf cells. Survival time, survival rate and tumor size were observed evaluated. Tumor tissues collected to observe the characteristics of Hcaf cells and alpha-fetoprotein (AFP) expression.

RESULTS: After immune treatment, the tumor growth of mice was inhibited, and the survival time was significantly prolonged in the HSP70 group and the combination group as compared with that in the control group (77.1 ± 15.1 d, 82.8 ± 13.2 d vs 22.9 ± 3.50 d, both $P < 0.01$); meanwhile, the survival rate was also enhanced (41.7%, 66.7% vs 0, both $P < 0.01$). AFP was expressed markedly in the control group and the BCG group; however, it was restrained in the HSP70 group and the combination group, especially in the latter. In comparison with that in the control group or the BCG group, the tumor cell atypia was decreased in the HSP70 group and the combination group.

CONCLUSION: Combination of HSP70 and bacillus calmette-guerin can inhibit the growth of Hcaf cells remarkably, which is superior to HSP70 or BCG alone.

Key Words: Heat shock protein 70; Bacillus calmette-guerin; Hcaf tumor cell; Immunohistochemistry

Yang Y, Liu Y, Guo RX, Fu QG. Inhibitory effect of heat shock protein 70 combined with bacillus calmette-guerin on mouse hepatoma Hcaf cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1855-1858

摘要

目的: 观察联合应用热休克蛋白70(HSP70)与卡介苗(BCG)对Hcaf肿瘤的抑制作用, 为应用肿瘤来源的HSP70治疗人类恶性肿瘤提供参考依据.

方法: 实验小鼠64只随机分为对照组、BCG免疫组、HSP70免疫组和联合组4组, 每组16只. 小鼠接种Hcaf细胞制成肿瘤模型. BCG组接种1 mg BCG; HSP70组注射10 μ g HSP70, 联合组以HSP70 10 μ g和BCG 1 mg代替, 对照组注射50 μ L PBS液. 观察小鼠的生存时间、生存率和肿瘤大小等指标的变化. 取肿瘤组织进行免疫组化实验, 观察肿瘤细胞性状及AFP的表达情况.

结果: 应用免疫治疗后, 小鼠肿瘤生长均得

■背景资料

恶性肿瘤的免疫治疗越来越受到人们的关注. 就目前的研究成果表明, 通过肿瘤的传统化疗、放疗及手术治疗往往难以获得根治, 难于解决转移和复发, 且常有明显的损伤和毒副作用. 肿瘤特异性和非特异性主动免疫治疗, 通过激发、增强机体对肿瘤的主动免疫排斥反应, 作为传统疗法的辅助方法, 则有可能达到根治肿瘤的目的.

■同行评议者

周霞秋, 主任医师, 上海瑞金医院感染科

■ 研发前沿

热休克蛋白是70目前被认为对于人体的许多种恶性肿瘤都有很好的免疫作用。卡介苗作为一种有效的免疫佐剂已在防治膀胱肿瘤方面取得良好效果,有实验表明应用BCG可以控制肿瘤的生长和减少肿瘤的复发。

到不同程度的抑制,生存期均有延长,其中HSP70组和联合组与对照组相比差异显著(77.1±15.1 d, 82.8±13.2 d vs 22.9±3.50 d, 均 $P<0.01$),同时生存率也有所提高(41.7%, 66.7% vs 0, both $P<0.01$)。对照组及BCG免疫组AFP表达明显,而HSP70组和联合组AFP表达均受到不同程度抑制,其中联合组尤其显著。与对照组及BCG免疫组比较, HSP70组和联合组肿瘤细胞异型性均有所降低。

结论: HSP70与BCG联合应用对Hcaf细胞有明显抑制作用,其疗效要优于单独应用HSP70或BCG。

关键词: 热休克蛋白70; 卡介苗; Hcaf肿瘤细胞; 免疫组化

杨野, 刘宇, 郭仁宣, 傅庆国. 联合应用热休克蛋白70与卡介苗对Hcaf细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1855-1858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1855.asp>

0 引言

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组具有重要生理功能,高度保守的蛋白质分子家族,其中HSP70是目前研究最多也最深入的一种。目前认为HSP70对于人体的许多种恶性肿瘤都有很好的免疫作用^[1-5]。HSP70分离与纯化技术也已比较完善^[6-7],其用于抗肿瘤的研究也广泛开展^[8-11]。卡介苗(bacillus calmette-guerin, BCG)作为减毒活疫苗已经在世界范围内广泛应用,目前国内外公认其作为一种有效的免疫佐剂已在防治膀胱肿瘤方面取得良好效果^[12-15],有实验表明应用BCG可以控制肿瘤的生长和减少肿瘤的复发^[16]。本文以此为出发点,观察HSP70和BCG联合应用的抗肿瘤效果,为恶性肿瘤的免疫治疗提供有实用意义的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 615小鼠肝癌细胞株Hcaf细胞购于大连医科大学病理教室,于♀近交系615小鼠腹腔内传代扩增。快速蛋白液相色谱系统(FPLC系统), ConA-Sepharose, Mono Q高效层析柱均购自瑞典Pharmacia公司。小鼠抗小鼠HSP70单克隆抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司。碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。FITC标记的兔抗山羊多克隆抗体购自美国Sigma公司。BCG购自成都生物制品公司。AFP试剂盒及UltraSensitive s-p试剂盒购于福

州迈新生物技术开发有限公司。近交系清洁级♀615小鼠购自中国医学科学院实验动物繁育中心,于中国医科大学医学实验动物中心清洁级动物间饲养。

1.2 方法 取腹腔传代第6-7天小鼠Hcaf瘤性腹水,离心收集细胞, PBS洗涤3次,留细胞沉淀备用。

1.2.1 HSP70的分离与纯化及定量定性分析: 将 5×10^9 个Hcaf细胞置于40 mL低渗缓冲液(30 mmol/L NaHCO₃, 0.5 mmol/L 苯甲酰磺酰氟, pH 7.2)中,以超声粉碎机破碎,4℃ 10 000 g离心2 h,取上清过ConA-Sepharose柱,收集未结合组分,4℃第一透析液(20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L β-巯基乙醇, 3 mmol/L MgCl₂, pH7.5)中透析过夜,然后将样品加到EDAD柱上,结合部分用含3 mmol/L ADP的缓冲液进行洗脱,将洗脱液加于Mono Q柱,用FPLC系统进行分离,200-500 mmol/L梯度NaCl洗脱,分别收集各洗脱峰蛋白,4℃第二透析液(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中透析过夜。将各色谱柱分离的样品及Mono Q柱的各洗脱峰样品在10% SDS-PAGE上进行相对分子质量及纯度测定。经免疫印迹分析确认为HSP70后,再以比色法进行纯度分析。

1.2.2 分组、肿瘤模型制备及免疫治疗: 取近交系615系小鼠64只,以随机原则分为对照组、BCG免疫组、HSP70免疫组和联合组4组,每组16只。于小鼠胸部右侧皮下接种Hcaf细胞 1×10^6 个/只,活细胞率>96%。制成肿瘤模型后,BCG组将BCG 1 mg接种于小鼠左侧胸部皮下,每7天1次;HSP70组将提取的HSP70以10 μg(以PBS调制0.2 g/L)注射于小鼠左侧胸部皮下,每7天1次;联合组以HSP70 10 μg和BCG 1 mg代替,对照组每次注射50 μL PBS液。观察各组小鼠的生存时间、生存率、肿瘤大小等指标。

1.2.3 免疫组化实验: 取近交系615系小鼠20只,按照之前的分组原则及免疫治疗方法处理,于荷瘤19 d后猝死所有小鼠,切取肿瘤组织进行免疫组化染色,观察肿瘤细胞性状及AFP的表达情况。

统计学处理 所有数据均在SPSS14.0软件包上进行, t 及 χ^2 检验分析结果, $P<0.05$ 为显著性差异的检验标准。

2 结果

经两次亲和层析和Mono Q柱分离后,得到纯度较高的 M_r 约为70 000的蛋白,免疫印迹分析证

■ 相关报道

目前已有文献报道,肿瘤来源的热休克蛋白70具有肿瘤免疫作用,卡介苗也已在防治膀胱肿瘤方面得到应用,而联合应用二者的效果却鲜有报道。

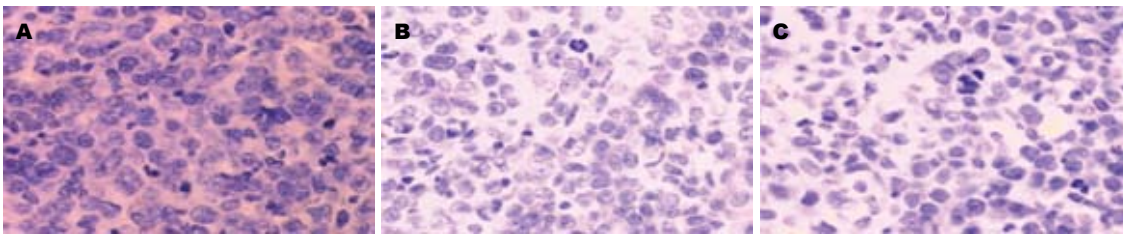


图 1 HSP70与BCG联合应用对肿瘤组织AFP表达的影响. A: 对照组; B: HSP70组; C: 联合组.

■创新盘点
 本文作者在查阅大量相关文献后, 通过具体实验, 首次提出将热休克蛋白70与卡介苗联合应用, 发现其抗肿瘤作用得到了增强.

表 1 HSP70与BCG联合应用对小鼠肿瘤、生存期限及生存率的影响 (mean ± SD)

分组	肿瘤直径(cm)	肿瘤体积(cm ³)	平均生存天数(d)	生存率(%)
对照组	12.94 ± 2.32	842.52 ± 534.93	22.9 ± 3.5	—
BCG组	11.53 ± 1.30	593.08 ± 149.10	47.7 ± 11.9	—
HSP70组	8.97 ± 2.36	334.55 ± 237.10 ^{bd}	>77.1 ± 15.1 ^{bd}	41.7 ^{bd}
联合组	3.89 ± 0.96	17.73 ± 8.24 ^{bdf}	>82.8 ± 13.2 ^{bdf}	66.7 ^{bdf}

^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs BCG组; ^fP<0.01 vs HSP70组.

实, 该蛋白即为HSP70. 应用免疫治疗后, 小鼠肿瘤生长均得到不同程度的抑制, 生存期均有延长, 其中HSP70组和联合组与对照组相比差异显著(P<0.01). 其中联合治疗组疗效尤其明显, 无论肿瘤大小、小鼠生存期及生存率均与另外两个单独免疫组有显著性差异, 本组有5只小鼠得到长期无瘤存, 7只荷瘤存活, 4只死亡, 生存率75%. 对照组于荷瘤后28 d内均死亡, 无一长期存活, 死亡率100%(表1). 切取肿瘤组织进行免疫组化染色显示, 对照组及BCG免疫组AFP表达明显, 染色呈强阳性, 而HSP70组和联合组AFP表达均受到不同程度抑制, 表明肿瘤增生得到了免疫抑制, 其中联合组尤其显著, 有3只小鼠肿瘤组织AFP显色阴性. 各免疫组均可见不同程度的淋巴细胞浸润, 尤其以联合组淋巴细胞浸润明显. 与对照组及BCG免疫组比较, 另外两组肿瘤细胞异型性均有所降低, 并可见到肿瘤中心坏死及肿瘤细胞变性(图1).

3 讨论

恶性肿瘤的免疫治疗已有近百年的历史, 其作为手术、放疗及化疗以外的肿瘤第四治疗程式即肿瘤的生物治疗越来越受到人们的关注. 尽管人类肿瘤主动免疫治疗还面临许多问题, 如应怎样克服肿瘤细胞异质性; 如何解除抗体的免疫抑制状态. 但就目前的研究成果表明, 通过肿瘤的传统化疗、放疗及手术治疗往往难以获得根治, 难于解决转移和复发, 且常有明显的损伤和毒副作用. 通过肿瘤特异性和非特异性主

动免疫治疗, 如能激发、增强机体对肿瘤的主动免疫排斥反应, 作为传统疗法的辅助方法, 则有可能达到根治肿瘤的目的.

机体对于疾病的免疫应答可分为特异性与非特异性免疫两种, 非特异应答(BCG可以增强此反应)是与生俱来的, 他的形成并不需要抗原刺激. 他是广泛地针对多种抗原, 此种反应作用广泛, 是免疫应答的基础, 但他的针对性不强, 对某种特定抗原物质往往不能产生足够强度的反应; 而特异性免疫应答(HSP70可以诱发并增强此反应)可以达到疾病的最终治愈. 本研究将二者联合应用, 观察到二者联合应用疗效要大于单独应用的疗效, 联合组进行免疫治疗后, 肿瘤显著缩小, 与对照组的肿瘤迅速增长形成鲜明对比, 平均生存期大于82.8 d, 与对照组相比, 差异明显(P<0.01), 而且生存率也明显高于其他各组. 这是因为肿瘤来源的HSP70可以携带多种肿瘤抗原肽, 可激发有效的抗肿瘤效应^[17], 其通过多种机制表现出抗肿瘤的活性: HSP70作为分子伴侣与肿瘤细胞内的内源性多肽结合提呈给杀伤细胞^[18]; 通过激活CTL(CD8⁺)细胞和γδT细胞杀伤肿瘤^[19]; 通过NK细胞发挥作用^[8]. HSP70作为免疫调节剂抑制肿瘤细胞生长及杀伤肿瘤细胞, 而其抗肿瘤效用又得到传统免疫佐剂BCG的加强. BCG菌种中的核酸、胞壁中的脂质、菌体蛋白及脂多糖均能刺激免疫产生抗癌免疫反应^[20-21], BCG中含有的胞壁酰二肽的活性成分可刺激T、B淋巴细胞功能, 激活巨噬细胞, 促进NK细胞杀瘤活性^[22-23]. 并且因为BCG可在

■应用要点
 通过比较联合组与HSP70的抗肿瘤作用, 结果显示联合应用HSP70与BCG较单独应用HSP70具有更显著的抑瘤和治疗作用, 证明HSP70与BCG联合应用可以增强疗效, 其抗肿瘤效果要优于单独应用HSP70. 本研究的结果为联合应用肿瘤源性的HSP70及BCG治疗恶性肿瘤提供了重要的实验依据.

■同行评价

本文内容较新, 结果令人鼓舞, 具有较好的学术价值。

宿主体内长期存活并增殖达几周或数月, 它具有可诱导强烈而长期的免疫应答的能力. 致使二者共同作用的结果表现为荷瘤小鼠肿瘤明显缩小甚至消失, 小鼠生存率显著提高, 组织学显示肿瘤细胞体积减小, 核分裂相减少, 细胞异型性不明显, 淋巴细胞大量浸润, AFP表达减少等.

另外, 通过比较联合组与HSP70的抗肿瘤作用, 结果显示联合应用HSP70与BCG较单独应用HSP70具有更显著的抑瘤和治疗作用, 无论在小鼠的肿瘤大小还是生存率上差别均显著, 这充分证明HSP70与BCG联合应用可以增强疗效, 其抗肿瘤效果要优于单独应用HSP70. 总之, 本研究的结果对于联合应用肿瘤源性的HSP70及BCG治疗恶性肿瘤提供了重要的实验依据.

4 参考文献

- Ramp U, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Grimm MO, Willers R, Gabbert HE. Expression of heat shock protein 70 in renal cell carcinoma and its relation to tumor progression and prognosis. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1099-1107
- Aghdassi A, Phillips P, Dudgey V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 616-625
- 傅庆国, 郭仁宣, 姚振宇. 肿瘤热休克蛋白70多肽复合物诱导特异性细胞毒T淋巴细胞产生的实验研究. *中华医学杂志* 2000; 80: 301-303
- Chang CL, Tsai YC, He L, Wu TC, Hung CF. Cancer immunotherapy using irradiated tumor cells secreting heat shock protein 70. *Cancer Res* 2007; 67: 10047-10057
- 吴顺华, 成军, 郑玉建. 热休克蛋白家族与肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 14: 87-92
- 马萍, 孟凡东, 傅庆国. 快速蛋白液相色谱系统纯化和分析小鼠肝癌细胞热休克蛋白70的研究. *中国医科大学学报* 2001; 4: 243-244
- 隋春阳, 李航宇, 胡勇, 宗志红, 李洪秀, 郭仁宣. HSP70-肿瘤肽复合物的纯化及其对肝癌细胞株HepG-2增殖的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 18: 1775-1779
- Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 759-769
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 15-27
- Li Y, Subject J, Yang G, Repasky E, Wang XY. Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006; 24: 5360-5370
- 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 郭仁宣. 热休克蛋白70在诱导肿瘤免疫中的效应. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003; 23: 31-33
- 任月发, 韩瑞发. BCG激活的淋巴细胞对膀胱肿瘤细胞株TBC-1杀伤作用的实验研究. *中国实用医药杂志* 2007; 10: 21-23
- Hameed A, Sezian N, Thwaini A. Bladder contracture: review for intravesical bacillus Calmette-Guerin complication. *Can J Urol* 2007; 14: 3745-3749
- Agrawal MS, Agrawal M, Bansal S, Agarwal M, Lavania P, Goyal J. The safety and efficacy of different doses of bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder transitional cell carcinoma. *Urology* 2007; 70: 1075-1078
- 兰卫华, 靳风烁, 王洛夫, 谢芳, 王晶. 卡介苗与丝裂霉素C膀胱灌注预防浅表性膀胱癌复发疗效及毒性比较的Meta分析. *中华泌尿外科杂志* 2006; 1: 29-32
- 任淑萍, 万敏, 丛宪玲, 吴秀丽, 王莉, 卫红飞, 王燕媚, 于永利, 王丽颖. 卡介苗作为抗肿瘤重组蛋白疫苗佐剂的研究. *中国免疫学杂志* 2007; 6: 526-530
- 龚福生, 郑秋红, 应敏刚, 刘胜, 谢云青, 陈蓉明. 小鼠肠癌HSP70多肽复合物的纯化及其抗肿瘤免疫效应. *中华肿瘤防治杂志* 2007; 15: 1132-1135
- 米振国, 张旭, 任连生, 刘红耀, 王全红, 韩存芝, 崔援朝, 郭素堂. 同种肿瘤来源的HSP70-PC对原位大鼠膀胱肿瘤的治疗研究. *肿瘤研究与临床* 2006; 2: 81-84
- Bak SP, Amiel E, Walters JJ, Berwin B. Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses. *Mol Immunol* 2008; 45: 1414-1423
- Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anne J. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett* 2008; 259: 16-27
- 蒋幼凡, 沈庆, 薛亚梅. 卡介苗多糖核酸对肺癌细胞粘附及骨架结构的影响. *第三军医大学学报* 2004; 13: 1178-1180
- Yutkin V, Pode D, Pikarsky E, Mandelboim O. The expression level of ligands for natural killer cell receptors predicts response to bacillus Calmette-Guerin therapy: a pilot study. *J Urol* 2007; 178: 2660-2664
- Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Iwamoto S, Miyazaki A, Yoshida H. Bacillus Calmette-Guerin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol* 2007; 14: 532-538; discussion 538

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 2008-06-18)

重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体小鼠树突状细胞对受体小鼠淋巴细胞激活的影响

朱研, 李涛, 朱继业, 陈建飞, 冷希圣

朱研, 李涛, 朱继业, 陈建飞, 冷希圣, 北京大学人民医院肝胆外科 北京市 100044

朱研, 北京大学人民医院肝胆外科硕士, 主要从事肝移植免疫耐受的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471637

作者贡献分布: 此课题由李涛, 朱继业及冷希圣设计; 研究过程由朱研及陈建飞操作完成; 本论文写作由朱研与李涛完成。

通讯作者: 朱继业, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝胆外科. litao_pku@yahoo.com.cn

电话: 010-88324553 传真: 010-68318386

收稿日期: 2008-02-24 修回日期: 2008-04-16

Effect of recombinant adenovirus Ad-PD-L1 transfection of donor mouse dendritic cells on the activation of receptor mouse lymphocytes

Yan Zhu, Tao Li, Ji-Ye Zhu, Jian-Fei Chen, Xi-Sheng Leng

Yan Zhu, Tao Li, Ji-Ye Zhu, Jian-Fei Chen, Xi-Sheng Leng, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471637

Correspondence to: Dr. Ji-Ye Zhu, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, 11 Xizhimen Southern Street, Beijing 100044, China. litao_pku@yahoo.com.cn

Received: 2008-02-24 Revised: 2008-04-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of recombinant adenovirus Ad-PD-L1 transfection of donor mouse C57BL/6 (H-2^b) dendritic cells on the activation of receptor mouse DBA/2(H-2^d) lymphocytes.

METHODS: pShuttle-GFP-CMV(-) plasmid and adenovirus bone plasmid pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1 were constructed. The recombinant adenovirus Ad-PD-L1 was packed, amplified and purified. Dendritic cells derived from donor mouse C57BL/6 bone marrow were isolated and cultured. The cells were divided into 3 groups. Group A and Group B were transfected with recombinant adenovirus Ad-PD-L1-GFP and

Ad-GFP respectively, and Group C served as blank control group. The expression of PD-L1 was monitored by GFP fluorescence in the infected cells and identified by Western blot. The lymphocytes of receptor mouse DBA/2 were isolated, and then labeled by carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE). After co-cultured with the dendritic cells in the three groups, flow cytometry was used to observe the proliferation and activation of lymphocytes from DBA/2 mice.

RESULTS: Enzyme digestion and sequencing confirmed the successful construction of recombinant adenovirus Ad-PD-L1. After transfection with Ad-PD-L1, PD-L1 expression of dendritic cells was verified by Western blot. The expression of PD-L1 in the dendritic cells infected with Ad-PD-L1 was increased by 37% ($P < 0.05$). After co-cultured with the lymphocytes from DBA/2 mice, the proliferation and activation of receptor lymphocytes were suppressed remarkably, and the proliferation rate was decreased by 41% as compared with that in the control group.

CONCLUSION: Transfection of donor mouse dendritic cells with recombinant adenovirus suppresses the proliferation and activation of lymphocytes from receptor mice through PD-1/PD-L1 co-stimulatory pathway.

Key Words: Programmed death-1; Programmed death ligand-1; Adenovirus vector; Dendritic cell; Activation of lymphocyte

Zhu Y, Li T, Zhu JY, Chen JF, Leng XS. Effect of recombinant adenovirus Ad-PD-L1 transfection of donor mouse dendritic cells on the activation of receptor mouse lymphocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1859-1865

摘要

目的: 观察重组腺病毒载体Ad-PD-L1转染供体C57BL/6(H-2^b)小鼠树突状细胞(DC)对受体DBA/2(H-2^d)小鼠淋巴细胞增殖和激活的影响。

■背景资料

器官移植术后的急性排斥反应是受体淋巴细胞激活后攻击、破坏新植入的供体器官,使其丧失功能的细胞免疫应答过程。淋巴细胞的活化需要双信号刺激,一个是抗原肽-MHC分子-CD3/TCR复合物,另一个是共刺激信号,由抗原呈递细胞表面的共刺激分子与T细胞膜上的配体结合提供共刺激信号,是T淋巴细胞活化所必须的。通过改变抗原呈递细胞表面分子表达来阻断共刺激信号是目前免疫耐受研究的热点。PD-1/PD-L1是一个重要的共刺激通路,在免疫系统中扮演负调控角色。增强抗原呈递细胞(如树突状细胞)上PD-L1的表达,则能通过PD-1/PD-L1共刺激通路抑制效应T细胞的活化和增生,诱导免疫耐受现象。

■同行评议者

仇毓东, 副教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

■ 研究前沿

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

方法: 构建腺病毒穿梭质粒pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1和腺病毒骨架质粒pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1,对重组腺病毒Ad-PD-L1进行包装、扩增和纯化。分离培养供体C57BL/6小鼠的DC,分为3组:腺病毒载体Ad-PD-L1转染组(A组),空载体转染组(B组)和对照组(C组)。Western blot检测转染后各组细胞PD-L1的表达。分离受体DBA/2小鼠的淋巴细胞,用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记,将供体C57BL/6小鼠的DC和受体DBA/2小鼠淋巴细胞混合培养,流式细胞仪观察淋巴细胞的增殖情况。

结果: 酶切及测序证实含PD-L1的重组腺病毒载体Ad-PD-L1构建成功。转染供体C57BL/6小鼠的DC后其PD-L1的表达升高37%($P < 0.05$),将转染了PD-L1的DC与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞进行共培养。与对照组相比,PD-L1表达升高后,明显地抑制了淋巴细胞的增殖和活化。受体DBA/2小鼠的淋巴细胞增殖降低41%($P < 0.01$)。

结论: 转染供体C57BL/6小鼠DC后通过共刺激通路PD-1/PD-L1抑制了受体DBA/2小鼠淋巴细胞的增殖和活化。

关键词: PD-L1; PD-1; 共刺激通路; 腺病毒载体; 树突状细胞; 淋巴细胞激活

朱研,李涛,朱继业,陈建飞,冷希圣. 重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体小鼠树突状细胞对受体小鼠淋巴细胞激活的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1859-1865

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1859.asp>

0 引言

同种异体移植排斥主要是受体的淋巴细胞被激活后进而攻击、破坏新植入的供体器官,使其丧失功能的细胞免疫应答过程。共刺激信号在同种异体移植的急性排斥反应中对T淋巴细胞的活化起到重要作用^[1-2]。目前已经证明,改变共刺激信号能够成功地诱导免疫耐受^[3]。PD-1/PD-L1(programmed death-1)程序性死亡分子-1/程序性死亡分子-配体1是一个重要的共刺激通路,在免疫系统中扮演负调控(negative regulation)角色^[4-13]。增强抗原呈递细胞(如树突状细胞)上PD-L1的表达,则能通过PD-1/PD-L1共刺激通路抑制效应T细胞的活化和增生,诱导免疫耐受现象。我们构建含小鼠PD-L1基因的重组腺病毒载体,转染供体C57BL/6小鼠骨髓来源的树突状细胞(dendritic cell, DC),增加其表面的PD-L1表达,

再与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞混合培养,通过PD-1/PD-L1共刺激通路来抑制受体淋巴细胞的激活,防止大量效应性T淋巴细胞的产生,从而达到防止急性排斥反应发生的目的。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6小鼠和DBA/2小鼠,6-8 wk龄,SPF级,♂,购自维通利华公司,普通饲料喂养,自由进食水。质粒pSport 1-mCD274购自ATCC(美国标准生物物品收藏中心)。pShuttle-GFP-CMV(-)和pAdxsi质粒以及DH5α菌株超级化学感受态购自北京诺赛基因组研究中心有限公司。限制性内切酶*I-ceu* I, *I-sce* I, *Xho* I, *Kpn* I, *Bgl* II购自New England Biolabs公司, CIP酶(Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal)购自Promega公司, DNA聚合酶为pfx DNA polymerase购自Invitrogen公司, T4 DNA连接酶购自New England Biolabs公司,小提质粒试剂盒购自安徽优品公司,凝胶回收试剂盒购自天根生化公司。重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自PeproTech公司, LPS和丝裂霉素C购自Sigma公司,胎牛血清和RPMI 1640培养基购自Hyclone公司。PE-抗小鼠CD11c, PE-抗小鼠TER119, PE-抗小鼠Gr1, PE-抗小鼠B220 mAb购自eBioscience公司。Anti-PE MicroBead购自美天尼公司。CFSE购自美国Molecular Probes公司。

1.2 方法 *Bgl* II和*Kpn* I分别双酶切腺病毒穿梭质粒pShuttle-GFP-CMV(-)和pSPORT1-PD-L1,凝胶回收线性化的pShuttle-GFP-CMV(-)和PD-L1片段,高效连接液连接(22℃, 3 h),转化DH5α感受态细菌,在卡那霉素抗性的LB平板上培养过夜,挑选转化的菌落,提取质粒, *Bgl* II和*Kpn* I双酶切筛选并鉴定阳性克隆,同时送检北京诺赛基因组研究中心有限公司测序分析。构建腺病毒穿梭质粒pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1。另外, *I-ceu* I和*I-sce* I分别双酶切pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1和空的腺病毒骨架质粒pAdxsi,凝胶回收GFP-CMV-PD-L1表达框片段和线性化的pAdxsi,高效连接液连接(22℃, 3 h),转化DH5α感受态细菌,在氨苄青霉素抗性的LB平板上培养过夜,挑选转化的菌落,提取质粒, *Xho* I单酶切筛选并鉴定阳性克隆。构建腺病毒骨架质粒pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1。 *Pac* I线性化pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1,酶切产物转染于事先准备好的6孔板细胞中(两个孔)。在酶切的小管中,先加生理盐水200 μL,另取一个EP管加入生理盐水200 μL,同时加入转染试剂2 μL, 5

min后将两管混合, 混匀后静置15 min, 分别取200 μ L DNA和转染试剂的混合物加入六孔板细胞中(活细胞密度保证90%以上)培养孔中轻轻混合, 继续培养12 h后更换完全培养基. 13 d后直至90%以上293细胞出现细胞病变(cytopathic effect, CPE). 收集上清继续感染293细胞以扩增病毒. 重组腺病毒pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1纯化采用氯化铯密度梯度离心法. 收集后的病毒进行透析, 每次用200 \times 体积的透析Buffer, 透析3次, 间隔1 h换1次液. 透析后分装成若干小管, -80 $^{\circ}$ C保存. 取纯化后的Adxsi-GFP-mCD274病毒液10 μ L, 加pH8.0的Tris-HCl 90 μ L稀释, 以100 μ L pH8.0的Tris-HCl作为空白对照, 用分光光度计测 A_{260} 及 A_{260}/A_{280} 的值. 病毒颗粒数(VP) = (A_{260}) \times 稀释倍数 $\times 1.1 \times 10^{12}$. 采用改进的TCID50法检测病毒感染性滴度.

1.2.1 供体C57BL/6小鼠骨髓DC的分离和培养: 小鼠颈椎脱臼处死, 750 mL/L乙醇浸泡10 min, 无菌取双侧股骨和胫骨, 用RPMI 1640培养基冲洗出骨髓细胞. 离心, 弃上清后向沉淀中加入无菌Tris-NH₄Cl溶解红细胞. 过滤网, 加入MACS Buffer, 离心, 去上清, 重悬细胞沉淀成为单细胞悬液, 与PE-TER119抗体、PE-Gr1抗体、PE-B220抗体及抗-PE磁珠孵育. 4 $^{\circ}$ C反应10 min, 离心洗涤后将细胞悬液加入MS磁分离柱中并按照说明书进行分离纯化. 以含20 μ g/L GM-CSF和100 mL/L FCS的RPMI 1640将细胞悬浮后, 分至24孔细胞培养板中(0.5×10^6 /孔). 置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂中培养. 隔天半量换液, 7 d时收获细胞.

1.2.2 重组腺病毒Ad-PD-L1转染DC: 将收获的DC计数后调整为 2×10^9 /L接种于六孔细胞培养板中, 每孔加入0.5 mL. 细胞分为3组: (1)PD-L1组: RPMI 1640+重组腺病毒载体Ad-PD-L1; (2)阴性对照组: RPMI 1640+空腺病毒载体Ad-GFP; (3)空白对照组: RPMI 1640. 孔内加入腺病毒后, 每隔10-15 min摇匀1次. 2 h后, 每孔中培养液加至1.5-2 mL, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂中孵育. 培养10-16 h后, 每孔加入1 mg/L的LPS诱导DC成熟. 细胞转染48 h后, 通过荧光显微镜和流式细胞仪检测GFP, 确定细胞转染效率. 同时检测细胞凋亡情况. 重组腺病毒Ad-PD-L1转染DC后48 h, 提取各组细胞的总蛋白, 行Western blot检测各组细胞PD-L1的表达.

1.2.3 混合淋巴细胞培养反应并观察改变供体C57BL/6小鼠的DC的PD-L1表达对受体DBA/2

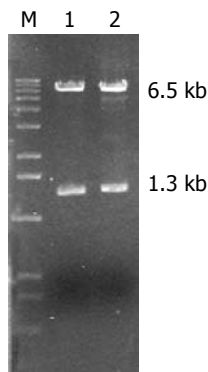


图1 pSPORT1-PD-L1质粒酶切鉴定. M: Marker(1 kb DNA ladder) 从上到下分别是: 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.6, 1 kb, 517, 396, 230 bp; 1: *EcoR* I 单酶切结果; 2: *Kpn* I + *Bgl* II 双酶切结果.

小鼠淋巴细胞激活和增殖的影响: 颈椎脱臼法处死DBA/2小鼠, 取其脾脏置于少量RPMI 1640培养液中, 研磨筛滤成单细胞悬液, 再用小鼠淋巴细胞分离液分离混合淋巴细胞, 置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂中培养4 h. 参照文献[14]的方法, 采用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对淋巴细胞进行标记. 用含100 mL/L FCS的RPMI 1640培养基悬浮细胞至 2×10^9 /L, 以100 μ L/孔加入96孔板. 收集转染了48 h的3组DC, 用25 mg/L丝裂霉素C 37 $^{\circ}$ C处理30 min, 洗涤3次作为刺激细胞, 与淋巴细胞以1:5的比例加入96孔培养板中, 每孔体积200 μ L, 每组设3个复孔. 继续培养96 h, 收集细胞, 流式细胞仪检测CFSE荧光变化.

2 结果

2.1 pSPORT1-PD-L1质粒的酶切鉴定和测序 根据pSPORT1-PD-L1质粒的图谱可知, 小鼠PD-L1基因插在*Sal* I 和*Not* I 之间, 用*EcoR* I 单酶切或*Kpn* I + *Bgl* II 双酶切, 分别可得到约6.5 kb和1.3 kb的2个片段(图1). 进行DNA双向测序, 经测序结果分析软件及同源比较分析证实, 与文献[9]报道PD-L1cDNA序列一致. 表明我们已成功获得PD-L1cDNA.

2.2 pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1穿梭质粒的构建和鉴定 将pSport1-mCD274用*Bgl* II + *Kpn* I 双酶切, 切胶回收含PD-L1基因的1.3 kb的片段, 定向插入用同样双酶切的穿梭质粒pShuttle-GFP-CMV(-), 分别提取2个阳性转化菌落质粒, 经*Bgl* II + *Kpn* I 酶切鉴定, 均得到1.3 kb和5.1 kb两个片段, 证明插入片段正确(图2), 将阳性质粒命名为pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1. 经测序证明, 与文献报道的PD-L1 cDNA序列一致, 表明构建成功.

2.3 PD-L1重组腺病毒骨架质粒的构建和鉴定 构建成功的pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1质粒经*I-Ceu* I + *I-Sce* I 双酶切, 跑胶回收2.4 kb片段. 用同样的双酶切pAdxsi载体, 将酶切处理好的载

■ 相关报道

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

■ 创新盘点

以往的研究表明,在同种异体移植中,阻断共刺激通路能够成功地诱导免疫耐受。在本研究中,作者构建了含PD-L1基因的腺病毒真核表达载体Ad-PD-L1,转染供体C57BL/6小鼠骨髓来源的mDC,增加其表面的PD-L1表达,再与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞混合培养,通过PD-1/PD-L1共刺激通路来抑制受体淋巴细胞的激活,防止大量效应性T淋巴细胞的产生,从而达到防止急性排斥反应发生的目的,国内外未见报道。

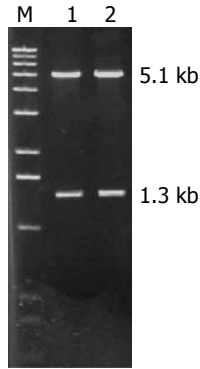


图2 *Bgl* II + *Kpn* I 酶切鉴定 pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1. M: Marker(1 kb DNA ladder), 从上到下是: 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.6, 1 kb, 517, 396, 230 bp; 1, 2: pShuttle-GFP-CMV(-)-PD-L1.

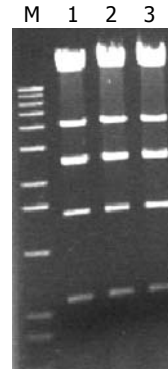


图3 *Xho* I 酶切鉴定 pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1. M: Marker(1 kb DNA ladder), 从上到下是: 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.6, 1 kb, 517, 396, 230 bp; 1-3: pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1.

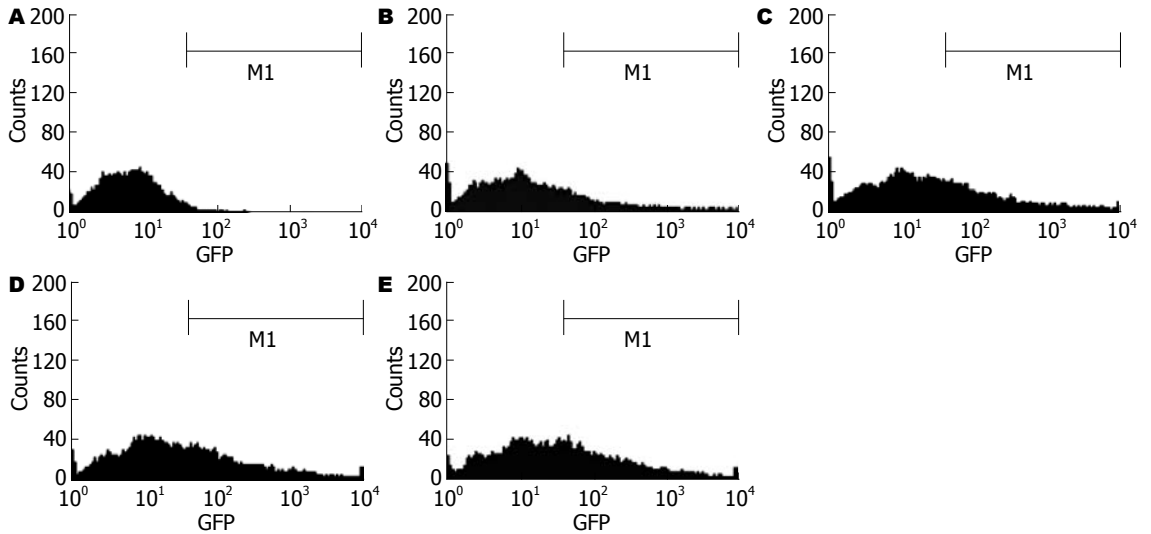


图4 不同MOI值时腺病毒载体对DC的转染效率. A: 未转染; B: MOI = 100; C: MOI = 200; D: MOI = 300; E: MOI = 400; F: MOI = 600.

体片段和插入片段进行连接,转化感受态细胞DH5a菌株,提取3个阳性转化菌落质粒,经*Xho* I 酶切后分别可见14, 11.8, 4, 2.6, 2.47, 1.45, 0.6 kb 7条带(图3),证明载体构建成功.得到最终所需要的腺病毒骨架质粒将其命名为pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1.

2.4 重组腺病毒滴度测定 A_{260}/A_{280} 的正常范围: 1.20-1.30. 检测结果为1.28符合正常范围.测得 A_{260} 为0.595, 体积2 mL. 总病毒颗粒数为: $0.595 \times 10 \times 1.1 \times 10^{12} \times 2 = 1.3 \times 10^{13}$ VP, 感染性滴度测定结果为 2×10^{14} PFU/L.

2.5 最适MOI值的确定 根据六孔培养板中DC数,按照MOI = 100, 200, 400, 600分别加入不同量的腺病毒载体,综合细胞转染效率(分别为22.8%, 30.8%, 36.1%, 40.2%, 图4)以及转染后细胞凋亡比例(分别为2.26%, 4.68%, 5.39%, 10.9%, 图5)选择最适MOI值,最终选择MOI = 400进行转染.

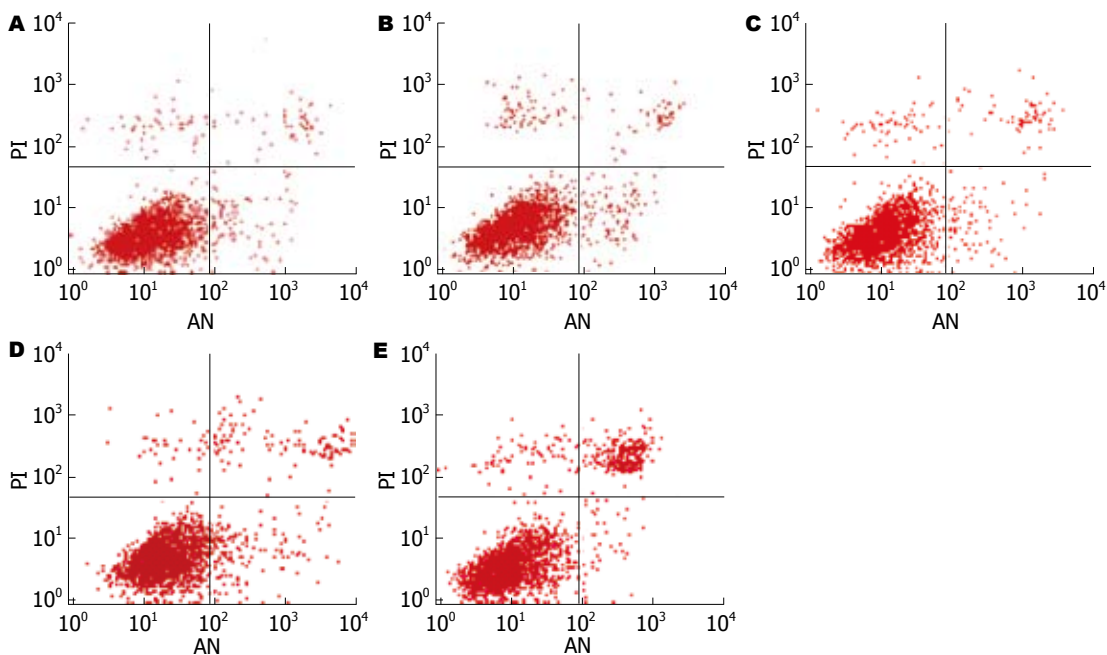
2.6 pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1腺病毒感染DC的鉴定 荧光显微镜下观察,在绿色荧光激发通道

GFP受激发,转染了腺病毒载体的DC发出明亮的绿色荧光(图6). pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1重组腺病毒感染后用Western blot检测表明:供体C57BL/6小鼠DC的PD-L1表达比对照组升高了37% ($P < 0.05$, 图7).

2.7 转染了重组腺病毒Ad-PD-L1的供体C57BL/6小鼠DC对受体DBA/2小鼠淋巴细胞激活和增殖的影响 重组腺病毒Ad-PD-L1转染的供体C57BL/6小鼠的DC与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞进行混合培养后,明显抑制了受体淋巴细胞的增殖和活化.与对照组相比,PD-L1表达升高后,受体DBA/2小鼠的淋巴细胞增殖降低了41% ($P < 0.01$, 图8).

3 讨论

PD-L1分子是B7超家族的一员,主要表达于抗原呈递细胞如树突状细胞(DC),其受体PD-1主要在活化的T淋巴细胞, B细胞、髓系细胞和胸腺细胞中表达. PD-L1和PD-1的结合可以抑制T细胞受体介导的T细胞增殖和细胞因子的分泌,



应用要点
本研究成功构建了含小鼠PD-L1基因的重组腺病毒载体, 并采用重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体C57BL/6小鼠树突状细胞, 通过共刺激通路PD-1/PD-L1抑制了受体淋巴细胞的激活, 为进一步的体内诱导特异性免疫耐受以及将来的临床应用打下了基础。

图 5 不同MOI值腺病毒载体转染后DC凋亡情况. A: 未转染; B: MOI = 100; C: MOI = 200; D: MOI = 300; E: MOI = 400; F: MOI = 600.

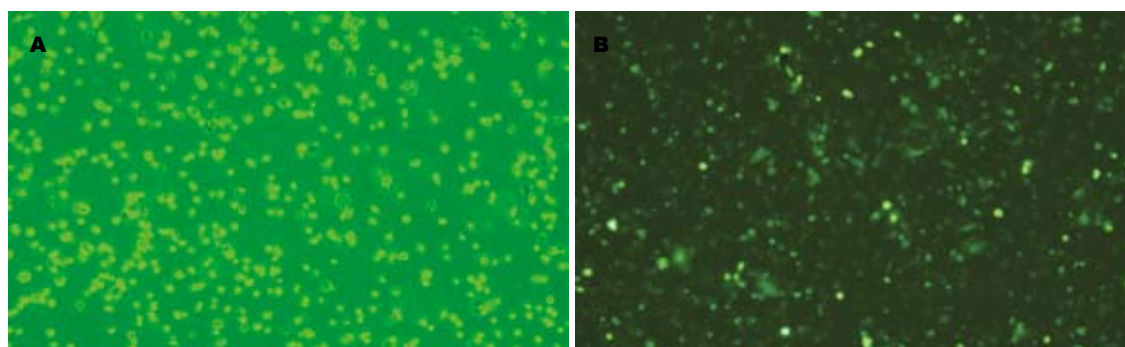


图 6 转染了重组腺病毒载体后的小鼠骨髓DC(荧光显微镜, ×100). A: 倒置显微镜; B: 荧光显微镜.

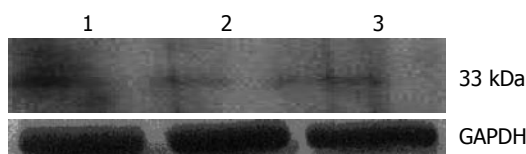


图 7 pAdxsi-GFP-CMV-PD-L1重组腺病毒感染的小鼠骨髓DC. 1: PD-L1组; 2: 空载体组; 3: 对照组.

是T细胞活化的负性调控信号^[14-18]. 目前已经有研究证实, 靶向给予PD-L1-Ig明显抑制心脏移植物的排斥反应, 提高移植物的存活率^[19]. 表明通过PD-L1/PD-1共刺激信号可以降低T细胞介导的免疫应答, 从而诱导免疫耐受. 在未成熟树突状细胞(imature DC, iDC)上由于B7分子表达相对较低, PD-L1的表达相对较高, 因此导致PD-L1/PD-1信号通路在iDC上发挥着重要作用. 即可产生对T细胞的抑制效应. 而成熟树突状细胞(mature DC, mDC)上由于B7和MHC分子呈高

表达, 在此情况下PD-L1/PD-1信号通路的抑制功能受到削弱, 导致刺激因子与抑制因子的平衡趋向于刺激效应, 从而使T细胞活化和增殖^[20]. 在本研究中, 我们构建了含PD-L1基因的腺病毒真核表达载体Ad-PD-L1, 转染供体C57BL/6小鼠骨髓来源的mDC, 增加其表面的PD-L1表达, 再与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞混合培养, 通过PD-1/PD-L1共刺激通路来抑制受体淋巴细胞的激活, 防止大量效应性T淋巴细胞的产生, 从而达到防止急性排斥反应发生的目的. 我们发现, 腺病毒载体Ad-PD-L1转染供体C57BL/6小鼠的mDC后其PD-L1的表达升高了37%($P < 0.05$), 将转染了PD-L1的DC与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞进行共培养. 与对照组相比, PD-L1表达升高后, 明显地抑制了淋巴细胞的增殖和活化. 受体DBA/2小鼠的淋巴细胞增殖降低了41%($P < 0.01$).

■名词解释

活体染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE): CFSE是一种带负电荷并具有强荧光的可穿过细胞膜的荧光染料, CFSE进入细胞后可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上. 当细胞分裂时, CFSE标记荧光可平均分配到两个子代细胞中, 因此在一个增殖的细胞群中, 各连续传代细胞以亲代细胞荧光强度的一半而递减为特征, 并可以利用流式细胞术在488 nm激发光下进行分析. 追踪器官移植中免疫细胞的活化、分裂、增殖、凋亡一直是移植免疫研究的重点, 在CFSE标记技术出现之前, 免疫细胞的研究主要是依靠³H-TdR掺入法和MTT法. 这两种方法只能在群体水平上检测细胞增殖, 并且只能局限于体外实验, 而CFSE标记技术能检测免疫反应的动态变化, 体内或体外追踪某个细胞亚群甚至单个细胞的分裂增殖, 为免疫细胞的增殖分析提供了更加全面的资料.

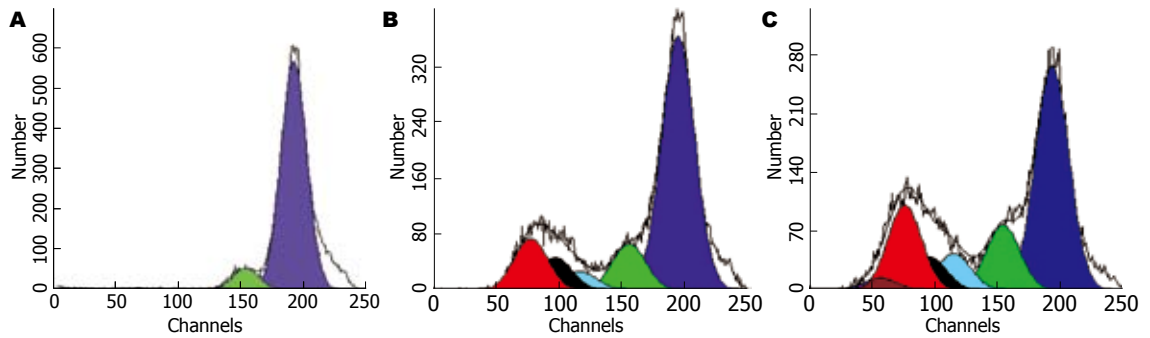


图8 流式细胞仪检测受体DBA/2小鼠淋巴细胞的增殖. A: Ad-PD-L1转染组: 未分裂细胞占89.7%; B: 空载体转染组: 未分裂细胞占62.8%; C: 对照组: 未分裂细胞占48.6%.

为了确保对DC的转染效率, 我们采用了腺病毒作为运载工具. 重组腺病毒载体以其高效转染性与安全性, 成为目前应用最广泛的基因工程载体^[21]. 他的宿主范围广, 且既能感染处于分裂增殖期的细胞, 又能感染静止期的细胞. 而且缺陷型重组腺病毒载体由于不整合入细胞染色体基因组, 从而具有毒性低和安全性高的优点, 另外还具有病毒滴度高和装载容量大等特点^[22]. 我们所使用的Adxsi载体系统又具有一些独特的优点: (1)*I-Ceu I* 和 *I-Sce I* 是属于内含子编码的归位内切酶, 能识别较长的非回文序列, 在人和小鼠的基因组内几乎没有出现. 而且用这两个酶一起使用, 在后续的连接效率会很高, 避免了同源重组方案(如Adeasy系统)的重组效率低以及非特异重组等缺点. (2)采用氯化铯密度梯度超速离心法可保证有活性的病毒比率提高, VP:PFU的比值为32, 而一般的阴离子交换柱的方法纯化的腺病毒的VP:PFU比值在50-100之间. 本实验所构建的腺病毒载体中带有绿色荧光蛋白基因, 通过GFP的表达可确定该病毒载体对树突细胞的转染效率, 同时我们还检测了不同MOI值感染DC后其凋亡情况. 我们发现随着病毒量的增加即复感染指数(MOI)的增大转染效率也随之增大. 但当MOI为600时, 凋亡DC的比率明显增加. 因此, 我们采用MOI值400对DC进行转染. 重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体C57BL/6小鼠的DC后, 与受体DBA/2小鼠的淋巴细胞进行混合培养. 检测受体小鼠淋巴细胞的增殖, 我们采用了活体染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidylester, CFSE), CFSE是一种带负电荷并具有强荧光的可穿过细胞膜的荧光染料, CFSE进入细胞后可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上. 当细胞分裂时, CFSE标记荧光可平均分配到两个子代细胞中, 因此

在一个增殖的细胞群中, 各连续传代细胞以亲代细胞荧光强度的一半而递减为特征, 并可以利用流式细胞术在488 nm激发光下进行分析^[23]. 追踪器官移植中免疫细胞的活化、分裂、增殖、凋亡一直是移植免疫研究的重点, 在CFSE标记技术出现之前, 免疫细胞的研究主要是依靠³H-TdR掺入法和MTT法. 这两种方法只能在群体水平上检测细胞增殖, 并且只能局限于体外实验, 而CFSE标记技术能检测免疫反应的动态变化, 体内或体外追踪某个细胞亚群甚至单个细胞的分裂增殖, 为免疫细胞的增殖分析提供了更加全面的资料.

总之, 我们成功构建了含小鼠PD-L1基因的重组腺病毒载体, 并采用重组腺病毒Ad-PD-L1转染供体C57BL/6小鼠树突细胞, 通过共刺激通路PD-1/PD-L1抑制了受体淋巴细胞的激活. 为进一步的体内免疫耐受实验打下了良好的基础.

4 参考文献

- 1 Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* 2006; 25: 2623-2633
- 2 Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005; 6: 223
- 3 Snaoudj R, de Préneuf H, Créput C, Arzouk N, Derouere B, Beaudreuil S, Durrbach A, Charpentier B. Costimulation blockade and its possible future use in clinical transplantation. *Transpl Int* 2006; 19: 693-704
- 4 Koga N, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Onai Y, Futamatsu H, Maejima Y, Gotoh R, Saiki H, Tsushima F, Azuma M, Isobe M. Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2057-2062
- 5 Cai G, Karni A, Oliveira EM, Weiner HL, Hafler DA, Freeman GJ. PD-1 ligands, negative regulators for activation of naive, memory, and recently activated human CD4+ T cells. *Cell Immunol* 2004;

- 230: 89-98
- 6 Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5094-5100
 - 7 Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003; 198: 39-50
 - 8 Liang SC, Latchman YE, Buhmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, Sharpe AH. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2706-2716
 - 9 Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10691-10696
 - 10 Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 155: 172-182
 - 11 Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2: 203-209
 - 12 Truong W, Hancock WW, Anderson CC, Merani S, Shapiro AM. Coinhibitory T-cell signaling in islet allograft rejection and tolerance. *Cell Transplant* 2006; 15: 105-119
 - 13 Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800
 - 14 Fulcher D, Wong S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 559-564
 - 15 Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, Zlabinger G, Steinberger P, Pickl WF, Stockinger H, Knapp W, Stöckl J. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol* 2003; 170: 3637-3644
 - 16 Liu X, Gao JX, Wen J, Yin L, Li O, Zuo T, Gajewski TF, Fu YX, Zheng P, Liu Y. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* 2003; 197: 1721-1730
 - 17 Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JM, Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 2004; 20: 327-336
 - 18 Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 2002; 168: 1627-1635
 - 19 Ozkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O'Keefe T, Duong T, Smith T, Gutierrez-Ramos JC, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol* 2002; 169: 6546-6553
 - 20 Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170: 1257-1266
 - 21 Rouard H, Léon A, Klonjowski B, Marquet J, Tennezé L, Plonquet A, Agrawal SG, Abastado JP, Eloit M, Farcet JP, Delfau-Larue MH. Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* 2000; 241: 69-81
 - 22 Efrat S, Fejer G, Brownlee M, Horwitz MS. Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6947-6951
 - 23 Angulo R, Fulcher DA. Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry* 1998; 34: 143-151

■同行评价

本实验设计合理, 科学性较强. 数据可信, 结论可靠. 对移植免疫耐受的理论研究和临床研究具有很好的价值.

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 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-18)

食管鳞癌肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶1的鉴定

高红军, 周兰萍, 毛友生, 王伟, 乔媛媛, 刘芳, 蔡毅然, 赵晓航

■背景资料

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一, 居我国恶性肿瘤死亡第4位。5年生存率只有25%-30%, 如果早期发现, 及时治疗, 5年生存率可达70%以上。因而, 早期发现, 早期治疗是提高食管癌治愈率、改善疗效的关键。20世纪70年代发现肿瘤患者体内可以检测到自身抗体和(或)自身反应性T淋巴细胞, 证实了肿瘤抗原的存在。

高红军, 周兰萍, 刘芳, 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
毛友生, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院胸外科北京市100021
王伟, 中国人民解放军海军总医院胸外科北京市100037
乔媛媛, 赵晓航, 中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心北京市100037
蔡毅然, 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
高红军, 博士, 主要从事食管癌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. 2006AA02Z19B, No. 2006AA02Z341, No. 2006AA02A403
国家重点基础研究发展计划“973”资助项目, No. 2004CB518707
教育部博士点专项基金资助项目, No. 20060023010
作者贡献分布: 主要实验、数据分析和文章起草由高红军完成; 病例选择、样本取材、临床资料整理和细胞培养由周兰萍、毛友生、王伟及乔媛媛完成; 免疫组化分析和评分由刘芳与蔡毅然完成; 课题设计、文章修改和审阅由赵晓航完成。
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。zhaohx@cicams.ac.cn
电话: 010-67709015 传真: 010-87778360
收稿日期: 2008-03-28 修回日期: 2008-05-19

Phosphoglycerate kinase 1 as a candidate of tumor-associated antigen identified from esophageal squamous cell carcinoma

Hong-Jun Gao, Lan-Ping Zhou, You-Sheng Mao, Wei Wang, Yuan-Yuan Qiao, Fang Liu, Yi-Ran Cai, Xiao-Hang Zhao

Hong-Jun Gao, Lan-Ping Zhou, Fang Liu, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

You-Sheng Mao, Department of Thoracic Surgery, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Wei Wang, Department of Thoracic Surgery, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Yuan-Yuan Qiao, Xiao-Hang Zhao, Center for Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Yi-Ran Cai, Department of Pathology, 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 and No. 30721001; National High-Tech R & D Program of China (863), No. 2006AA02Z19B, No. 2006AA02Z341 and No. 2006AA02A403; State Key Development Program for Basic Research of China (973), No. 2004CB518707; and the

■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

Doctoral Fund from Ministry of Education of China, No. 20060023010

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. zhaohx@cicams.ac.cn
Received: 2008-03-28 Revised: 2008-05-19

Abstract

AIM: To investigate and identify novel tumor-associated antigens in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Modified serological proteome analysis (mSERPA) strategy was used to separate and identify the candidate proteins. The subcellular protein fractions (cytosolic, membrane and nuclear fractions) of ESCC cell lines and EC0156 cells were extracted first and then cytosolic proteins were separated using SDS-PAGE. The separated proteins were incubated with different serum of ESCC patients (29 cases) or healthy controls (28 cases) respectively, and then one of the positive bands in 43 kDa was excised followed by in-gel tryptic digestion. Separated peptides were identified using a high definition mass spectrometry (HDMS). Western blot and immunohistochemical staining (IHC) were used to validate possible candidates.

RESULTS: Successful compartmental protein extraction was demonstrated by specific organelle markers. Serum samples of ESCC patients bound EC0156 cytoplasmic protein, suggesting selective recognition of tumor-associated antigen. 43 kDa protein band showed significantly higher positive binding rate with serum of ESCC patients (41.4%, 12/29) than with serum of healthy individuals (3.6%, 1/28). Five high-confidence proteins were identified from the 43 kDa band using HDMS including phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), β -actin, proteasome 26S subunit, S-adenosylhomocysteine hydrolase and phosphoribosylaminoimidazole carboxylase. Immunohistochemistry. Western blot analysis showed that PGK1 was located in both cytoplasm and nucleus, and had a higher expression in cancer tissues (69.23%, 18/26) than in normal esophageal epithelia.

CONCLUSION: The mSERPA strategy is useful for tumor-associated antigen identification. As a new candidate of tumor-associated antigen, PGK1 was over-expressed in ESCC which may play a role in tumorigenesis of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Tumor-associated antigen; Phosphoglycerate kinase 1

Gao HJ, Zhou LP, Mao YS, Wang W, Qiao YY, Liu F, Cai YR, Zhao XH. Phosphoglycerate kinase 1 as a candidate of tumor-associated antigen identified from esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17):1866-1872

摘要

目的: 鉴定新的食管鳞癌肿瘤相关抗原。

方法: 食管癌EC0156细胞总蛋白先经亚组分预分离,有效富集胞质、胞膜和胞核等组分蛋白;胞质组分蛋白经SDS-PAGE分离后分别与食管癌患者血清或健康志愿者血清共孵育,分离血清结合蛋白条带;胶内酶解阳性蛋白条带,肽段经色谱分离后用Synapt™ HDMS质谱鉴定。候选蛋白进一步Western blot经免疫组化验证。

结果: 总蛋白经亚组分分离后,不同组分蛋白均得到有效富集。食管癌患者血清能与EC0156细胞胞质蛋白结合,即选择性识别肿瘤相关抗原。其中,43 kDa蛋白条带与食管癌血清(41.4%, 12/29)和对照(3.6%, 1/28)结合阳性率具有明显差异。从该蛋白条带中共鉴定到磷酸甘油酸激酶、 β -actin、蛋白酶体26 S亚基、S-腺苷高半胱氨酸水解酶和磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶5个高可信度蛋白。磷酸甘油酸激酶(PGK1)定位于胞质和胞核,在食管癌组织中高表达(69.23%, 18/26)。

结论: 改良血清蛋白质组分析策略(mSERPA)可有效分离鉴定肿瘤相关抗原。PGK1是食管癌候选肿瘤相关抗原,在食管癌发生发展中可能发挥重要作用。

关键词: 食管鳞癌; 肿瘤相关抗原; 磷酸甘油酸激酶1

高红军, 周兰萍, 毛友生, 王伟, 乔媛媛, 刘芳, 蔡毅然, 赵晓航. 食管鳞癌肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶1的鉴定. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1866-1872
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1866.asp

0 引言

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一,居恶性肿瘤

死亡率第四位。5年生存率只有25%-30%,如果早期发现,及时治疗,5年生存率可达70%以上^[1]。因而,早期发现,早期治疗是提高食管癌治愈率、改善疗效的关键。在我国食管癌的主要组织学类型是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。

食管癌缺乏特异血清学标志。目前,食管癌相关血清标志有癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA),细胞角蛋白片段19(cytokeratin 19 fragments, CYFRA 21-1)和鳞状细胞癌相关抗原(squamous cell carcinoma associated antigen, SCC antigen)。但是,这些标志诊断食管癌的敏感度仅为17%, 43.9%和26.8%,效果不理想,不能满足临床诊断需要^[2]。20世纪70年代发现肿瘤患者体内可以检测到自身抗体和/或自身反应性T淋巴细胞,由此表明肿瘤存在自身抗原^[3]。疾病自身抗原的分离鉴定对研究自身免疫病,肿瘤的发生机制,机体免疫功能与疾病发生发展和转归的相互关系至关重要。同时,也是发展有效疫苗、诊断试剂、治疗性抗体,及其筛选有效药物靶标的重要前提^[4]。

Prasannan *et al*于2000年报道了一种称为血清蛋白质组分析(serological proteome analysis, SERPA)的分离鉴定自身抗原的方法^[5]。以蛋白质二维电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和免疫印记分析(Western blot)为基础,联合蛋白谱鉴定筛选自身抗原。与常用血清自身抗原筛选方法,即重组cDNA表达文库血清学分析方法(serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)^[4,6-8]相比, SERPA主要优点是避免了构建cDNA文库和预杂交消除非特异性结合的步骤,所用时间短;系统保持着蛋白质的转录后修饰,可以更好地展现抗原决定簇。目前已有一些用SERPA技术筛选自身抗原的相关研究^[5,9-19]。SERPA的主要不足是,工作量大、由2-DE本身的一些缺陷如分离极酸、极碱蛋白和水溶性差的膜蛋白能力有限,只能鉴定丰度相对较高的抗原,灵敏度有限等。

为避免SERPA技术的缺陷,提高低丰度抗原鉴定的可能性,避免血清污染与肿瘤异质性,本研究采用改良SERPA法(modified serological proteome analysis, mSERPA),即以食管癌细胞亚细胞蛋白组份为抗原,经一维SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后以食管癌患者和健康对照血清为一抗进行免疫印记分

■ 研究前沿

分离鉴定肿瘤相关抗原及其自身抗体是肿瘤标志研究的热点。血清蛋白质组分析(SERPA)是分离鉴定自身抗原的重要技术策略之一,以蛋白质二维电泳(2-DE)和免疫印记(Western blot)分析为基础,联合谱鉴定筛选自身抗原,其主要缺点是工作量大、分离极酸、极碱蛋白和水溶性差的膜蛋白受限,灵敏度较低。

■相关报道

Pereira-Faca *et al* 在《癌症研究》杂志上发表了一篇鉴定肺癌肿瘤相关抗原的文章。该文章应用混合的细胞系蛋白作为抗原来源,血清筛选前对细胞蛋白组份做了预分离,降低蛋白的复杂性。鉴定到肺癌的肿瘤相关抗原 14-3-3 theta, 联合 annexin 1 预测出 55%(10/18) 的受试者具有发生肺癌的风险。

析,筛选具有特异性信号的蛋白条带,后者经酶解、质谱鉴定分离肿瘤自身抗原,进一步经大样本免疫组织化学验证。用mSERPA技术分离鉴定了食管鳞癌血清肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源:采集中国医学科学院肿瘤医院和中国人民解放军海军总医院胸外科2004-10/2007-04接受单纯手术治疗的29例食管鳞癌患者术前静脉血和26例配对食管鳞癌新鲜组织标本。28例健康志愿者清晨空腹外周血。其中,食管癌病例包括24例男性和5例女性,年龄范围41-73岁,平均年龄59岁,中位年龄58岁;健康志愿者包括20例男性和8例女性,年龄范围40-70岁,平均年龄55岁,中位年龄54岁。健康志愿者均经系统健康体检,无上消化道相关疾病史和恶性肿瘤家族史。所有病例取材得到知情同意,术前未行放疗或化疗。

另外26例(与29例血清标本不是一组病例)新鲜组织标本一经分离,迅速去除坏死组织和血管等结缔组织,分别切取、分离癌和远端切缘的正常食管黏膜,放入预冷的生理盐水中,洗3-4次。称质量,分装,放入液氮速冻后转入-80℃冰箱保存。用于免疫组化分析的经40 g/L甲醛固定后石蜡包埋。

1.1.2 细胞培养:人食管鳞癌细胞系ECO156由本实验室建系^[20],细胞培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基,在37℃、50 mL/L CO₂条件下培养。

1.1.3 主要试剂:DMEM培养基购自Gibco/BRL公司;丙烯酰胺、N,N'甲叉双丙烯酰胺购自BBI公司;四甲基乙二胺、过硫酸铵购自Sigma公司;胰酶购自Promega公司;乙腈、HPLC超纯水购自Agilent公司;亮氨酸、抑酞酶购自Fluka公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自Amersham Pharmacia Biotech公司;Aprotinin购自Roche公司;Coomassie Plus Protein Assay蛋白定量试剂盒购自Pierce公司;ProteoExtract™亚细胞蛋白组份提取试剂盒购自Merck公司;S-P试剂盒购自迈新公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗人、抗兔和抗鼠二抗、兔抗山羊二抗和DAB试剂盒购自中杉金桥公司;兔抗人PGK1抗体购自Abnova公司;小鼠抗人α-tubulin抗体,山羊抗人AIF抗体,兔抗人GLI-1抗体和ECL试剂盒购自

Santa Cruz公司;真空无抗凝剂采血管购自BD公司。

1.2 方法

1.2.1 血清分离:清晨空腹抽取肘静脉血约4 mL,放入4℃冰箱保存,30 min后4℃ 1500 r/min离心10 min,小心吸取上清转入2 mL离心管中,10 000 g,4℃离心15 min,将同一例样品的血清混合后分装于0.5 mL离心管中,迅速至于干冰中,后转入-80℃冰箱保存。处理过程在4 h内完成。应用时所有样本冻融≤2次。

1.2.2 细胞系亚细胞蛋白组份提取:培养的ECO156细胞待长满培养皿的80%-90%时,用4℃预冷的PBS缓冲液漂洗3次,用ProteoExtract亚细胞蛋白提取试剂盒按说明书操作步骤将ECO156细胞裂解蛋白分成胞质、胞膜系统和细胞核等三个亚组份蛋白,分别蛋白定量后分装冻存。

1.2.3 Western blot分析:(1)肿瘤自身抗原筛选:200 μg胞质组份蛋白样品经12%的SDS-PAGE分离以后,湿转法转印至PVDF膜上。将转印了蛋白质的PVDF膜分别切割为4 mm宽的小条,做好标记后将每个小条分别放入8通道的杂交盘中。5%的脱脂牛奶室温封闭3 h后,分别与1:200稀释的食管癌或健康对照血清(一抗)于室温孵育3 h,用洗膜液(20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 50 mmol/L NaCl; 0.1% Tween-20)洗膜,5 min×6次;与辣根过氧化物酶标记的山羊抗人(1:3000)二抗室温孵育1 h。再经TBST溶液洗膜,5 min×6次后ECL化学发光检测。作用3 min左右,暗室曝光。结果经ChampGel 3000(Sage Creation公司)灰度扫描。(2)亚组份蛋白分离效果检测:15 μg不同组份蛋白上样,以120 g/L SDS-PAGE分离,转膜后分别与抗α-tubulin(1:200)、AIF(1:2000)和GLI-1(1:200)室温孵育3 h。洗膜后分别对应二抗(1:3000稀释)孵育后曝光。(3)PGK1在ECO156亚细胞组分中的表达:15 μg总蛋白以120 g/L SDS-PAGE分离,转膜后分别与抗人PGK1抗体(1:200)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗(1:3000)检测PGK1在不同亚细胞组份中的表达。

1.2.4 蛋白酶解和质谱鉴定:切取目的条带经胰酶酶解^[21-22]、反相色谱分离,肽段经Synapt® HDMS(ESI-Q-TOF MS)质谱分析,用Mascot搜索引擎搜索NCBI数据库,获知氨基酸序列。

1.2.5 免疫组织化学染色及其结果评分:包含癌和癌旁正常上皮的组织切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化后,浸入3%的H₂O₂中10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。切片经PBS冲洗后,将

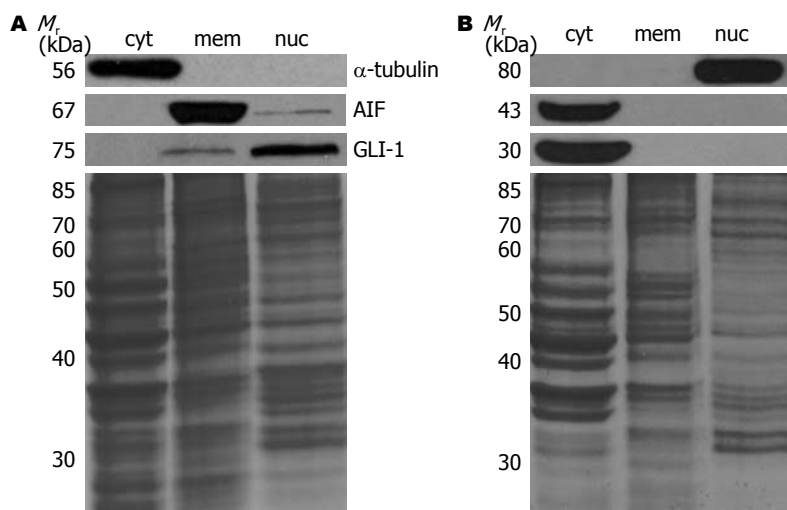


图1 亚细胞组份蛋白富集与定位的Western blot分析. A: EC0156细胞亚细胞组份蛋白富集效果, 其中cyt、mem和nuc分别表示胞质、膜系统和细胞核组份蛋白; B: PGK1在EC0156亚细胞蛋白组份中的表达. 下图为对应上图的上样量对照(考马斯亮兰染色SDS-PAGE凝胶).

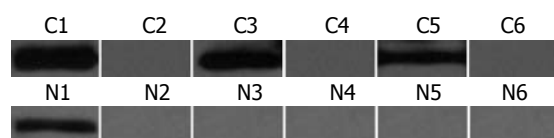


图2 食管癌血清与EC0156胞质蛋白的Western blot分析. EC0156胞质蛋白经SDS-PAGE分离后转到PVDF膜上, 分别以食管癌血清和健康对照血清为一抗进行Western blot分析. C1-C6表示不同食管癌血清的Western blot结果, N1-N6表示不同健康对照血清的Western blot结果.

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PGK1 mAb(1:50稀释), 4℃孵育过夜. 阴性对照采用小鼠的非免疫血清替代. 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、二甲苯透明后, 中性树脂封片.

结果用以下标准评价表达程度, 包括染色强度和观察结果评分. 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). 着色强度评分和观察结果评分的乘积为表达程度, 表达增强(9-12分)、表达减弱(5-8分)、明显减弱(0-4分). 本研究以胞质出现均匀分布的棕黄色颗粒和表达强度综合得分>4分为表达阳性.

2 结果

2.1 亚细胞组份蛋白富集效果评价 食管鳞癌细

胞EC0156总蛋白经分步提取后, 分别用Western blot检测细胞质、胞膜和细胞核等标志分子在不同组份中的表达情况. 结果表明(图1A), 胞质蛋白标志分子管蛋白(α -tubulin)^[23]仅在胞质蛋白组份中被检测到; 细胞质膜系统蛋白标志分子凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)^[24-25]主要出现在膜组份, 同时在细胞核组份也有少量表达; 细胞核标志分子胶质瘤相关癌基因同源蛋白1(glioma-associated oncogene homolog 1, GLI-1)^[26-27]主要出现在细胞核组份中, 膜组份蛋白中也有少量表达. 结果表明, 经过蛋白预处理后, 不同细胞亚组份蛋白均得到了有效富集.

2.2 胞质组份蛋白肿瘤相关抗原的筛选 EC0156细胞胞质组份蛋白经一维SDS-PAGE分离、转膜后, 分别与29例食管癌患者和28例健康对照血清进行Western blot分析. 结果发现, 食管癌患者血清能与部分肿瘤细胞胞质组份蛋白产生免疫印迹反应而与正常对照血清形成明显差异, 其中之一是分子质量为43 kDa的蛋白. 该蛋白与41.4%(12/29)的食管癌血清呈阳性反应, 仅与3.6%(1/28)的对照血清呈较弱结合, 可能为食管癌候选的肿瘤相关抗原(图2).

2.3 分子质量43 kDa候选蛋白的质谱鉴定 食管癌EC0156细胞胞质组份蛋白经一维SDS-PAGE分离, 考马斯亮兰染色, 切取分子质量大约为43 kDa的蛋白条带. 将蛋白经胰蛋白酶酶解后, 提取的肽段再经Synapt[®]HDMS质谱(Waters公司)鉴定. 所得数据用Mascot搜索引擎搜索NCBI数据库. 共计检索到5个高可信度的蛋白(Mascot score>30)按照得分由高到低依次为磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)、 β -actin、蛋白酶体26s亚基(protea-

■创新盘点

为避免SERPA的缺陷, 提高低丰度抗原鉴定的可能性, 本研究采用改良SERPA法(mSERPA), 以食管癌细胞亚细胞蛋白组份为抗原, 经一维SDS-PAGE分离后以食管癌患者和健康对照血清为一抗进行免疫印记分析, 筛选具有特异信号的蛋白条带, 并经质谱鉴定肿瘤自身抗原. 用mSERPA技术分离鉴定了食管鳞癌相关抗原磷酸甘油酸激酶(PGK1).

■名词解释

肿瘤相关抗原(TAA):指肿瘤和相应正常细胞均表达,但是含量在细胞癌变时明显增高的抗原.此类抗原只表现出量的变化而无严格肿瘤特异性.

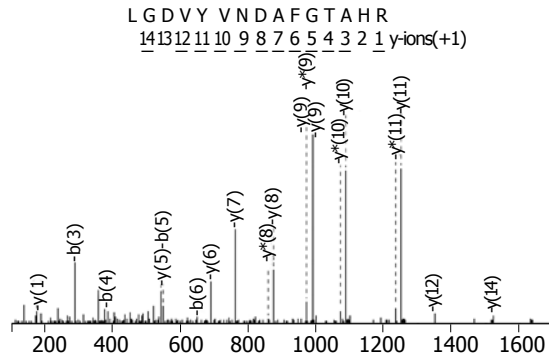


图3 PGK1的HDMS质谱鉴定结果. PGK1峰质量为817.9的肽片段经HDMS解析的氨基酸序列为LGDVYVND AFGTAHR.

some 26S subunit), S-腺苷高半胱氨酸水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase)和磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase). 选取PGK1做进一步验证, PGK1的质谱鉴定结果如图3所示.

2.4 PGK1在食管癌不同亚细胞组份中的Western blot分析 食管鳞癌EC0156细胞胞质、细胞膜系统和胞核等亚细胞组份蛋白经SDS-PAGE分离、转膜后分别与抗PGK1抗体孵育,检测PGK1在不同亚细胞组份蛋白中得的表达. 结果发现PGK1主要表达于胞质和细胞核组份,细胞核组份中PGK1为分子质量80 kDa蛋白,胞质组份表现为43 kDa和30 kDa的异构体,细胞膜系统未检测到PGK1的表达(图1B).

2.5 PGK1在食管癌组织和癌旁食管上皮的表达 用免疫组化的方法检测了PGK1在26对配对食管癌组织和癌旁食管上皮中的表达(图4). 其中高分化食管癌14例,中分化食管癌8例,低分化食管癌4例. 结果表明PGK1在78.57%高分化(11/14)、50%中分化(4/8)和75%低分化(3/4)食管癌组织中表达明显升高. 与正常食管上皮相比,食管癌中PGK1表达阳性率为69.23%(18/26),正常食管上皮组织PGK1表达率为7.7%(2/26).

3 讨论

分离鉴定肿瘤相关抗原(tumor associated antigens, TAAs)有可能发现新的辅助早诊,预后判断和疗效监测的候选肿瘤标志. 本研究通过先行分离食管癌EC0516细胞胞质、膜系统和细胞核等不同细胞亚组份蛋白,使目的蛋白得到富集并经SDS-PAGE分离后,与食管癌患者和健康对照血清杂交,筛选并获得特异性结合蛋白即肿瘤自身抗原PGK1. Pereira-Faca等曾用类似策略鉴定了肺癌相关抗原14-3-3 theta^[28].

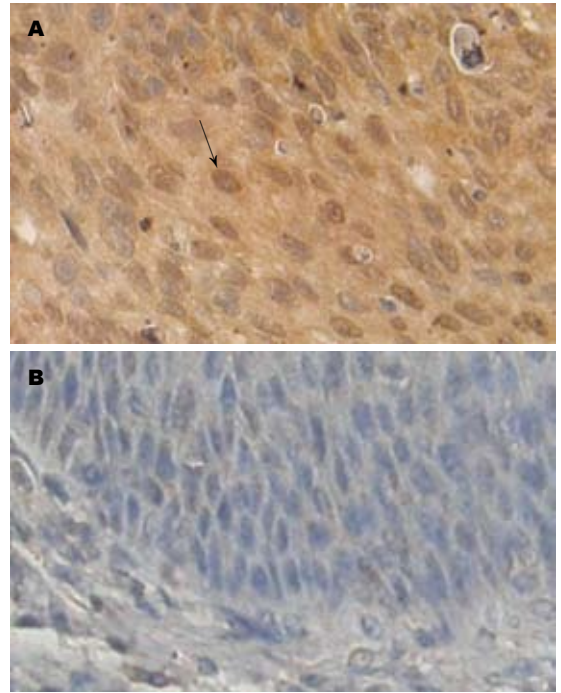


图4 PGK1在不同食管癌组织和配对癌旁正常上皮的表达. A: 食管癌组织; B: 正常食管上皮($\times 200$). 箭头所指细胞为PGK1表达阳性细胞,可见胞质和胞核均表达PGK1.

磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK)是糖酵解的关键酶,存在于所有生物体并在进化中高度保守,该酶缺乏可引起生物体代谢紊乱. PGK是单体的、高度柔曲性的糖酵解酶,主要由两个球形结构域构成,在与底物结合过程中发生显著的构象改变,产生催化效应.多数生物体内含2-3种PGK同工酶,他们在生物体内分布不一,具有独特的生物学功能^[29]. PGK1是一种分泌型糖酵解酶,催化1, 3-二磷酸甘油酸1位碳上的高能磷酸基团转移到ADP分子上形成ATP^[30]. 目前报道了13个PGK1突变体,均为单个氨基酸突变或缺失^[31]. PGK基因突变可导致许多疾病,最常见的是慢性贫血,如遗传性球形红细胞溶血性贫血,同时可伴有智力减退、神经功能的紊乱和肌肉病变^[32]. 近期研究表明PGK1也与肿瘤发生发展密切相关^[33-34]. PGK1在70%胰腺导管腺癌($n = 63$)和胰腺癌患者血清高表达^[35]. Shichijo *et al*通过筛选结肠癌患者的肿瘤浸润淋巴细胞以发现肿瘤相关抗原、HLA-A2限制性和肿瘤反应性细胞毒性T细胞,发现PGK1的表位多肽很可能是HLA-A2(+)结肠癌患者特异免疫治疗的靶分子^[36]. Chen *et al*用ELISA方法检测肺癌患者血清PGK1水平,发现肺癌血清PGK1水平明显升高(91.45%, 107/117),而且PGK1表达水平与不良预后有关^[37].

Chuthapisith *et al*研究了对化疗敏感与否的

两株乳腺癌细胞系的差异蛋白谱, 发现PGK1表达与肿瘤对化疗药物敏感性有关^[38]. Wang *et al* 研究表明, PGK1是CXCL12/CXCR4信号通路的关键下游靶基因, 参与调节肿瘤血管生成而与肿瘤生长与转移密切相关^[39].

迄今, 尚无有关PGK1与食管鳞癌相关的报道. 我们的研究表明PGK1是食管癌的肿瘤相关抗原, 在部分食管癌外周血可以检测到PGK1自身抗体. 免疫组化分析结果发现, PGK1在78%(11/14)高分化、50%(4/8)中分化和75%(3/4)的低分化食管癌组织中高表达, 主要定位于细胞质和细胞核. 为进一步证明PGK1在食管癌EC0516细胞中的定位, 采用Western blot方法检测了PGK1在EC0516细胞系的亚细胞蛋白组份中的表达, 结果表明与免疫组化细胞定位结果一致, 即PGK1同时存在于食管癌细胞的胞质和细胞核中. 同时发现, 胞质中除了分子质量为43 kDa的PGK1表达蛋白外, 还存在一个分子质量为30 kDa的异构体, 而细胞核中的PGK1呈现分子质量为80 kDa的表达蛋白. 目前认为PGK1主要定于细胞质, 分子质量为43 kDa. 30 kDa可能是该蛋白的截短表达形式或降解片段, 80 kDa形式可能是该蛋白与其他相互作用蛋白或DNA等紧密结合的复合体^[40-41]. Kumble *et al*的研究表明, 在Hela细胞的核基质中PGK1与annexin II紧密结合发挥DNA多聚酶起始识别因子的功能, 参与调节细胞的DNA复制^[42]. 有趣的是Brichory *et al*对肺腺癌细胞A549的研究发现, annexin II是肺癌相关抗原, 在肺癌组织中表达明显升高^[10]. 肿瘤细胞的DNA复制功能活跃, 而机体失去了对调节DNA复制功能密切相关的两个调控蛋白的调控, 同时PGK1与annexin II间可能存在反馈调节现象. 本实验同样检测到核型PGK1的表达, 提示PGK1转位到细胞核中可能与细胞的恶性转化行为相关. 本研究结果与上述其他肿瘤研究工作结果一致, PGK1在可能食管鳞癌的发生、发展及转移过程中起重要的作用, 是候选的肿瘤相关抗原之一, 为深入理解食管癌癌变机制, 发现新的候选肿瘤标志具有科学意义.

4 参考文献

- 1 王国清. 食管癌高发发现场早期早治30年临床研究经验. 中国医学科学院学报 2001; 23: 69-72
- 2 Kawaguchi H, Ohno S, Miyazaki M, Hashimoto K, Egashira A, Saeki H, Watanabe M, Sugimachi K. CYFRA 21-1 determination in patients with esophageal squamous cell carcinoma: clinical utility for detection of recurrences. *Cancer* 2000; 89: 1413-1417
- 3 Shiku H, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF,

- 4 Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma. III. Recognition of autoantibodies with unusual characteristics. *J Exp Med* 1977; 145: 784-789
- 5 Gunawardana CG, Diamandis EP. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett* 2007; 249: 110-119
- 6 Prasannan L, Misek DE, Hinderer R, Michon J, Geiger JD, Hanash SM. Identification of beta-tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3949-3956
- 7 Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11810-11813
- 8 Fernandez Madrid F, Tang N, Alansari H, Karvonen RL, Tomkiel JE. Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 230-235
- 9 Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1224-1235
- 10 Klade CS, Voss T, Krystek E, Ahorn H, Zatloukal K, Pummer K, Adolf GR. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics* 2001; 1: 890-898
- 11 Brichory FM, Misek DE, Yim AM, Krause MC, Giordano TJ, Beer DG, Hanash SM. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9824-9829
- 12 Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 7908-7912
- 13 Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3328-3335
- 14 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203
- 15 Kellner R, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Ackermann A, Beck J, Brenner W, Melchior S, Seliger B. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2002; 2: 1743-1751
- 16 Seliger B, Menig M, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Halder TM, Kersten M, Harder A, Ackermann A, Beck J, Muehlenweg B, Brenner W, Melchior S, Kellner R, Lottspeich F. Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 2003; 3: 979-990
- 17 Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5504-5510
- 18 Canelle L, Bousquet J, Pionneau C, Deneux L,

■同行评价

本研究方法合理, 对照可靠, 结果明确, 具有一定的科学性, 可读性和创新性.

- Imam-Sghiouar N, Caron M, Joubert-Caron R. An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. *J Immunol Methods* 2005; 299: 77-89
- 18 Cui JW, Li WH, Wang J, Li AL, Li HY, Wang HX, He K, Li W, Kang LH, Yu M, Shen BF, Wang GJ, Zhang XM. Proteomics-based identification of human acute leukemia antigens that induce humoral immune response. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1718-1724
- 19 Li C, Xiao Z, Chen Z, Zhang X, Li J, Wu X, Li X, Yi H, Li M, Zhu G, Liang S. Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 547-558
- 20 Wang Q, Xu Y, Zhao X, Chang Y, Liu Y, Jiang L, Sharma J, Seo DK, Yan H. A facile one-step in situ functionalization of quantum dots with preserved photoluminescence for bioconjugation. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 6380-6381
- 21 http://www.proteomics.com.cn/2005/info_lib.asp
- 22 Zhang G, Spellman DS, Skolnik EY, Neubert TA. Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res* 2006; 5: 581-588
- 23 Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1931-1936
- 24 Kohli M, Yu J, Seaman C, Bardelli A, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Zhang L. SMAC/Diablo-dependent apoptosis induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16897-16902
- 25 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446
- 26 Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, Kim WJ, Lee YJ, Kim SH. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* 2006; 19: 1139-1147
- 27 Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 312-319
- 28 Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs E, Zhang Q, Krasnoselsky AL, Phanstiel D, Qiu J, Misek DE, Hinderer R, Tammemagi M, Landi MT, Caporaso N, Pfeiffer R, Edelstein C, Goodman G, Barnett M, Thornquist M, Brenner D, Hanash SM. Identification of 14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 12000-12006
- 29 吴德, 吴忠道, 余新炳. 磷酸甘油酸激酶的研究进展. *中国热带医学* 2005; 5: 385-387
- 30 Blake CC, Rice DW. Phosphoglycerate kinase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981; 293: 93-104
- 31 Valentin C, Birgens H, Craescu CT, Brodum-Nielsen K, Cohen-Solal M. A phosphoglycerate kinase mutant (PGK Herlev; D285V) in a Danish patient with isolated chronic hemolytic anemia: mechanism of mutation and structure-function relationships. *Hum Mutat* 1998; 12: 280-287
- 32 Fujii H, Yoshida A. Molecular abnormality of phosphoglycerate kinase-Uppsala associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 5461-5465
- 33 Yeh CS, Wang JY, Chung FY, Lee SC, Huang MY, Kuo CW, Yang MJ, Lin SR. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep* 2008; 19: 81-91
- 34 Lay AJ, Jiang XM, Daly E, Sun L, Hogg PJ. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *J Biol Chem* 2002; 277: 9062-9068
- 35 Hwang TL, Liang Y, Chien KY, Yu JS. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 2259-2272
- 36 Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, Ito M, Maeda Y, Ishihara Y, Itoh K. Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2+ colon cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5828-5836
- 37 Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ, Kardia SL, Iannettoni MD, Yee J, Hogg PJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13537-13542
- 38 Chuthapisith S, Layfield R, Kerr ID, Hughes C, Eremin O. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *Int J Oncol* 2007; 30: 1545-1551
- 39 Wang J, Wang J, Dai J, Jung Y, Wei CL, Wang Y, Havens AM, Hogg PJ, Keller ET, Pienta KJ, Nor JE, Wang CY, Taichman RS. A glycolytic mechanism regulating an angiogenic switch in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 149-159
- 40 Aldrich HC, McDowell L, Barbosa MF, Yomano LP, Scopes RK, Ingram LO. Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 1992; 174: 4504-4508
- 41 Fossel ET, Solomon AK. Ouabain-sensitive interaction between human red cell membrane and glycolytic enzyme complex in cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1978; 510: 99-111
- 42 Kumble KD, Vishwanatha JK. Immunoelectron microscopic analysis of the intracellular distribution of primer recognition proteins, annexin 2 and phosphoglycerate kinase, in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 1991; 99 (Pt 4): 751-758

编辑 李军亮 电编 郭海丽

干扰素调节因子3在慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞中的表达及意义

安宝燕, 谢青, 王晖, 贾妮娜, 沈怀诚, 蔡伟, 俞红, 郭清

安宝燕, 谢青, 王晖, 贾妮娜, 沈怀诚, 蔡伟, 俞红, 郭清, 上海交通大学医学院附属瑞金医院感染科上海市 200025
安宝燕, 2007年上海交通大学医学院博士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎的诊断与治疗研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30671838
上海市科委资助项目, No. 04411962
作者贡献分布: 安宝燕与谢青对此文所作贡献均等; 此课题由安宝燕、谢青设计; 研究过程由安宝燕、贾妮娜、沈怀诚及蔡伟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郭清、俞红提供; 数据分析由安宝燕完成; 本论文写作由安宝燕和谢青完成。
通讯作者: 谢青, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院感染科. xieqingrj@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-03-14

Expression and significance of interferon regulatory factor 3 of peripheral blood dendritic cells in HBV-infected patients

Bao-Yan An, Qing Xie, Hui Wang, Ni-Na Jia, Huai-Cheng Shen, Wei Cai, Hong Yu, Qing Guo

Bao-Yan An, Qing Xie, Hui Wang, Ni-Na Jia, Huai-Cheng Shen, Wei Cai, Hong Yu, Qing Guo, Department of Infectious Diseases, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30671838; and the Shanghai Committee of Science and Technology, No. 04411962
Correspondence to: Qing Xie, Department of Infectious Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Ruijin Er Road, Shanghai 200025, China. xieqingrj@yahoo.com.cn
Received: 2008-01-09 Revised: 2008-03-14

Abstract

AIM: To elucidate the roles of interferon regulatory factor-3 (IRF3) of peripheral blood dendritic cells (DCs) in immune response induced by hepatitis B virus (HBV).

METHODS: Monocytes CD14⁺ were separated in 28 chronic HBV-infected patients (CH) group and 27 healthy volunteers group (control group) using magnetic activated cell sorting. Then, monocytes were placed on a culture medium of RPMI 1640, which were later induced into premature MoDC using hGM-CSF and hIL-4. We stimulated DCs with PolyI : C. The mRNA expressions of IRF3, TLR3 and IFN- β were de-

tected using real time PCR, TLR3 expression was detected using flow cytometry and levels of IFN- β in supernatant were evaluated by ELISA.

RESULTS: In the control group, there was significant elevation of IRF3 and IFN- β level at 12 h following stimulation of PolyI : C compared with that at 0 h. Expression level of IRF3 rose and then declined gradually at 24h and 48 h ($86.27\% \pm 14.74\%$ vs $70.78\% \pm 11.16\%$, $P < 0.05$). In CH group, there was no significant up-regulation of TLR 3 at 0, 12, 24 h while a significant up-regulation was observed at 48 h ($85.46\% \pm 6.87\%$ vs $69.17\% \pm 20.43\%$, $P < 0.05$). The concentration of IFN- β had no significant changes at 0 h, 12 h, 24 h and 48 h in CH groups, while there was a significant higher up-regulation of IFN- β mRNA expression level at 0, 12, 24 h in the control group than in CH group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Chronic HBV-infected patients fail to activate IRF 3 following virus contraction and thereby are unable to secrete enough IFN- β to eradicate HBV virus, which may partly contribute to persistent infection of HBV.

Key Words: Interferon regulatory factor 3; Interferon- β ; Dendritic cells; HBV

An BY, Xie Q, Wang H, Jia NN, Shen HC, Cai W, Yu H, Guo Q. Expression and significance of interferon regulatory factor 3 of peripheral blood dendritic cells in HBV-infected patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1873-1879

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞中干扰素调节因子3(interferon regulate factor 3, IRF3)在HBV诱导的抗病毒免疫反应中的表达及作用。

方法: 选取HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者28例, 健康对照者27例, 用免疫磁珠细胞分选(MACS)法获得纯化的CD14⁺单核细胞, RPMI 1640培养基培养, 用hGM-CSF、hIL-4诱导单核细胞成为未成熟的MoDC, 加入PolyI :

背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染具有很高的发病率和死亡率, 是引起肝硬化及肝癌最常见的原因之一。HBV感染后导致的慢性乙型肝炎(CHB)临床上治疗困难, 其发病机理尚未阐明, 因此对慢性HBV感染的免疫机制研究尤为重要。

同行评议者
秦波, 教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

■ 研究前沿

HBV复制过程中产生dsRNA可以与TLR3结合,然后激活其下游信号传导途径,通过干扰素调节因子3、7的协同激活,在转录水平对IFN- β 的表达进行调节,启动抗病毒免疫。

C刺激,获得成熟的MoDC. PolyI:C刺激后0、12、24、48 h收集细胞培养的上清液及细胞, Real-Time PCR法检测IRF3和Toll样受体3(TLR3)的表达, ELISA方法检测MoDC细胞上清液中IFN- β 的浓度变化。

结果: 12 h健康对照组MoDC中IRF3 mRNA表达水平明显升高,并达高峰与0 h相比差异显著($P<0.05$), 24、48 h表达逐渐下降. 而患者组MoDC中IRF3 mRNA的表达上升不明显. 24 h健康对照组MoDC中TLR3表达上调显著($86.27\% \pm 14.74\%$ vs $70.78\% \pm 11.16\%$, $P<0.05$), 48 h TLR3表达与0 h相比无显著性差异, 而患者组0、12、24 h TLR3表达上调不明显, 48 h TLR3表达上调显著($85.46\% \pm 6.87\%$ vs $69.17\% \pm 20.43\%$, $P<0.05$). 健康对照组IFN- β mRNA表达及细胞上清液中的浓度与0 h相比显著升高($P<0.05$), 较患者组0、12、24和48 h IFN- β 的表达显著升高($P<0.05$).

结论: HBV慢性感染患者在感染病毒后不能激活IRF3从而导致宿主不能分泌足够的IFN- β 以清除病毒,这可能是HBV慢性持续感染的原因之一。

关键词: 干扰素调节因子3; 干扰素; 树突状细胞; 慢性乙型肝炎病毒

安宝燕, 谢青, 王晖, 贾妮娜, 沈怀诚, 蔡伟, 俞红, 郭清. 干扰素调节因子3在慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1873-1879
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1873.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染具有很高的发病率和死亡率,是引起肝硬化及肝癌最常见的原因之一^[1]. HBV感染后导致的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)临床上治疗困难,其发病机制尚未阐明,因此对慢性HBV感染的免疫机制研究尤为重要. 目前,国内外研究认为在HBV持续感染中,宿主免疫应答异常是其主要的发病机制. 正确调节宿主免疫应答,可以促进HBV持续感染患者对病毒的清除^[2]. HBV感染后病毒在复制中产生的基因组DNA、RNA或dsRNA能够被宿主的模式识别受体(PRRs)识别,然后PRRs激发了有效的、适当的抗病毒免疫反应,包括产生各种细胞因子,诱导炎症细胞因子和适应性免疫反应^[3]. 目前研究认为,HBV复制过程中产生dsRNA可以与TLR3结合,然后激活其下游信号传导途径,通过干扰素调节因子3、

7的协同激活,在转录水平对IFN- β 的表达进行调节,启动抗病毒免疫^[4-6]. 缺乏IRF3和IRF7的基因敲除小鼠,在抗病毒的反应过程中,IFN- β 的产生明显下降,提示IRF3、IRF7在抗病毒的反应过程中起至关重要的作用^[7-9]. 然而目前为止还没有研究报道在HBV感染后诱导的抗病毒免疫反应中IRF3的表达及作用,以及IFN- β 的分泌是否异常. 本研究探讨dsRNA(PolyI:C)刺激未成熟的单核细胞来源的树突状细胞(monocytic dendritic cell, MoDC),检测IRF3的表达、IFN- β 的分泌状态,及其上游受体TLR3的表达,为进一步了解CHB的免疫发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2005-07/2007-02上海交通大学医学院附属瑞金医院门诊就诊的慢性乙型肝炎(CHB)患者28例,按中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会联合制定的《2005年慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[10],男女比例为3:1,年龄19-50(平均32.1)岁. 肝功能异常以血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高为主($67-432$ IU/L),平均 149.96 ± 87.53 ;胆红素水平 <51.3 $\mu\text{mol/L}$; HBV血清标志物均为HBsAg、HBeAg、抗-HBc阳性,HBV DNA定量范围为 1.0×10^9 copies/L- 2.35×10^{11} copies/L,平均 $8.65 \pm 2.47 \times 10^{10}$ copies/L. 所有患者在就诊前6 mo内未接受干扰素、拉米夫定、胸腺素(肽)等抗病毒或免疫调节药物治疗;排除合并HAV、HCV、HEV、HIV、TTV等病毒感染,排除自身免疫相关的其他疾病. 27名健康志愿者作为正常对照,平均年龄30.4(18-60)岁,排除各系统其他疾病,无酗酒史,最近6 wk内无感染、未服用抗生素,肝功能正常。

1.2 方法

1.2.1 外周血单核细胞(monocyte, Mo)分离、培养: 无菌采集患者及健康志愿者外周血20 mL,淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞,获得PBMC,进行细胞计数,用适量PBS重悬沉淀细胞(80 $\mu\text{L/L} \times 10^7$ 个细胞),用MACS(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)法获得纯化的CD14⁺的细胞. 以RPMI 1640完全培养基悬浮细胞,每孔约 1×10^6 个细胞,并按照每孔2 mL培养液的量加入hGM-CSF(Pepro Tech)500 kU/L、hIL-4(Pepro Tech)250 kU/L,混匀后依次加入12孔培养板,做好时间、日期等标记,置于37 $^{\circ}\text{C}$,50 mL/L CO₂培养箱中培养. 于培养第5天在培养液中加入PolyI:C(浓度25 mg/L)继续置37 $^{\circ}\text{C}$,50

表 1 IRF3 mRNA、TLR3 mRNA、IFN- β mRNA和内参照的引物序列

目的基因		引物序列	产物长度(bp)
IRF3	Upper	5'-GTG CCG GGG GAA GAG TGG GAG TTC-3'	248
	Lower	5'-TGC CCG GCC CGC CAG AGA-3'	
TLR3	Upper	5'-GAGAGTGCCGTCTATTTGCCACAC-3'	300
	Lower	5'-GCGGCTGGTAATCTTCTGAGTTGA-3'	
IFN- β	Upper	5'-GAC GCC GCA GTG ACC ATC TAT-3'	243
	Lower	5'-CCCT CCT TGG CCT TCA GGT AAT G-3'	
GAPDH	Upper	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3'	228
	Lower	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	

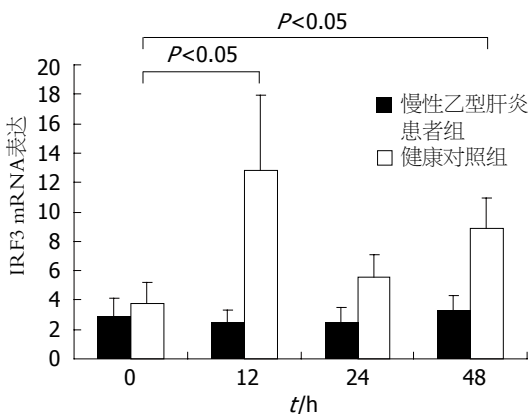


图 1 Real-Time PCR检测IRF3 mRNA的表达。

mL/L CO₂培养箱培养, 分别于0、12、24、48 h 收集各孔细胞和培养上清。

1.2.2 Real-Time PCR检测IRF3、IFN- β 和TLR3: 取1-2 $\times 10^6$ 个MoDC抽提RNA, 用RNA逆转录试剂盒(Promega, Co)将RNA逆转录为cDNA, -20 $^{\circ}$ C保存。Real-Time PCR用Sybr Green半定量法, Sybr Green荧光定量PCR试剂盒购自Applied Biosystems公司, 以GAPDH为内参, 每个样品同一引物设双复孔, 每次扩增均设阴性对照与阳性对照, 引物序列见表1。

1.2.3 细胞因子检测: 收集的MoDC培养上清液, 按酶联免疫吸附剂测定ELISA试剂盒说明检测IFN- β 含量。细胞因子检测步骤: (1)首先准备检测样品及试剂, 将检测样品及试剂平衡至室温。20 mL 25 \times 浓缩洗涤液用ddH₂O稀释至500 mL, 放置室温备用。(2)用标准品稀释液配制一系列标准品。(3)按顺序每孔加入200 μ L阴性对照、标准品、细胞上清液样品。(4)用试剂盒附带的粘纸覆盖。室温孵育2 h。记录样品与标准品的位置。(5)洗板。(6)每孔加辣根过氧化物酶结合的二抗200 μ L, 室温孵育1 h。(7)等体积混合底物溶液A、B, 按每孔200 μ L制备, 15 min内用完, 避光保存。(8)洗板。(9)每孔加入底物溶液200 μ L,

避光、室温孵育30 min。(10)每孔加入终止液50 μ L, 轻轻敲打反应板使其混匀。30 min内检测吸光度, 在450 nm读板, 在540 nm波长校正, 用四参数对数曲线法建立标准曲线。

1.2.4 流式细胞仪检测TLR3的表达: 收集培养的MoDC, 每个标本均设定一同型对照管。每管细胞数约5 $\times 10^5$ -1 $\times 10^6$, 用40 g/L多聚甲醛固定10 min, 加入0.1%皂素常温孵育5 min破膜, 然后加入不同荧光标记的抗体(避光): 同型对照管分别加入PE-mouse IgG2b 15 μ L(20 μ L/1 $\times 10^6$); 检测管同时加PE-抗人TLR3标记抗体, 常温、避光孵育30 min。最后加入200 μ L 10 g/L多聚甲醛代替PBS固定、送检。

统计学处理 用SPSS12.0统计软件计算各项观察指标的均数和标准差, 采用ONE-WAY ANOVA检验检测, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MoDC上IRF3 mRNA的表达 经PolyI : C刺激后0 h二组MoDC上IRF3 mRNA的表达无显著性差异($P > 0.05$)。在12 h对照组MoDC中IRF3 mRNA的表达上调到12.80 \pm 5.11, 与0 h相比升高显著($P < 0.05$), 而24 h、48 h IRF3 mRNA表达分别为5.57 \pm 3.50、8.85 \pm 4.05, 表达水平较12h虽有下降但是48 h IRF3 mRNA的表达仍然显著高于0 h($P < 0.05$)。患者组MoDC经PolyI : C刺激后12、24、48 h IRF3 mRNA的表达没有上升, 与0 h相比没有显著性差异($P < 0.05$, 图1)。患者组与对照组IRF3 mRNA在不同时间点的变化趋势, 对照组MoDC经PolyI : C刺激后12 h IRF3 mRNA的表达显著上升($P < 0.05$)。患者组IRF3 mRNA的表达没有随着PolyI : C的刺激而上调(图2)。

2.2 MoDC中TLR3的表达 (1)Real-Time PCR检测TLR3 mRNA的表达。患者组与对照组0 h TLR3

■ 相关报道

缺乏IRF3和IRF7的基因敲除小鼠, 在抗病毒的反应过程中, IFN- β 的产生明显下降, 提示IRF3、IRF7在抗病毒的反应过程中起至关重要的作用。

■创新盘点

本研究通过对慢性乙型肝炎患者DC中IRF3、TLR3、IFN- β 的研究发现HBV慢性感染患者在感染病毒后不能激活IRF3从而导致宿主不能分泌足够的IFN- β 以清除病毒,这可能是HBV慢性持续感染的原因之一。

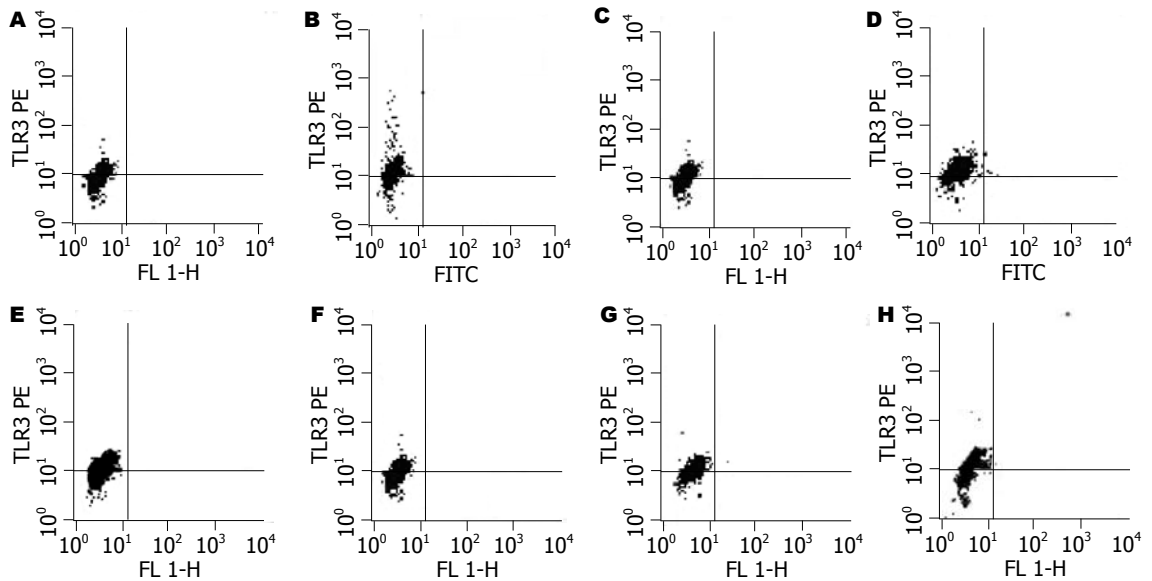


图2 MoDC经PolyI:C刺激后于0、12、24、48 h TLR3的表达。A-D: 患者组, 48 h TLR3的表达较0 h上升显著($P < 0.05$), 12 h、24 h上升不显著; E-H: 健康对照组, 24 h TLR3的表达较0 h上升显著($P < 0.05$), 12 h上升不显著; A, E: 0 h; B, F: 12 h; C, G: 24 h; D, H: 48 h。

表2 Real-Time PCR检测TLR3 mRNA的表达

	0 h	12 h	24 h	48 h
患者组	0.042 ± 0.020	0.101 ± 0.024	0.117 ± 0.056	0.260 ± 0.080 ^c
对照组	0.115 ± 0.062	0.355 ± 0.107 ^a	0.255 ± 0.112	0.130 ± 0.108

^a $P < 0.05$ vs 同组0 h, 患者组0、12、24 h; ^c $P < 0.05$ vs 同组0 h。

mRNA的表达分别是 0.042 ± 0.020 和 0.115 ± 0.062 , 虽然对照组TLR3 mRNA表达较患者组高但两组比较无显著性差异($P > 0.05$)。与流式细胞仪检测结果一致, 患者组12、24 h TLR3 mRNA的表达上升不明显, 而48 h的表达水平为 0.260 ± 0.080 , 较0 h表达水平显著上升($P < 0.05$)。而对照组TLR3 mRNA的表达于12 h达到高峰, 为 0.355 ± 0.107 , 较0 h表达水平显著上升($P < 0.05$), 显著高于患者组0、12、24 h TLR3 mRNA的表达水平(表2)。(2)流式细胞仪检测MoDC上TLR3的表达。二组MoDC经PolyI:C刺激后于0、12、24、48 h用流式细胞仪检测TLR3的表达(表3)。患者组与对照组0 h TLR3的表达分别为 $69.17\% \pm 20.43\%$ 和 $70.78\% \pm 11.16\%$, 两组相比较无显著性差异($P > 0.05$)。患者组MoDC经PolyI:C刺激后12、24 h TLR3的表达上升不明显, 而在48 h TLR3的表达显著升高, 表达量为 $85.46\% \pm 6.87\%$, 与0 h相比有显著性差异($P < 0.05$)。健康对照组MoDC经PolyI:C刺激后于0 h时TLR3表达为 $70.78\% \pm 11.16\%$ 与患者组相近, 经PolyI:C刺激后12 h TLR3的表达为 $67.49\% \pm 20.89\%$, 与0 h

相比无显著性差异, 而24 h时TLR3表达明显增加($86.27\% \pm 14.74\%$), 表达率较患者组提前达高峰, 48 h后TLR3表达逐渐下降, 与24 h相比有显著性差异($P < 0.05$, 图2)。

2.3 MoDC中IFN- β 的表达 当dsRNA与MoDC上的受体结合后, 最终可以使IFN- β 的分泌增加, 从而启动天然免疫及特异性抗病毒免疫反应清除病毒, 所以最后我们检测了IFN- β 的分子水平及蛋白质水平的表达。

2.3.1 Real-Time PCR检测IFN- β mRNA的表达: 经PolyI:C刺激后0 h二组MoDC上IFN- β mRNA的表达无显著性差异($P > 0.05$)。在12 h对照组MoDC中IFN- β mRNA表达显著上调(1.16 ± 0.50), 与0 h相比差异具有显著性($P < 0.05$)。患者组IFN- β mRNA 0 h表达水平非常低, 并且经PolyI:C刺激后12、24、48 h IFN- β mRNA的表达分别为 0.28 ± 0.14 、 0.24 ± 0.11 、 0.52 ± 0.13 , 与0 h相比较几乎没有变化($P > 0.05$, 图3)。

对照组MoDC受到PolyI:C刺激后12 h IFN- β mRNA的表达显著上升($P < 0.05$), 在24、48 h逐渐恢复到0 h水平, 患者组MoDC受到PolyI:C

表 3 慢性乙型肝炎患者外周血mDC上TLR3的表达 (%)

	0 h	12 h	24 h	48 h
患者组	69.17 ± 20.43	75.98 ± 18.59	78.23 ± 19.53	85.46 ± 6.87 ^a
对照组	70.78 ± 11.16	67.49 ± 20.89	86.27 ± 14.74 ^a	68.57 ± 16.86

^a $P < 0.05$ vs 同组0 h.

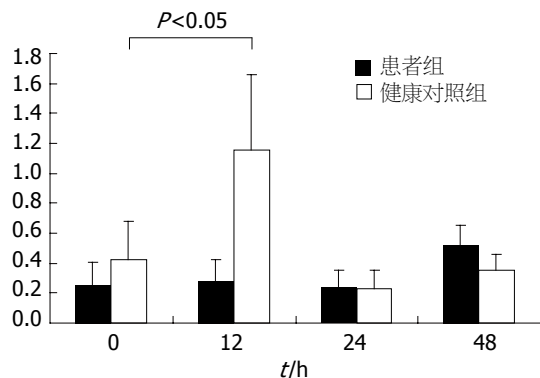


图 3 Real-Time PCR检测IFN-β mRNA的表达.

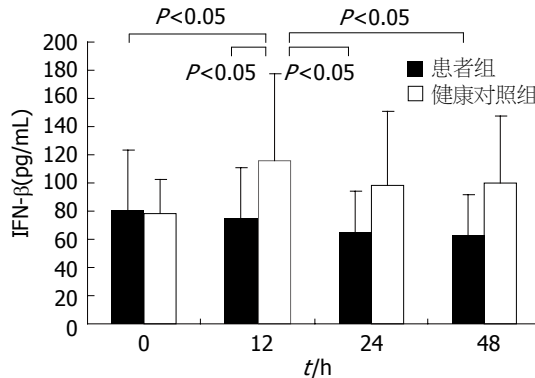


图 4 MoDC细胞培养上清液中IFN-β的浓度.

C刺激后48 h IFN-β mRNA的表达虽有上调,但是与0 h相比没有统计学意义($P > 0.05$).

2.3.2 MoDC细胞培养上清液中IFN-β的浓度变化: MoDC经PolyI:C刺激后于0、12、24、48 h保留其细胞培养的上清液,用ELISA法检测细胞上清液中IFN-β的浓度.二组0 h的IFN-β的浓度分别为: 80.71 ± 42.60 ng/L、 78.21 ± 23.89 ng/L,二组表达水平相近($P > 0.05$).健康对照者在12 h IFN-β的浓度与0 h相比明显上升,有显著性差异($P < 0.05$),较患者组0、12、24、48 h IFN-β的表达显著升高($P < 0.05$).患者组12、24、48 h IFN-β的浓度分别为 75.28 ± 35.22 ng/L、 64.69 ± 29.62 ng/L、 62.63 ± 28.72 ng/L,与0 h相比表达水平没有显著变化(图4).

二组MoDC经PolyI:C刺激后于0、12、24、48 h用ELISA方法检测MoDC培养上清液中IFN-β的浓度,二组0 h的IFN-β的浓度相近,患者组12、24、48 h IFN-β的浓度与0 h相比表达水平没有明显上升,而健康对照组在12 h IFN-β的浓度上升明显与0 h相比较有显著性差异,较患者组0、12、24、48 h IFN-β的表达显著升高($P < 0.05$).

3 讨论

I类干扰素在宿主的抗病毒免疫中起关键作用.当病毒复制过程中产生dsRNA与TLR3结合,然后激活其下游信号传导途径,诱导干扰素产生,启动抗病毒免疫.TLR3的信号传导包括两条途径,

即MyD88依赖和非依赖途径^[11-15].MyD88非依赖途径主要通过IRF3磷酸化,形成二聚体,进入细胞核内诱导目标基因IFN-β的转录、表达^[16-17].

IRF3属于一种磷酸化的蛋白,持续表达在所有的细胞中,主要以无功能的形式(I型、II型)存在细胞质中^[18-19].他具有一个氨基末端,包含多个色氨酸,是DNA结合结构域,和一个羧基末端是IRF结合结构域(IAD)及转录激活结构域. IRF3的转录活性是由羧基末端丝氨酸及苏氨酸磷酸化来控制的^[20-22].病毒在复制过程中产生的dsRNA可以激活TLR3,TLR3激活TBK1,TBK1使IRF-3的羧基末端丝氨酸残基磷酸化,磷酸化的IRF-3从细胞质转移到细胞核内.然后IRF3与干扰素刺激的反应成份(IFN-Stimulated response elements, ISRES)诱导目标基因包括ISG56, IFN-β的转录、激活^[23-26].有报道表明当敲除IRF-3基因的小鼠胚胎纤维原细胞(MEFs)被新城疫病毒(NDV)感染后,IFN-α/β基因表达低下.缺乏IRF3的基因敲出小鼠,在抗病毒的反应过程中,IFN-β的产生明显下降,提示IRF3在抗病毒的反应过程中起至关重要的作用^[27-28].本研究通过RT-PCR方法检测IRF3,结果发现患者组MoDC经PolyI:C刺激后12、24、48 h IRF3 mRNA的表达没有明显上调,这与TBK1 mRNA的检测结果一致,表明患者组IRF3不能受到有效的信号激活.提示,患者组IRF3不能被磷酸化,不能进入细胞核内诱导目标基因的转录、激活.健康对照组MoDC经PolyI:C刺激后12 h IRF3

应用要点

本研究探讨dsRNA(PolyI:C)刺激未成熟的单核细胞来源的树突状细胞,检测IRF3的表达、IFN-β的分泌状态,以及其上游受体TLR3的表达,为进一步了解CHB的免疫发病机制提供实验依据.

■名词解释

实时荧光定量PCR技术: 指在PCR反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法, 已广泛用于基因表达研究、转基因研究、病原体定量检测、疾病分类及其发病机制等生命科学领域。

mRNA的表达水平显著升高, 而24、48 h IRF3 mRNA表达水平较12 h虽有下降但是48 h IRF3 mRNA的表达仍然显著高于0 h, 提示健康对照组TBK1可以使IRF-3的羧基末端丝氨酸残基磷酸化, IRF-3形成二聚体, 进入细胞核内, 诱导目标基因IFN- β 的转录、激活^[29-30]。

为了进一步了解患者组IRF3表达低下的原因, 我们分别用Real-Time PCR和流式细胞仪法检测了TLR3的表达, 结果发现在健康对照组中MoDC经PolyI : C(25 mg/L)刺激后24 h TLR3表达上调显著($P < 0.05$), 48 h TLR3表达减少, 与0 h相比无显著性差异, 而患者组的0、12、24 h TLR3的表达上调不明显, 48 h TLR3表达上调显著($P < 0.05$)。患者组IRF3 mRNA的表达在48 h没有上升, 而TLR3的表达上升, 提示: IRF3表达低下可能存在另外的机制, 需要进一步研究。患者组细胞培养液中IFN- β 的浓度检测结果及DC细胞中IFN- β mRNA的检测结果显示与IRF3结果一致, 即IFN- β 的浓度在PolyI : C刺激后各个时间点无显著性变化。上述结果说明患者组dsRNA与TLR3结合后IRF3表达障碍, 最终不能激活IFN- β 的转录、表达, MoDC分泌IFN- β 的能力低下。

上述结果表明慢性乙型肝炎患者IRF3表达异常, 阻断了抗病毒的信号传导, 引起干扰素分泌异常, MoDC不能分化成熟、抗原递呈功能受损, 从而不能有效的诱导天然免疫、激活特异性抗病毒免疫反应, 使HBV感染后出现免疫耐受或者免疫清除障碍, 最终导致HBV持续感染。

4 参考文献

- 1 Wu GY, Chen HS. Novel approaches towards conquering hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 830-836
- 2 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- 3 Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 2007; 39: 421-438
- 4 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738
- 5 Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 491-496
- 6 Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma YT, Flavell RA, Liljestrim P, Reis e Sousa C. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005; 433: 887-892
- 7 Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J. The interferon antiviral response: from viral

- invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 259-267
- 8 Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005; 26: 469-476
- 9 Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; 300: 1148-1151
- 10 中华医学会感染病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 881-891
- 11 Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; : 21-50
- 12 Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3311-3318
- 13 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511
- 14 Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9
- 15 Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; 13: 460-469
- 16 Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 214-224
- 17 Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3533-3538
- 18 Peters KL, Smith HL, Stark GR, Sen GC. IRF-3-dependent, NFkappa B- and JNK-independent activation of the 561 and IFN-beta genes in response to double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6322-6327
- 19 Juang YT, Lowther W, Kellum M, Au WC, Lin R, Hiscott J, Pitha PM. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9837-9842
- 20 McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 233-238
- 21 Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, Fujita T. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 9698-9702
- 22 Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J. Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* 2001; 276: 355-363
- 23 Kim T, Kim TY, Song YH, Min IM, Yim J, Kim TK. Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 1999; 274: 30686-30689
- 24 Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2465-2474
- 25 Karpova AY, Ronco LV, Howley PM. Functional characterization of interferon regulatory factor 3a (IRF-3a), an alternative splice isoform of IRF-3. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4169-4176
- 26 Kumar KP, McBride KM, Weaver BK, Dingwall

- C, Reich NC. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4159-4168
- 27 Weaver BK, Kumar KP, Reich NC. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1359-1368
- 28 Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 2002; 76: 5532-5539
- 29 Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, Hiscott J. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* 2000; 74: 3781-3792
- 30 Horscroft N, Bellows D, Ansari I, Lai VC, Dempsey S, Liang D, Donis R, Zhong W, Hong Z. Establishment of a subgenomic replicon for bovine viral diarrhoea virus in Huh-7 cells and modulation of interferon-regulated factor 3-mediated antiviral response. *J Virol* 2005; 79: 2788-2796

■同行评价
本研究设计合理,方法得当,结果可信,具有较好的理论和实际意义。

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 2008-06-18)

肝硬化病因及临床特点分析178例

孟晓丹, 向国卿, 贺小虎, 王炳元

■背景资料

乙型肝炎疫苗的普遍接种,使HBV感染率下降,但肝硬化的发生率仍然有上升趋势,寻找其病因谱改变的原因,是预防和治疗肝硬化的关键。

孟晓丹, 向国卿, 贺小虎, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

孟晓丹, 中国医科大学硕士研究生, 研究方向为脂肪肝的基础与临床。

作者贡献分布: 此研究资料由孟晓丹, 向国卿及贺小虎收集; 本文写作由孟晓丹与王炳元完成。

通讯作者: 王炳元, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科。

wangby@medmail.com.cn

电话: 024-83282776 传真: 024-83282200

收稿日期: 2007-12-31 修回日期: 2008-04-09

Etiology and clinical character of liver cirrhosis: an analysis of 178 cases

Xiao-Dan Meng, Guo-Qing Xiang, Xiao-Hu He, Bing-Yuan Wang

Xiao-Dan Meng, Guo-Qing Xiang, Xiao-Hu He, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wangby@medmail.com.cn

Received: 2007-12-31 Revised: 2008-04-09

Abstract

AIM: To investigate the etiology and clinical characteristics of liver cirrhosis in the Northeast of China.

METHODS: We retrospectively analyzed the clinical data and laboratory test results of 178 patients with liver cirrhosis admitted to our hospital from January to October 2007.

RESULTS: Of the 178 patients, 31 cases (34.3%) had simple hepatitis B virus infection; 11 cases (6.2%) had simple hepatitis C virus infection; 3 (1.7%) cases had overlapping infection of hepatitis B and C virus; 39 cases (21.9%) had simple alcoholic cirrhosis; 27 (15.2%) cases had co-injury caused by alcohol and hepatitis virus; the rest included 8 (4.5%) cases with primary biliary cirrhosis and 29 (16.3%) cases with cryptogenic cirrhosis. In addition to spider telangiectasia ($\chi^2 = 4.503, P = 0.034$), other signs and symptoms had

no significant differences between viral infection patients and heavy drinker. Upper gastrointestinal bleeding (42.0%), primary hepatic carcinoma (28.7%), secondary infection (16.1%) and hepatic encephalopathy were main complications in liver cirrhosis.

CONCLUSION: Hepatitis B virus infection is still the main cause of liver cirrhosis in the Northeast of China. Portal hypertension often happens in simple viral infection, and liver function injury usually happens in simple alcoholism. Hepatocellular carcinoma occurs more frequently in the cases with overlapping infection of hepatitis virus and concurrent of alcohol-drinking and hepatitis viral infection.

Key Words: Liver cirrhosis; Etiology; Viral hepatitis

Meng XD, Xiang GQ, He XH, Wang BY. Etiology and clinical Character of liver cirrhosis: an analysis of 178 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1880-1884

摘要

目的: 探讨东北地区肝硬化患者病因及临床特点。

方法: 选择我院2007-01/2007-10住院确诊的肝硬化患者178例, 回顾性分析患者的临床资料和实验室检查结果。

结果: 178例患者中单纯乙型肝炎病毒感染61例(34.3%), 单纯丙型肝炎病毒感染11例(6.2%), 乙型与丙型肝炎病毒重叠感染3例(1.7%), 单纯饮酒所致肝硬化39例(21.9%), 酒精合并肝炎病毒共同损伤所致肝硬化27例(15.2%), 其他为原发性胆汁性肝硬化8例(4.5%), 不明原因肝硬化29例(16.3%)。肝炎病毒感染和酒精中毒所致肝硬化相比, 除蜘蛛痣($\chi^2 = 4.503, P = 0.034$)外, 其他症状和体征的发生率无显著性差异。肝硬化并发症为上消化道出血(42.0%)、原发性肝癌(28.7%)、继发感染(16.1%)和肝性脑病(11.2%)。

结论: 东北地区的肝硬化病因仍然以乙型肝炎

■同行评议者

谢晓华, 副教授, 广州中医药大学第一附属医院三外科

炎病毒感染为主. 单纯病毒感染所致肝硬化的临床表现以门脉压力增高为主, 酒精中毒则以肝功能损伤为主, 肝炎病毒重叠感染及嗜酒与病毒感染并存容易导致肝癌的发生.

关键词: 肝硬化; 病因; 病毒性肝炎

孟晓丹, 向国卿, 贺小虎, 王炳元. 肝硬化病因及临床特点分析178例. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1880-1884
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1880.asp

0 引言

慢性肝病发展的终末期大部分都要经过肝硬化阶段, 病因的不同, 肝硬化出现的时间、临床特征、治疗效果和预后等均有一定的差异. 有研究证实, 两种病因先后或同时作用于肝脏, 更易导致肝硬化的发生^[1]. HBV感染患者大约10年后进展为肝硬化, 这个时间比HCV感染患者要早^[2]. 而且, 加强对肝硬化患者的随访, 早期发现其严重并发症如肝细胞癌, 并采取积极干预可以提高患者生存率^[3]. 随着社会的发展, 肝硬化的病因也在发生变化, 及时把握和干预这种变化, 对预防肝硬化的发生及进展至关重要.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2007-01/2007-10住院确诊的178例肝硬化患者的临床资料, 其中男126例, 女52例, 男女比例2.42:1, 年龄为19-83(平均55.93±12.80)岁.

1.2 方法 全部入选病例经过病史采集、临床表现、血生化检查、腹部彩色多普勒超声, 腹部增强CT及胃镜检查综合分析, 参考2000年《病毒性肝炎防治方案》^[4], 2005年《慢性乙型肝炎防治指南》^[5], 2004年《丙型肝炎防治指南》^[6], 2006年《酒精性肝病诊疗指南》^[7], 肝肾综合征诊断标准^[8], 以及原发性胆汁性肝硬化指导建议^[9]得出诊断. 就病因及临床特点进行初步探讨.

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件进行 χ^2 检验及Fisher确切概率法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病因分类 肝炎病毒感染者共75例(42.1%), 其中乙型肝炎病毒(HBV)感染61例(34.3%); 丙型肝炎病毒(HCV)感染11例(6.2%); 乙型和丙型肝炎病毒重叠感染(B+C)3例(1.7%); 单纯酒精相关肝硬化(AL)共39例(21.9%); 酒精与肝炎病毒共同损伤者27例(15.2%), 其中酒精与乙型肝炎

病毒感染(AL+B)有23例(12.9%), 酒精与丙型肝炎病毒感染(AL+C)有4例(2.3%); 其他为原发性胆汁性肝硬化(PBC)8例(4.5%); 不明原因肝硬化(unknown)29例(16.3%).

2.2 临床表现 肝硬化的临床表现有重叠, 但按其发生率的高低排在前十位的症状与体征依次为脾大、腹水、腹胀、乏力、食道静脉曲张、黄疸、下肢浮肿、肝掌、蜘蛛痣和肝区疼痛. 除了常见的脾大、腹胀、腹水之外, 酒精相关的肝硬化患者中乏力、黄疸和蜘蛛痣均有较高的倾向; 另外, 酒精相关的肝硬化患者中食道静脉曲张的发生率较高, 尤其合并肝炎病毒感染时更高(表1). 单纯肝炎病毒感染(包括HBV、HCV及B+C)和单纯酒精相关肝硬化相比, 除蜘蛛痣($\chi^2 = 4.503, P = 0.034$)外, 其他症状和体征的发生率无显著性差异(表2).

2.3 并发症 肝硬化最常见的并发症为上消化道出血(UGH)占42.0%, 尤以肝炎病毒感染相关肝硬化为主, 合并饮酒者发病率更高; 其次为原发性肝癌(HCC)占28.7%; 继发感染(Infection)占16.1%和肝性脑病(HE)占11.2%, 其在饮酒者中有更多的倾向; 而肝肾综合征(HRS)及肝肺综合征(HPS)相对少见(表3). 在慢性肝炎病毒感染和单纯酒精相关肝硬化中, 原发性肝癌的发生率存在显著性差异($\chi^2 = 5.662, P = 0.017$, 表3); 单纯酒精中毒与酒精合并肝炎病毒感染所致肝硬化患者中, 后者更易发生原发性肝癌($\chi^2 = 6.214, P = 0.013$, 表4).

3 讨论

引起肝硬化的病因比较复杂, 了解我国肝硬化患者的病因特点, 对掌握发病机制、延缓病情进展及改善预后都具有重要的临床意义.

1992年, 一个小样本统计资料表明, 作为东北地区肝硬化的病因, 单纯肝炎病毒感染仅占30%, 饮酒与肝炎病毒共同损伤占40%, 而单纯酒精中毒所致肝硬化为0^[10]. 而本研究显示15年后前者比例上升至42.1%, 后者降为15.2%; 单纯酒精中毒作为单独致病因素所致肝硬化上升为21.9%, 这种变化趋势与全国酒精性肝病协作组^[11]及日本2006年的一项研究结果相一致^[12]. 这表明在我国东北地区肝炎病毒感染, 尤其是HBV感染仍然是导致肝硬化的首要病因, 但是嗜酒作为单独的病因明显上升, 成为不容忽视的问题, 特别是其与肝炎病毒共同损伤在导致肝硬化的病因中亦占有相当比例, 后两者已成为东北

■ 相关报道

作者相隔15年的2次研究, 嗜酒作为单独病因导致肝硬化由0%上升至21.9%, 全国酒精性肝病调查协作组的近期总结也给予明显的佐证, 提示应该重视“酒文化”对健康的影响.

■创新盘点

北方地区目前肝硬化危险因素的改变主要与嗜酒有关,后者不仅易造成肝细胞损伤,与肝炎病毒并存更容易导致原发性肝癌、继发感染和肝性脑病的发生。

表 1 不同病因的肝硬化患者临床表现特点 $n(\%)$

	HBV	HCV	B+C	AL	AL+B	AL+C	PBC	Unknown	Total
脾大	39(63.9)	9(81.8)	2(66.7)	27(69.2)	16(66.7)	3(100)	7(87.5)	20(69.0)	123(69.1)
腹水	33(54.1)	8(72.7)	2(66.7)	27(69.2)	14(58.3)	2(66.7)	1(12.5)	24(82.8)	111(62.4)
腹胀	36(59.0)	7(63.6)	3(100)	20(51.3)	13(54.2)	1(33.3)	1(12.5)	17(58.6)	98(55.1)
乏力	24(39.4)	2(18.2)	2(66.7)	14(35.9)	7(29.2)	1(33.3)	3(37.5)	10(34.5)	63(35.4)
食道静脉曲张	16(26.2)	5(45.5)	1(33.3)	16(41.0)	9(37.5)	2(66.7)	3(37.5)	7(24.1)	59(33.1)
黄疸	22(36.1)	1(9.1)	1(33.3)	14(35.9)	4(16.7)	1(33.3)	6(75.0)	8(27.6)	57(32.0)
下肢浮肿	16(26.2)	2(18.2)	1(33.3)	15(38.5)	4(16.7)	1(33.3)	4(50.0)	9(31.0)	52(29.2)
肝掌	16(26.2)	1(9.1)	1(33.3)	10(25.6)	9(37.5)	1(33.3)	3(37.5)	4(13.8)	45(25.3)
蜘蛛痣	10(16.4)	0(0)	2(66.7)	13(33.3)	4(16.7)	1(33.3)	2(25.0)	5(17.2)	37(20.8)
肝区疼痛	2(3.3)	1(9.1)	1(33.3)	1(2.6)	2(8.3)	0(0)	0(0)	4(13.8)	11(6.2)
总例数	61(100)	11(100)	3(100)	39(100)	24(100)	3(100)	8(100)	29(100)	178(100)

表 2 单纯肝炎病毒感染相关肝硬化与单纯酒精相关肝硬化的临床表现比较 $n(\%)$

	肝炎病毒感染相关肝硬化		单纯酒精相关肝硬化		χ^2	P
	有	无	有	无		
脾大	50(66.7)	25(33.3)	27(69.2)	12(30.8)	0.077	0.781
腹水	43(57.3)	32(42.7)	27(69.2)	12(30.8)	1.532	0.216
腹胀	46(61.3)	29(38.7)	20(51.3)	19(48.7)	1.063	0.302
乏力	28(37.3)	47(62.7)	14(35.9)	25(64.1)	0.023	0.880
食道静脉曲张	22(29.3)	53(70.7)	16(41.0)	23(59.0)	1.578	0.209
黄疸	24(32.0)	51(68.0)	14(35.9)	25(64.1)	0.175	0.675
下肢浮肿	19(25.3)	56(74.7)	15(38.5)	24(61.5)	2.113	0.146
肝掌	18(24.0)	57(76.0)	10(25.6)	29(74.4)	0.037	0.847
蜘蛛痣	12(16.0)	63(84.0)	13(33.3)	26(66.7)	4.503	0.034 ^a
肝区疼痛	4(5.3)	71(94.7)	1(2.5)	38(97.4)	-	0.659

^a $P < 0.05$ 为差异有显著性, -表示用Fisher确切概率法检验。

表 3 不同病因肝硬化患者并发症的发生情况 $n(\%)$

	HBV	HCV	B+C	AL	AL+B	AL+C	PBC	Unknown	Total
UGH	24(42.1)	5(50.0)	0(0)	9(37.5)	11(44.0)	3(75.0)	0(0)	8(40.0)	60(42.0)
HCC	17(29.8)	4(40.0)	2(100)	2(8.3)	11(44.0)	0(0)	0(0)	5(25.0)	41(28.7)
Infection	6(10.5)	0(0)	0(0)	8(33.3)	3(12.0)	1(25.0)	1(100)	4(20.0)	23(16.1)
HE	7(12.3)	1(10.0)	0(0)	5(20.8)	0(0)	0(0)	0(0)	3(15.0)	16(11.2)
HRS	2(3.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.4)
HPS	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.7)
Total	57(100)	10(100)	2(100)	24(100)	25(100)	4(100)	1(100)	20(100)	143(100)

地区肝硬化的第二和第三大病因。我国是HBV感染的高流行区,根据2002年全国HBV感染者血清流行病学调查,三岁以上人群HBsAg的阳性率为9.09%^[13]。慢性HBV感染者中,肝硬化失代偿的年发生率约3%,5年累计发生率约16%^[14],其中6%-15%可发展为肝癌^[15],长期持续的高病毒负荷增加了肝硬化肝癌患者死亡的危险

性^[16]。如何切断庞大的HBV感染源对减少肝硬化及其并发症的发生有重大意义。此外,随着饮食习惯的改变和社会交往的增多,饮酒者不仅数量增多,而且趋向于年轻化和女性化^[17],饮酒对预防心脑血管疾病贡献的夸大等,都将增加酒精性肝病的发生。有研究表明,各个国家或地区酒精消耗量与肝硬化的发病率之间呈明显线性相

表 4 不同病因肝硬化并发症发生的差异 $n(\%)$

	肝炎病毒感染相关肝硬化		单纯酒精相关肝硬化		酒精与肝炎病毒共同损伤		χ^2	P
	有	无	有	无	有	无		
UGH	29(42.0)	40(58.0)	9(37.5)	15(62.5)			0.151	0.697
UGH					14(48.3)	15(51.7)	0.621	0.431
HCC	23(33.3)	46(66.7)	2(8.3)	22(91.7)			5.662	0.017 ^a
HCC					11(37.9)	18(62.1)	6.214	0.013 ^c
Infection	6(8.7)	63(91.3)	8(33.3)	16(66.7)			-	0.007
Infection					4(13.8)	25(86.2)	2.863	0.091

^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$ 为差异有显著性, -表示用Fisher确切概率法检验; 上一行表示单纯肝炎病毒感染相关肝硬化与单纯酒精相关肝硬化的比较, 下一行表示单纯酒精相关肝硬化与酒精合并病毒感染的比较。

关关系^[18-19]。嗜酒是肝炎病毒的易感因素, 而酒精性肝硬化合并肝炎感染的几率更高, 二者对肝细胞的损伤可能存在协同作用^[20]。研究表明, 酒精合并HCV感染的肝硬化患者与单纯酒精性肝硬化患者相比住院时间延长且死亡率增加^[21]。因此, HBV及HCV感染者应远离酒精, 以减少酒精和肝炎病毒感染相关肝病的发生。

肝硬化的临床表现仍然以肝功能减退和门静脉高压症两大类为主, 除了常见的脾大、腹胀、腹水等临床表现之外, 与肝炎病毒感染相关的患者中门静脉高压症比较明显, 长期嗜酒者中则表现为明显的肝功能减退症状。嗜酒者尤以乏力、黄疸(肝内淤胆)和蜘蛛痣为多见, 特别是前臂远端的蜘蛛痣对酒精性肝硬化的诊断更具特异性。而当酒精合并肝炎病毒感染时不仅肝功能损伤重, 食管胃底静脉曲张的发生率也很高。研究表明, 腹水是肝硬化患者其他并发症发生的高危因素, 重视治疗腹水可以有效的防止食管胃静脉曲张所致的消化道出血、自发性腹膜炎、肝肾综合征, 从而提高生存率^[22-23]。

本研究提示肝硬化患者的各种并发症中上消化道出血(42.0%)仍居首位, 尤以肝炎病毒感染所致的肝硬化为主, 在肝炎病毒感染合并饮酒者发病率更高; 其次为原发性肝癌(28.7%)、继发感染(16.1%)和肝性脑病(11.2%); 而肝肾综合征及肝肺综合征相对少见。酒精性肝损伤与病毒性肝损伤相比很少导致肝细胞癌^[24]。本研究得到了基本一致的结果, 单纯肝炎病毒感染、单纯饮酒以及肝炎病毒感染与饮酒共同损伤中, 发生原发性肝癌所占比例分别是33.3%、8.3%和37.9%。提示我们在同样存在嗜酒因素的情况下, 是否合并肝炎病毒感染与原发性肝癌的发生具有很大的相关性, 即嗜酒合并肝炎病毒感

染者更易合并原发性肝癌($P = 0.013$)。近年国内外均已证实饮酒对乙型、丙型肝炎后肝硬化乃至肝癌发生均起促进作用^[25-26]。乙醇可致肝纤维化, 加剧肝炎后肝硬化的病理, 并反式激活HBV的X基因编码产物(X蛋白), 促进乙型肝炎及丙型肝炎的恶性变^[27]。因此嗜酒不仅是肝炎病毒的易感因素, 两者同时存在显著加重疾病的进展。

我国是HBV感染大国, 随着医学知识普及和乙肝疫苗的广泛接种, 越来越多的人重视了对乙肝的防范, 但是也不能忽略其他类型病毒性肝炎的传播和扩散。本研究中就包含了11例单纯丙肝病毒感染和3例乙肝与丙肝病毒重叠感染, 尤其后者值得我们重视。一项前瞻性研究表明, 乙肝病毒与丙肝病毒重叠感染是肝癌发生的最高危险因素^[28-29], 本研究3例病毒重叠感染所致的肝硬化患者中有2例发生了原发性肝癌, 亦得到一致的结果, 提示病毒的重叠感染可使肝脏疾病迅速进展。

肝硬化是我国常见疾病和主要死亡病因之一, 目前无特效治疗方法, 最大限度的长期持续抑制或清除HBV, 可以减轻肝细胞的炎症坏死及其所致的肝纤维化^[30]; 此外还应该重视嗜酒作为单独或协同因素对肝脏造成的损伤, 从而减少肝硬化及其并发症的发生。

4 参考文献

- 1 于皆平, 沈志祥, 罗和生. 实用消化病学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2007: 743
- 2 Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2886-2895
- 3 Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, Morabito A, De Franchis R, Colombo M. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during

■应用要点

肝硬化危险因素的改变可能与人们的社会交往理念、生活习惯有关, 改善人群的健康行为、生活方式是肝硬化一级预防的重要措。

■同行评价

本文目的从流行病学角度去分析揭示肝硬化发病因素或危险因素,为预防肝硬化,提高一级预防意识,加强健康促进,改善人群的健康行为、生活方式提供依据。不足之处是回顾性病例分析例数偏少,数据来源面窄,欠说服力。

- 4 surveillance. *Gastroenterology* 2004; 126: 1005-1014
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 6 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-430
- 7 中华医学会肝病学分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 194-198
- 8 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 164-166
- 9 Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Scholmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. Hepatology* 1996; 23: 164-176
- 10 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 11 Wang BY, Liu DP, Cai ZD, Takeda Shujiro, Takeda Nobuo, Wang JS, Takada Akira. Prevalence of hepatitis C virus infection in the Shenyang district of China. *J Kanazawa Med Univ* 1992; 17: 317-323
- 12 全国酒精性肝病调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析. 中华消化杂志 2007; 27: 231-234
- 13 Horie Y, Yamagishi Y, Kato S, Kikuchi M, Ishii H, Hibi T. Alcoholic liver diseases and hepatitis virus C in Japan. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 2006; 41: 424-430
- 14 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长纓, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658
- 15 de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodes J, Rosenberg W, Valla D. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S3-S25
- 16 Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174
- 17 Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73
- 18 Simons-Morton B. Prospective association of peer influence, school engagement, drinking expectancies, and parent expectations with drinking initiation among sixth graders. *Addict Behav* 2004; 29: 299-309
- 19 梁扩寰, 李绍白, 王天才, 林菊生, 刘梅. 肝脏病学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 823
- 20 Ramstedt M. Alcohol consumption and liver cirrhosis mortality with and without mention of alcohol--the case of Canada. *Addiction* 2003; 98: 1267-1276
- 21 刘阳, 刘德东, 迟宝荣. 酒精性肝硬化合并肝炎病毒感染临床特点. 吉林医学 2005; 26: 158-159
- 22 Tsui JI, Pletcher MJ, Vittinghoff E, Seal K, Gonzales R. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. *J Hepatol* 2006; 44: 262-266
- 23 Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S54-S68
- 24 Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004; 350: 1646-1654
- 25 Pan R, Shao X. Clinical characteristics of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 1998; 4(Suppl 2): tk95b-tk996
- 26 Benvegnu L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, Alberti A. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer* 1994; 74: 2442-2448
- 27 李庚元, 刘福臣, 彭国琴, 严家春. 饮酒对病毒性肝炎病程及转归影响的临床调查. 胃肠病学和肝病学杂志 2002; 11: 66-67
- 28 姚桢, 姚宗歌, 姚月歌, 王朝栋, 刘茂才. 饮酒对乙型肝炎病程影响的临床流行病学研究. 中华消化杂志 1997; 17: 7-9
- 29 白宪光, 张丽环, 何文革, 连建奇. 546例肝炎后肝硬化患者的流行病学和临床特点. 第四军医大学学报 2000; 21: 820-823
- 30 Kew MC. Interaction between hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinogenesis. *J Viral Hepat* 2006; 13: 145-149
- 31 Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Kane E, Kao JH, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-489

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 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail,印刷版。在线投稿网址: <http://wjgd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893 寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑:张海宁 2008-06-18)

大肠癌组织抑癌基因DPC4和TGF-β1的表达意义

张东伟, 杨维良, 姚强

张东伟, 杨维良, 姚强, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

张东伟, 副主任医师, 主要从事普外科疾病的诊断和治疗。

作者贡献分布: 此课题由张东伟与杨维良设计; 研究过程由张东伟与姚强操作完成; 研究用试剂由杨维良提供; 数据分析由张东伟与姚强完成; 论文写作由张东伟与杨维良完成。

通讯作者: 张东伟, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. mugong0@163.com

电话: 0451-86605419

收稿日期: 2008-02-18 修回日期: 2008-04-15

Expression of deleted in pancreatic carcinoma locus 4 and transforming growth factor-β1 in human colorectal carcinoma and their clinical significances

Dong-Wei Zhang, Wei-Liang Yang, Qiang Yao

Dong-Wei Zhang, Wei-Liang Yang, Qiang Yao, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Dong-Wei Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. mugong0@163.com

Received: 2008-02-18 Revised: 2008-04-15

Abstract

AIM: To investigate the expression of deleted in pancreatic carcinoma locus 4 (DPC4) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in human colorectal cancer tissues and their clinical significances.

METHODS: Forty-eight samples of human colorectal carcinoma were collected from patients from January 2005 to December 2005. In situ hybridization and immunohistochemistry were used to detect DPC4/TGF-β1 mRNA and protein expression respectively.

RESULTS: The expression of DPC4 mRNA was lower in colorectal carcinoma specimens as compared with that in normal colorectal specimens (52.1% vs 72.9%, $P < 0.01$), while TGF-β1 mRNA expression was higher in carcinoma specimens (68.8% vs 41.7%, $P < 0.01$). The level of DPC4

protein expression in the cancer specimens was significantly lower than that in the normal specimens, while TGF-β1 protein level were higher in the carcinoma specimens. DPC4 expression was related with the tumor size, clinical stages, differentiation degree and lymph node metastasis, while TGF-β1 expression was related with the clinic stage, differentiation degree and lymph node metastasis. There existed a close correlation between DPC4 and TGF-β1 expression ($\chi^2 = 3.95$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: DPC4 and TGF-β1 are the capital factors in TGF-β transduction pathway. Low-expression of DPC4 and over-expression of TGF-β1 may serve as an index for unfavorable prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Deleted in pancreatic carcinoma locus 4; Transforming growth factor-β 1; *In situ* hybridization; Immunohistochemistry

Zhang DW, Yang WL, Yao Q. Expression of deleted in pancreatic carcinoma locus 4 and transforming growth factor-β1 in human colorectal carcinoma and their clinical significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1885-1889

摘要

目的: 探讨大肠癌组织中DPC4和TGF-β1的表达及其与大肠癌肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期及细胞分化程度等的关系。

方法: 2005-1/2005-12大肠癌手术切除标本48例, 原位杂交和免疫组织化学方法分别检测DPC4和TGF-β1 mRNA及蛋白表达。

结果: DPC4 mRNA在大肠癌组织中的表达相对正常组织较低(52.1% vs 72.9%, $P < 0.01$), 其表达程度与肿瘤大小、细胞分化程度、临床分期、淋巴结转移有关。TGF-β1 mRNA在大肠癌中呈高表达(68.8% vs 41.7%, $P < 0.01$), 与细胞分化程度、临床分期、淋巴结转移有关。DPC4蛋白在大肠癌组织表达程度显著低于正常组织($P < 0.01$), 其表达程度与肿瘤大小、细胞分化程度、临床分期、淋巴结转移有关。

背景资料

我国大肠癌的发病人呈逐年增高的趋势, 其发生发展的分子基础仍不清楚, 未发现与大肠癌发生、预后直接有关的基因。TGF-β信号转导通路的异常与肿瘤关系密切, TGF-β1是这一家族的主要成员。DPC4/SMAD4是1996年发现的一种新的肿瘤抑制基因, 其所编码的Smad4蛋白是转导TGF-β1信号的重要胞质内信号级联分子, 调节TGF-β1应答基因的转录。

同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■ 研发前沿

大肠癌的防治已成为大肠癌研究的一大热点。寻找与大肠癌发生、发展、预后相关基因和新的干预治疗靶点具有重要意义。

TGF- β 1蛋白在大肠癌组织中呈高表达,与临床分期、淋巴结转移有关。TGF- β 1和DPC4的表达有相关性($\chi^2 = 3.95, P < 0.05$)。

结论: TGF- β 1和DPC4是TGF- β 转导通路中起瓶颈作用的关键因子, TGF- β 1高表达和DPC4低表达可作为大肠癌预后不良的指标。

关键词: 大肠癌; DPC4; TGF- β 1; 原位杂交; 免疫组织化学

张东伟, 杨维良, 姚强. 大肠癌组织抑癌基因DPC4和TGF- β 1的表达意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1885-1889

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1885.asp>

0 引言

近年来,随着人民生活水平的日益提高,我国大肠癌的发患者数呈逐年增高的趋势。转化生长因子 β (TGF- β)是一簇属结构相关的异二聚体多肽,它能够调节细胞增殖、分化、形态形成、凋亡等病理过程及刺激细胞外基质分泌,抑制免疫反应等^[1-5], TGF- β 信号转导通路的异常与肿瘤关系密切。该通路的异常常见于一些来源于上皮细胞肿瘤发展的晚期,并且常与肿瘤的侵袭及转移有关。其中TGF- β 1是这一家族的主要成员。TGF- β 信号可抑制B细胞Ig的合成, TGF- β 1在肿瘤细胞中过表达能够破坏宿主T细胞介导的细胞毒性作用,并引起CTL(cytolytic T cell)反应,纵容了肿瘤的进一步发展^[6-7]。位于染色体18q21.1的抑癌基因DPC4(deleted in pancreatic carcinoma locus4, DPC4)/SMAD4是1996年由美国约翰·霍普金斯大学研究所Hahn *et al*发现的一种新基因。不少学者认为他是一种肿瘤抑制基因^[8-9]。其所编码的Smad4蛋白是转导TGF- β 1信号的重要胞质内信号级联分子,调节TGF- β 1应答基因的转录。Smad4功能失活或表达低下影响TGF- β 1的信号转导并参与肿瘤的形成^[10]。我们采用原位杂交及免疫组化的方法,对大肠癌组织中TGF- β 1和DPC4在mRNA及蛋白水平的表达进行检测,旨在探讨他们与大肠癌发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2005-12手术切除大肠癌标本48例,结肠癌26例,直肠癌22例;年龄23-80(平均52.6)岁;男27例,女21例;术前皆未接受放、化疗。鼠抗人DPC4单克隆抗体[(B-8): sc-7966]购自Santa Cruz公司。兔抗人TGF- β 1抗体购自武汉

博士德公司。S-P试剂盒购自福州MAXIM公司。DPC4原位杂交检测试剂盒和TGF- β 1原位杂交检测试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 方法 免疫组织化学染色(S-P法)阴性对照以PBS缓冲液代替一抗。病理学家单盲法光学显微镜下进行观察。DPC4、TGF- β 1均主要表达在细胞质内,呈棕黄色颗粒。每张切片选择染色良好区域,连续观察10个高倍视野,每个视野至少观察50个细胞,依染色强度分级:0%为阴性(-),5%-25%为弱阳性(+),26%-50%为中度阳性(++),>50%为强阳性(+++)。分子原位杂交操作按照试剂盒说明进行。DPC4和TGF- β 1均主要表达在细胞质内,以胞质或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片选择染色良好区域,随机观察5个高倍视野,每个视野至少观察100个细胞,计数500个细胞中染色阳性细胞数,<10%为“-”, $\geq 10\%$ 为“+”^[11]。

统计学处理 所有数据均用SPSS11.0统计软件分析结果。DPC4/TGF- β 1蛋白表达水平用非参数Ridit检验;DPC4/TGF- β 1 mRNA表达水平用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学表达结果 DPC4蛋白主要表达于细胞质,呈棕黄色染色。癌组织和正常组织都有DPC4蛋白表达,但正常组织表达程度显著高于癌组织,部分癌组织表达缺失(11例)。DPC4蛋白表达程度与肿瘤大小、细胞分化程度、临床分期、淋巴结转移有关,有统计学意义(表1,图1A)。TGF- β 1蛋白与DPC4蛋白一样,主要表达于细胞质,呈棕黄色染色。癌组织和正常组织都有TGF- β 1蛋白表达,但癌组织TGF- β 1蛋白的表达程度明显高于正常组织。TGF- β 1蛋白表达程度与临床分期、淋巴结转移有关,有统计学意义。(表1,图1B)。

2.2 原位杂交表达 大肠癌组织中DPC4的阳性率为52.1%(25/48),正常组织的阳性表达率(72.9%,35/48)高于癌组织,二者相比有显著性差异。镜下可见阳性反应物质主要表达于黏膜细胞的胞质,呈棕黄色染色,间质细胞也有表达。其表达程度与肿瘤大小、细胞分化程度、临床分期、淋巴结转移有关,有统计学意义(表2,图2A)。大肠癌组织中TGF- β 1的阳性率为(68.8%,33/48),癌组织的阳性表达率高于正常组织(41.7%,20/48),二者相比有显著性差异。镜下可见阳

■ 相关报道

研究发现Smad4在多种肿瘤如胆囊癌、口腔鳞癌、膀胱癌等表达下调,并可调控TGF- β 细胞信号传导通路,抑制肿瘤细胞生长。

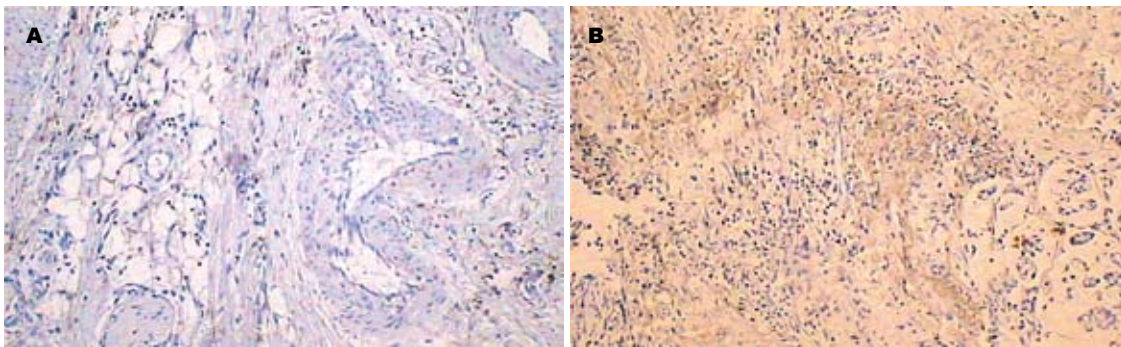


图 1 低分化大肠癌组织黏膜免疫组化结果(SP, ×100). A: DPC4(-); B: TGF-β1(+).

■创新亮点
TGF-β1和DPC4是TGF-β转导通路中起瓶颈作用的关键因子. TGF-β1高表达和DPC4低表达可作为大肠癌预后不良的指标.

表 1 大肠癌及正常组织中DPC4、TGF-β1蛋白表达情况 (n = 48)

组织	DPC4蛋白表达				TGF-β1蛋白表达			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
大肠癌 ^b	11	23	12	2	2	8	22	16
正常		3	21	24	6	21	18	3

^bP<0.01 vs 正常组织.

性反应物质主要表达于黏膜细胞的胞质或胞膜, 偶见胞核着色, 呈棕黄色染色, 阳性颗粒粗细不等. 表达程度与临床分期、淋巴结转移、细胞分化程度有关, 有统计学意义(表2, 图2B). TGF-β1阳性表达的大肠癌组织中, DPC4的阴性率显著高于TGF-β1阴性表达的大肠癌组织中DPC4的阴性率($\chi^2 = 3.95, P < 0.05$), 二者有相关关系(表3).

3 讨论

大肠癌的发生、发展是一个错综复杂的过程, 受到多种相关基因的调控. TGF-β是一簇结构和功能密切相关的活性多肽, TGF-β1是这一家族的主要成员. 在体外已证实TGF-β1能够诱导细胞周期依赖性激酶(CDK)抑制因子的激活, 阻滞细胞由G₁期到S期的进程^[12], 但体内TGF-β1对人类肿瘤发生发展的作用以及肿瘤细胞逃逸其负调控功能的机制还不得而知. Smads介导的TGF-β信号通路大致是: TGF-β成员与TβR I, TβR II复合物结合, TβR II引起TβR I GS区磷酸化, 活化的TβR I 与胞质内R-Smads同源寡聚体短暂结合, 使之C末端SSXS丝氨酸残基磷酸化. 其中Smad1, Smad5和Smad8是BMP的效应分子, Smad2和Smad3是Activin/TGF-β的效应分子. 磷酸化的R-Smads再与Smad4三聚体结合形成异源六聚体或其他形势寡聚体, 移位至细胞核, 与序

表 2 大肠癌组织DPC4/TGF-β1 mRNA的阳性表达 n(%)

临床特征	n	DPC4的表达	TGF-β1的表达
性别			
男	27	16(59.3)	18(66.7)
女	21	9(42.9)	15(71.4)
年龄			
< 60岁	25	14(56.0)	18(72.0)
≥60岁	23	11(47.8)	15(65.2)
肿瘤大小			
≤5 cm	30	20(66.7) ^b	22(73.3)
> 5 cm	18	5(27.8)	11(61.1)
淋巴结转移			
无	14	11(78.6) ^a	13(92.9) ^a
有	34	14(41.2)	20(58.8)
分化程度			
高中分化	28	19(67.9) ^b	15(53.6) ^b
低、未分化	20	6(30.0)	18(90.0)
临床分期			
A+B	13	10(76.9) ^a	12(92.3) ^a
C+D	35	15(42.9)	21(60.0)
部位			
结肠	26	13(50.0)	16(61.5)
直肠	22	12(54.5)	17(77.3)

^aP<0.05, ^bP<0.01.

列特异的DNA结合蛋白结合, 激活特定的靶基因调控转录^[13]. TGF-β1对大肠细胞生长具有双向调节作用, 既可促进细胞生长, 又可抑制细胞生长. 当大肠黏膜炎症时他在上皮细胞和黏膜下层呈高表达, 提示TGF-β1与大肠黏膜炎症活动有关, 而当大肠恶变时他又呈现相互矛盾性的表达, 如在原代培养的转移性大肠癌细胞中TGF-β1的表达增高, 而在中度到高度分化的原位癌的生长则被抑制. 研究发现, 在高分化大肠癌细胞组织培养中加入外源性的TGF-β1, 癌细胞生长受到明显抑制, 而对低分化的大肠癌抑制作用则减弱, 同时大肠腺瘤在向大肠癌的发

■应用要点
DPC4的抑癌功能及调节细胞信号转导通路的功能可被引入肿瘤的基因治疗, 从而使人工调节DPC4水平及干涉其作用通路成为治疗肿瘤的新的有效方法.

■名词解释

DPC4/SMAD4: 1996年由美国约翰·霍普金斯大学研究所Hahn *et al*发现的一种新的肿瘤抑制基因,其所编码的Smad4蛋白是转导TGF- β 1信号的重要胞质内信号级联分子,调节TGF- β 1应答基因的转录。

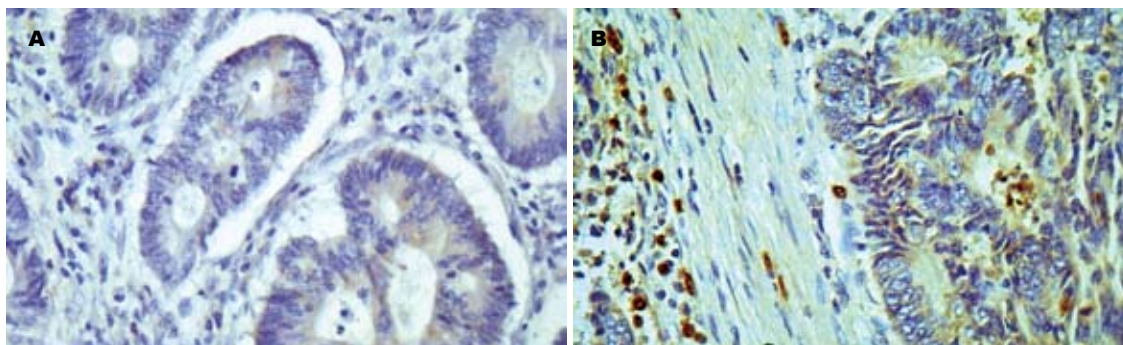


图 2 大肠癌组织黏膜(SP, $\times 200$). A: 高分化DPC4(-); B: 低分化TGF- β 1(+).

表 3 大肠癌组织DPC4和TGF- β 1表达的关系

TGF- β 1	DPC4	
	+	-
+	14	9
-	11	4

$$\chi^2 = 3.95, P < 0.05$$

展过程中TGF- β 1呈反应性下降. Shim *et al*^[14]在分析121例大肠癌患者血浆中TGF- β 1水平认为,在肠肿瘤进展期这种矛盾转化,是肿瘤细胞对TGF- β 1的不敏感反应,可能是由于TGF- β 1信号通道的失活.而癌细胞的生物学特性也正是由于受体缺失或性质的改变,失去TGF- β 1的生长抑制反应.目前认为,TGF- β 1在肿瘤的发展中扮演了双重角色,早期当细胞对TGF- β 1的抗增殖效应仍有反应时,TGF- β 1起着肿瘤抑制作用;而在恶性演进期,当细胞获得了对TGF- β 1生长抑制作用的耐受性时,肿瘤细胞可分泌大量的TGF- β 1,通过改变肿瘤组织的微环境,如诱导肿瘤血管生成,提高肿瘤细胞的运动能力,免疫抑制及胞外基质的合成等来促进肿瘤的发展及转移^[15]. Mamot *et al*^[16]研究了SMAD4在早期大肠癌(I、II期)的潜在相关性.在大量的DNA样本中,73例存在SMAD4基因的一个等位基因缺失,用PCR方法分析了这73例样本,其中只有2例有点突变,表明抑癌基因SMAD4在早期大肠癌中很少发生突变.瑞士巴塞尔大学医院研究小组指出,如果患者的肿瘤中检测到DPC4这种基因,则化疗对其有益的可能大了3倍^[17].许多大肠癌因为肿瘤已对化疗有了抵抗性,因而对化疗没有反应.DPC4基因抑制了开始失去控制的分裂的细胞,因此能抗肿瘤.他们用实时-定量-PCR法分析了202名已接受标准治疗(包括5-FU)的大肠癌患者的肿瘤标本,得出结论,DPC4在大肠癌患

者中可作为以5-FU为基础的化疗方式的预测性的标志物.另外研究表明DPC4失活与大肠癌的恶性进展,如远处转移有关^[18-19].从本实验结果看,随着大肠癌的转移及分化程度的降低,DPC4的阳性率明显下降.

对TGF- β 1反应性降低或丢失在大肠癌的演进过程中是一个重要事件,这主要涉及到TGF- β 1信号通路组成元件的异常.DPC4在TGF- β 1信号转导中具有关键作用,其缺失或突变可使细胞对TGF- β 1的生长抑制产生耐受,促进肿瘤的发展.不少学者认为,DPC4基因的缺失或突变发生在肿瘤进展的后期,属于晚期分子事件,并与肿瘤的浸润和转移密切相关^[20-23].而DPC4在大肠癌中的低表达则提示,TGF- β 1抑制肿瘤生长的转导通路被阻断,这种阻断作用在转录过程中以及显现.这种阻断作用可能同时还是TGF- β 1在肿瘤中高表达的原因:由于大肠癌组织细胞失去了对TGF- β 1的敏感性,导致TGF- β 1的反馈性表达升高;而升高的TGF- β 1表达失去抑制肿瘤生长的作用,却没有丧失对NK, LAK等免疫细胞的抑制作用,因此TGF- β 1高表达和DPC4低表达可能促进肿瘤细胞发生免疫逃逸.此外,DPC4还具有一些独立于TGF- β 1的功能,如DPC4具有调节细胞黏附和侵入的潜在功能,以及抑制肿瘤的血管增殖的能力等^[24-25].因此我们认为,DPC4的低表达也可能独立促进肿瘤的浸润及转移,DPC4可被视为一个独立的肿瘤抑制因子.本结果显示,TGF- β 1阳性表达的大肠癌组织中,DPC4的阴性率显著高于TGF- β 1阴性表达的大肠癌组织中DPC4的阴性率,提示DPC4基因的缺失或突变阻断了TGF- β 1抑制肿瘤生长的转导通路,而这种阻断作用又可能通过负反馈作用使肿瘤细胞分泌TGF- β 1增加,二者可能共同调节恶性肿瘤的发生发展及生物学行为.总之,本实验结果显示,TGF- β 1信号转导

通路的紊乱可使细胞逃避TGF-β1介导的生长抑制效应, 在大肠癌的演进过程中起到了重要作用. DPC4的减少与大肠癌的恶性程度与发展过程有直接的关系^[26]. 因此, 分析大肠癌组织标本中TGF-β1和DPC4的表达情况, 对于评估大肠癌的发展及预后判断具有重要意义, 也为临床治疗大肠癌提供了一条新的思路.

4 参考文献

- Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647
- Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res* 2007; 67: 9694-9703
- Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *2008 Feb 8. [Epub ahead of print]*
- Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson ML. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97: 409-415
- Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianale G, Piccirelli A, Piccirilli M, Perrotti V, Rubini C, Piattelli A, Muraro R. Loss of expression of TGF-beta1, TbetaRI, and TbetaRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2008; 32: 323-331
- Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159: 4155-4164
- Kehrl JH, Taylor A, Kim SJ, Fauci AS. Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 628: 345-353
- Cao WX, Cheng QM, Fei XF, Li SF, Yin HR, Lin YZ. A study of preoperative methionine-depleting parenteral nutrition plus chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 255-258
- Pizzi S, Azzoni C, Bassi D, Bottarelli L, Milione M, Bordi C. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer* 2003; 98: 1273-1282
- Ijichi H, Ikenoue T, Kato N, Mitsuno Y, Togo G, Kato J, Kanai F, Shiratori Y, Omata M. Systematic analysis of the TGF-beta-Smad signaling pathway in gastrointestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 350-357
- Hirayama D, Fujimori T, Satonaka K, Nakamura T, Kitazawa S, Horio M, Maeda S, Nagasako K. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in the penetrating type of early gastric cancer. *Hum Pathol* 1992; 23: 681-685
- Crivello A, Giacalone A, Vaglica M, Scola L, Forte GI, Macaluso MC, Raimondi C, Di Noto L, Bongiovanni A, Accardo A, Candore G, Palmeri L, Verna R, Caruso C, Lio D, Palmeri S. Regulatory cytokine gene polymorphisms and risk of colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 98-103
- Datto M, Wang XF. The Smads: transcriptional regulation and mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 37-48
- Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB. Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* 1999; 85: 554-561
- Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186: 153-168
- Mamot C, Mild G, Reuter J, Laffer U, Metzger U, Terracciano L, Boulay JL, Herrmann R, Rochlitz C. Infrequent mutation of the tumour-suppressor gene Smad4 in early-stage colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 420-423
- Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, Rochlitz C. SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 630-634
- Isaksson-Mettävainio M, Palmqvist R, Forssell J, Stenling R, Oberg A. SMAD4/DPC4 expression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 507-510
- Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, Datta PK, Washington MK, Beauchamp RD, Dhawan P. Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1571-1579
- Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* 2001; 18: 265-270
- Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003; 2: 15
- Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003; 186: 279-286
- Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 7
- Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Dreschers S, Kalthoff H, Hahn SA, Schmiegel W. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999; 18: 3152-3158
- Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9624-9629
- Xu WQ, Jiang XC, Zheng L, Yu YY, Tang JM. Expression of TGF-beta1, TbetaRII and Smad4 in colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2007; 82: 284-291

■同行评价

本研究内容全面, 目的明确, 论述条理, 具有一定的临床应用价值.

编辑 潘伯荣 电编 吴鹏朕

无痛内镜术在胃肠道疾病诊治中的应用

徐贵森, 吴晓玲, 刘合年

■背景资料

现代社会的发展对医疗服务提出了更高的要求, 越来越多的患者在需要进行消化内镜下诊治时选择无痛技术, 无痛内镜技术的开展也体现了麻醉技术的发展和对他的人文关怀。

徐贵森, 刘合年, 中国人民解放军成都军区总医院麻醉科 四川省成都市 610083

吴晓玲, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

作者贡献分布: 徐贵森与吴晓玲对此文所作贡献均等; 文献采集归纳由吴晓玲完成; 写作由徐贵森完成; 刘合年审核; 吴晓玲修改。

通讯作者: 吴晓玲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科。wxllady@163.com

电话: 028-86570709

收稿日期: 2008-02-08 修回日期: 2008-04-15

Application of painless endoscopy in the diagnosis and treatment of gastrointestinal diseases

Gui-Sen Xu, Xiao-Ling Wu, He-Nian Liu

Gui-Sen Xu, He-Nian Liu, Department of Anesthesiology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu military command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. wxllady@163.com

Received: 2008-02-08 Revised: 2008-04-15

Abstract

Along with the great improvement of life quality, more and more patients prefer painless endoscopy to traditional endoscopy. Most clinical researches have demonstrated the feasibility and safety of painless endoscopy under intravenous anesthesia. By painless endoscopy, doctors are able to give more precise observation of the gastrointestinal tract, make earlier diagnosis of gastric carcinoma, esophagus carcinoma or colon carcinoma. The patients could get more comfortable medical intervention. Various methods are available for intravenous anesthesia in painless endoscopy, such as propofol used alone, or propofol in combination with fentanyl, ketamine or midazolam, etc. All of the painless endoscopy methods have few side effects and can be applied according to specific clinical situations.

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

Key Words: Painless endoscopy; Gastrointestinal diseases

Xu GS, Wu XL, Liu HN. Application of painless endoscopy in the diagnosis and treatment of gastrointestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1890-1896

摘要

随着人民生活质量的提高, 越来越多的消化科患者在就诊时选择无痛内镜检查。大量临床研究证实静脉麻醉下实施无痛内镜检查和治疗是安全可行的。患者在麻醉状态下接受诊治, 医生可以更仔细地观察胃肠道的细微病变, 更从容地进行内镜下治疗。医生可以对食管癌、胃癌、结肠癌做出更早期的诊断, 患者也可接受更为舒适的检查和治疗。临床采用的静脉麻醉方法很多, 常用的有单用丙泊酚、丙泊酚与芬太尼、酮替芬、咪唑安定联用等方案, 可根据临床实际情况合理选用。

关键词: 无痛内镜; 胃肠道疾病

徐贵森, 吴晓玲, 刘合年. 无痛内镜术在胃肠道疾病诊治中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1890-1896

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1890.asp>

0 引言

电子内镜(包括胃镜与肠镜)是诊断消化道疾病的主要方法之一, 是最主要与最可靠的无创或微创现代化诊疗手段。电子内镜通过高分辨率的光导纤维和冷光源深入消化道内部, 不仅可以清晰、直接地观察消化道的病变, 将病变图像放大显示在电脑屏幕上, 便于保存患者病理资料以动态观察对比病情发展变化, 更方便部分疑难复杂病例的回顾分析与远程会诊讨论, 因而诊断的准确性非常高, 特别是对早期食管癌、胃癌、结肠癌的诊断是其他检查方法所不能替代的; 此外, 通过电子内镜还可直接进行微波或高频电凝、电切止血, 食管胃底曲张静脉套扎、硬化剂注射, 异物取出, 支架置入, 消化道狭窄气囊、水囊扩张术等微创治疗, 多年来

在消化系统疾病诊治中占有极其重要的位置。近年发展起来的胶囊内镜由于价格昂贵, 难以人为控制内镜走向和观察范围, 不能进行内镜下治疗等原因, 目前主要用于临床常规方法难以确诊的小肠疾病的诊断^[1-10], 因此, 电子胃镜与肠镜在消化道疾病诊治中仍将处于主导地位。

1 传统内镜诊治术的痛苦

由于电子胃镜、肠镜检查为侵入性操作, 长期以来仅在黏膜表面麻醉下进行, 胃镜置入口腔后刺激咽后壁, 多数患者会出现咽部不适、恶心、呕吐、呛咳、流涎、流涕, 甚至躁动不安、咽喉黏膜损伤出血、憋气、喉头痉挛等危险症状, 造成患者紧张焦虑和恐惧而不能配合完成检查, 不少患者因此逃避或拒绝胃镜检查, 从而延误病情、贻误治疗时机^[11]。内镜操作的刺激还可使受检者循环系统发生较大的波动, 个别严重的应激反应可造成心肺功能损害, 这对于原有心脑血管疾病的患者极为不利, 检查质量也难以得到有效保证^[12-13]。另外, 内镜下治疗技术常常需要患者较长时间的配合, 部分患者因难以坚持而最终放弃治疗。在某些特殊病例, 例如小儿无法与医务人员合作, 犯人自行强吞牙刷、刀片、勺子等异物企图自杀而又拒绝治疗等, 都使普通胃镜难以胜任。

研究表明, 胃溃疡的癌变率非常高, 特别是无痛性、无症状性胃溃疡, 因不易被发现而更具危险性。我国目前早期胃癌的诊断率还远远低于日本等发达国家, 其原因之一, 就是人群普遍不愿接受痛苦的胃镜检查, 许多胃癌患者在症状严重到无法忍受时才来就诊, 而此时往往已经失去手术时机。临床推广无痛胃镜检查将扩大胃镜的适应证, 发现更多的早期胃癌。结肠癌目前位列恶性肿瘤的第五位、胃肠道恶性肿瘤的第二位, 增长速度非常快, 60%发生于直肠、直肠与乙状结肠交界处, 常常来源于直肠绒毛状腺瘤的恶变, 预后很差, 而直肠绒毛状腺瘤可在内镜下早期诊断并经电凝切除而治愈。目前胃肠道的早期癌变还是常规体检项目(腹部B超、胸透、肝功能)所不能发现的, 随着人们保健意识的增强, 许多人已经开始逐渐接受胃镜、肠镜检查为健康体检项目。目前在大型综合医院的内镜镜中心, 相当多的人不是因为有胃肠道症状来做胃肠镜检查, 而是为了健康体检而进行胃肠镜检查, 在这部分健康体检者中, 也发现不少无症状的或早期的消化道疾病存在, 如: 胃肠道息肉、溃疡、

早期恶性肿瘤等。但痛苦的胃肠镜检查过程令许多体检者望而生畏, 以至错过消化道疾病的亚临床诊断时机。

即使对于那些能够配合胃镜检查的患者, 其诊治效果也有明显不同。临床观察发现, 普通胃镜术检出的胃炎患者伴胆汁反流的比例(35/102)远远高于无痛胃镜术(9/98), 其重要原因在于普通胃镜检查导致受检者强烈的呕吐反应, 内镜下出现胆汁反流的假象, 而无痛胃镜术消除了受检者的恶心呕吐反应, 能够更真实地反映患者胃肠道蠕动和病变情况, 避免不必要的治疗和医疗资源浪费。同时, 普通内镜检查不仅可带给患者巨大的痛苦, 也可影响检查者的诊断质量。有报道说, 结肠镜检查中如果退镜时间少于6 min, 将有1/3的结肠息肉被漏诊。部分检查者为了缩短患者痛苦时间, 来不及仔细观察就匆匆退镜, 达不到满意诊断所需的最低时间, 许多隐蔽的角落无法仔细观察, 导致疾病的漏诊和误诊。在无痛内镜下, 检查者可以更加从容细致地观察胃肠道的细小病变, 最大限度地消除检查盲区, 从而达到更高的诊断率。

结肠镜对结肠的检查直观而确切, 甚至可通过回盲瓣插入回肠末端进行观察和取活组织检查, 其病理发现率和优越性远远超过钡剂灌肠检查。成人结肠长度约140 cm, 位于盲肠与直肠之间, 呈“门”形围绕小肠周围, 依其所在位置及形态结构分为4部分: 升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠。结肠的解剖位置曲折迂回, 其弯曲角度生理变异非常大。检查前的肠道准备使结肠充盈欠佳, 肠蠕动过快, 结肠扭曲结圈及肠镜经过肝曲、脾曲时的痉挛性刺激使检查时间较长, 部分受检者难以承受其痛苦而放弃, 影响诊疗效果^[14]。在肠镜操作中, 肠管被牵拉、刺激、人为肠祥或肠腔的扩张、痉挛等, 可激惹中枢神经系统引发强烈的植物神经反射及骨骼肌痉挛, 如心率加快、血压升高、心律紊乱、恶心呕吐、出汗便意, 强烈疼痛时甚至可引起心跳骤停。疼痛是机体通过感觉神经防御伤害性刺激最为敏感的一种反应, 现代社会随着人们文化阅历的不断提高, 对疼痛的敏感性也随之提高, 越来越不能适应和耐受有痛苦的创伤性检查^[15]。

2 无痛内镜术临床方案

随着人们对生活质量要求的提高, 就诊时要求安全、舒适、无痛苦、副作用少的检查, 无痛内镜术应运而生。要让患者在浅睡眠的“好

■ 研发前沿

国内外开展的以丙泊酚为基础的静脉麻醉方案作为无痛内镜诊治术经临床实践证明是安全有效的, 各种方案均可获得满意的麻醉效果, 且并发症和副作用少。

■创新盘点

近年来,无痛内镜术在各级医院均有开展,报道的临床方案和不良反应各有差别,本文首次对无痛内镜术的麻醉方案、药物配伍原理、操作注意事项及处理等内容作了较全面的归纳和系统的阐述。

梦”中完成检查和治疗,不仅能够大大提高胃肠道早期疾病的诊治率,也顺应了为患者提供人文关怀、无痛苦服务的现代需要。现代麻醉术诱导更迅速、平稳,麻醉后苏醒快而安全,使无痛内镜术应用于临床成为可能。

在许多发达国家,无痛内镜已经成为临床常规操作而普遍开展,国内也有越来越多的医院开展无痛内镜术,即利用安全有效的麻醉方法以消除患者的恶心、呕吐、咳嗽、疼痛等不适^[16-20],在麻醉状态下实施胃镜肠镜检查和治疗,解除患者的焦虑、紧张、恐惧情绪^[21-25],提高安全性和舒适性^[26-30],提高检查的准确率^[31-35]。无痛内镜技术要求安全可靠,起效快、苏醒迅速而完全、平稳,且无不良反应,整个操作过程中患者舒适、安静、无痛苦。无痛内镜技术的核心为镇静药物的应用及检查适应症的选择,术前仔细询问病史、严格掌握适应症是其成功的前提;而判断和掌握镇静程度是无痛术成功的关键。

近年来,丙泊酚(异丙酚, propofol)、芬太尼(fentanyl)、氯胺酮(ketamine)等静脉麻醉药常被用于无痛内镜术中。丙泊酚作为新型静脉麻醉药,是临床上常用的倍受推崇的可控性强的静脉麻醉药,具有速效、短效,苏醒快而完全,持续输注后无蓄积,且有抗呕吐、毒性小等特点,具有其他静脉麻醉药或麻醉性镇痛药无可比拟的优点,特别适用于无痛内镜术,备受国内外内镜工作者的青睐,大量的临床研究已肯定了他在无痛内镜术中应用的安全性^[36-38]。丙泊酚还能够抑制平滑肌细胞磷酸二酯酶活性,拮抗多巴胺D₂受体,使胃肠道平滑肌蠕动减弱,有利于内窥镜的置入、观察、活检以及微波高频烧灼等治疗,不仅消除了患者难以忍受的痛苦,更使操作易于进行,大大缩短操作时间,提高检查成功率,减少并发症。所以,丙泊酚静脉麻醉是实行无痛胃肠内窥镜诊治术的重要手段之一^[39]。但单独使用丙泊酚剂量较大,所需剂量达2.0-2.5 mg/kg,甚至可超过3.0 mg/kg,该药成本高,对呼吸循环系统还有剂量依赖性的抑制作用,能使呼吸频率减慢,降低血压、减慢心率。芬太尼属于强效镇痛药,对心血管系统副作用少、易被纳络酮拮抗,可降低心肌耗氧量,减少内镜操作导致心脏意外的可能性,也很适合于无痛内镜诊治术。

临床实践中常用的有单用丙泊酚,以及丙泊酚与其他镇静药、静脉麻醉药联用的各种方

案^[40]。如何选择合理的药物配伍,找出最佳的复合用药,即用药量小、内镜操作过程平稳、苏醒快、呼吸循环功能稳定、副作用少,达到满意的麻醉效果和较快的苏醒速度,是需要麻醉科学深入探讨的问题。

有研究者分别观察了150例接受胃镜检查的患者,研究常规胃镜检查以及不同静脉麻醉药物单用或联用的麻醉效果^[41]。这些患者分为5组,每组各30例,A组为异丙酚,B组为芬太尼和异丙酚,C组为咪唑安定和异丙酚,D组为氯胺酮和异丙酚,E组为传统胃镜。5组患者的性别、年龄、体质量、美国麻醉学会分级(ASA)、胃镜检查时间等均无显著差异。观察结果表明接受无痛胃镜检查的患者对检查过程均无知晓,恶心呕吐、流涎、躁动等不适反应少或无,术后满意度高,与传统胃镜检查组相比优势显而易见。另外,无痛胃镜组心血管变化也明显优于传统胃镜组。传统胃镜组检查中、检查后患者心率明显增快,血压明显升高,对于原有心血管疾病的患者是很危险的。无痛胃镜的4个组中只有D组患者的心率在检查中与检查前相比增快较明显,可能是氯胺酮的兴奋交感神经的副作用所致,并且D组部分患者醒后诉说有不良的幻觉、噩梦,感觉稍差,苏醒时间也相对较长;A组苏醒最快,只是异丙酚用量较大,患者注药时疼痛、检查中做美梦者居多;C组苏醒时间、药物起效时间较快,但认知能力恢复较慢,与咪唑安定的镇静、催眠、顺行性遗忘作用有关;B组仅有1例注药部位疼痛,1例血压较度下降,心率降至50次/min,经给阿托品0.5 mg后立即得到纠正,该组满意度、复检意向最多。由此可见,无痛术选择联合用药,既减少了药物用量,又能发挥不同镇静、麻醉药物之间的协同作用,降低甚至消除药物的副作用,使操作更便捷,患者更舒适、安全,术后恢复时间更短。作者认为联合应用芬太尼和异丙酚、咪唑安定和异丙酚的优势更多,而单用异丙酚或氯胺酮联用异丙酚均不推荐。

另有研究者^[42]观察异丙酚分别联合芬太尼和咪唑安定的麻醉效果,分别静注小剂量芬太尼和咪唑安定2 min后,静注异丙酚1.6 mg/kg至睫毛反射消失,在达到同等麻醉深度时,异丙酚-芬太尼麻醉组患者对胃镜置入的耐受性增加,胃镜经过咽腔时置入过程平稳。因为芬太尼是麻醉性镇痛药,小剂量芬太尼能有效抑制来自咽喉部的刺激,其机制可能是芬太尼与孤束核及第9、10颅神经核的阿片受体结合抑制了咽

腔的伤害性刺激, 且异丙酚与芬太尼复合应用时药物之间具有协同作用, 能够增强催眠作用, 达到满意的麻醉效果. 所以胃镜经过咽腔时本组所有患者无1例出现体动、屏气等不良反应. 而咪唑安定为水溶性苯二氮卓类, 虽然能增强异丙酚的中枢镇静效果及遗忘作用, 但其对不良刺激的抑制程度较差, 不能完全抑制胃镜经过咽腔时的强烈应激反应. 因此异丙酚-咪唑安定联合麻醉组的部分患者出现了体动、屏气、咳嗽, 使胃镜不能顺利通过咽部, 需要追加异丙酚用量. 在胃镜操作时间两组间无明显差异的前提下, 由于芬太尼并不延长异丙酚的苏醒时间, 而咪唑安定的镇静作用时间相对偏长, 因此, 异丙酚复合芬太尼与复合咪唑安定用于无痛胃镜检查相比, 前者麻醉效果更满意, 苏醒更迅速, 是更为理想的麻醉选择.

异丙酚复合咪唑安定或芬太尼麻醉应用于胃镜检查, 均可消除患者紧张焦虑情绪, 提高检查耐受性, 使患者本人对整个检查过程无记忆、无痛苦. 同时由于麻醉状态下胃肠蠕动缓慢, 便于发现微小病变, 也减少了患者因痛苦产生的不自觉骚动引起的机械性损伤的发生. 咪唑安定可以产生剂量依赖性遗忘、抗焦虑、催眠、肌松和镇静作用, 联合丙泊酚使用不仅可以消除受检者紧张、恐惧心理, 还可抑制迷走神经反射, 避免循环系统发生较大的波动, 但咪唑安定的缺点是镇痛作用不明显, 而芬太尼有强效镇痛作用, 与异丙酚合用, 不但增强了麻醉效果, 而且减少了药物用量, 缩短了诱导及苏醒时间, 达到了满意的麻醉效果^[43-44].

但也有不同结论. 有研究者观察单用丙泊酚、丙泊酚联用氯胺酮、丙泊酚联用芬太尼用于无痛胃镜检查的麻醉效果, 认为氯胺酮与丙泊酚伍用可发挥两者的协同作用, 氯胺酮可加强丙泊酚镇痛作用的不足, 且抵消其对呼吸循环功能的抑制, 而丙泊酚又能消除氯胺酮的梦幻等不良反应, 检查术中的BP、HR、SPO₂、清醒时间、离院时间与单独使用丙泊酚均无显著性差异^[45]. 作者认为这与氯胺酮有较强的镇痛作用, 且苏醒快, 小剂量对呼吸循环功能影响较小, 对交感神经有兴奋作用有关. 芬太尼伍用丙泊酚, 增强了丙泊酚的镇痛效果, 但两种药物都有一定的呼吸循环抑制作用, 多数患者检查过程中有BP、HR、SPO₂的下降, 经给氧后可自行改善, 但清醒时间、离院时间、头昏嗜睡等不良反应无显著差异. 该作者认为单纯丙泊酚、丙

泊酚与氯胺酮、丙泊酚与芬太尼用于无痛胃镜检查均可获得满意的麻醉效果, 但以氯胺酮伍用丙泊酚更为安全有效, 建议将氯胺酮伍用丙泊酚作为无痛胃镜术的理想麻醉用药方案.

也有研究者将异丙酚、咪唑安定、芬太尼三药联合用于胃镜检查麻醉, 其效果可靠, 但麻醉作用时间更加短促, 要求严格掌握给药时间与检查时机的紧凑配合, 使操作恰好在药效的高峰期中进行^[46].

近来也有人主张使用阿芬太尼及雷米芬太尼, 是因为他们的安全指数更宽, 苏醒时间更短, 呼吸抑制作用更少, 血液动力学更稳定. 但由于某些新型药物价格昂贵等原因, 难以在大多数医院普遍开展应用.

瑞芬太尼是一种起效迅速、作用消退快、镇痛作用强的 μ 阿片受体激动药. 与芬太尼比较具有起效更快、作用时间更短暂的特点. 有研究者认为将其与丙泊酚联合用于无痛肠镜检查更为安全可行, 优于芬太尼与丙泊酚联用方案^[47].

3 无痛内镜术的适应证、禁忌证

尽管无痛内镜术具有以上种种优越性, 但所有的镇静、麻醉药都可能影响患者生理功能的稳定性, 而胃镜、肠镜侵入性操作又使患者生理功能处于应激状态, 因此严格掌握无痛内镜术的适应证和禁忌证是十分必要的.

无痛内镜术的适应证: 有胃镜、肠镜检查适应证但恐惧常规胃镜、肠镜检查者; 精神高度紧张及恐惧心理; 剧烈呕吐或其他原因难以完成常规胃镜肠镜检查者; 有癫痫病史及小儿患者不能合作者; 精神异常患者; 伴有其他疾病而病情需要做胃镜、肠镜检查者, 如: 高血压、轻度冠心病患者; 老年人; 胃癌结肠癌的局部化疗; 食道癌激光治疗; 胃肠道疾病复查、取异物(吞玻璃、钉子、打火机、锁、首饰、项链)等.

无痛内镜术的禁忌或相对禁忌证: 原则上同常规胃镜、肠镜检查禁忌证. 慢性支气管炎肺代偿功能差; 术前血氧饱和度低于90%; 睡眠呼吸暂停综合征; 过敏体质, 尤其是镇静药过敏者; 休克; 孕妇及哺乳期妇女; 容易引起窒息的疾病如支气管炎致多痰者; 急性消化道大出血; 胃潴留、肠梗阻; 严重心动过缓者及严重窦症; 哮喘病; 严重肺心病; 严重贫血(Hb 30-50 g/L); 低血压; 极度衰竭; 严重心、肝、肾疾病; 肝性脑病(包括亚临床期肝性脑病); 神经衰弱; 体形瘦弱; 肥胖颈短; 心动过缓及房室传导阻滞; 严重高血压等.

■应用要点

本文为从事麻醉和消化内镜工作者提供了有益的借鉴和指导, 并根据多年的临床经验提出采取预防和采取措施来提高无痛内镜术的有效性和安全性, 具有临床实用指导意义.

■同行评价

本文综述了无痛内镜术在胃肠道检查中的应用,内容丰富,有一定的临床参考价值。但应进一步提炼,加强条理性,增强可读性。

4 无痛内镜术的不良反应及处理

多数患者除清醒早期如起床过早有轻微头晕外,无其他任何不良感觉。(1)少数患者静注丙泊酚可有注射部位疼痛。预防及处理:尽量选前臂大血管注射,或使用丙泊芬前用5%葡萄糖稀释1倍,减慢注射速度等。(2)心血管系统不良反应:丙泊酚对心血管循环系统有抑制作用,可引起血压下降及心率减慢。注射药物时应减慢速度,必要时可使用阿托品、麻黄素处理。(3)呼吸系统不良反应:舌后坠、打鼾导致血氧饱和度下降。处理:加大氧流量,使患者头部后仰,托起其下颌,保持呼吸道通畅;必要时面罩吸氧或人工呼吸。(4)少数患者静注一定剂量丙泊酚后出现肢体不自主运动,一般增加剂量后可消失。(5)少数患者发生膈肌痉挛、呃逆,但无须处理,很快会消失。操作结束后如患者仍处于睡眠状态或打鼾时,应将患者左侧卧位,便于口腔分泌物及时流出,以防分泌物流入气道引起呛咳或窒息。此外,芬太尼复合麻醉可见心率减慢、血压下降,以收缩压下降更明显,对呼吸也有一定抑制作用,甚至呼吸短暂停顿,一般均可自行恢复,无需特殊处理^[48-49]。

应用异丙酚和芬太尼的无痛术的危险问题,主要是药物对循环、呼吸系统的抑制,表现为血压下降、心率减慢、低氧血症、呼吸减慢,大多数在正常范围,无须特殊处理,术后可迅速恢复^[50-53]。麻醉诱导前静脉滴注林格液(12 mL/kg),可防治血压下降且不引起心率增加,当血压下降时静脉注射麻黄素,心率减慢时静脉注射阿托品均可迅速纠正。如SpO₂明显下降,立即退镜并及时给予面罩加压给氧可纠正。个别可出现呼吸或心跳骤停可能危及患者生命,但经辅助呼吸和心脏兴奋剂及时抢救,也多可迅速复苏而无后遗症;当仅有呼吸变慢甚至暂停,血氧饱和度>70%而无心率变化时,双手按压胸廓数次呼吸可恢复,或加大氧流量,抬高下颌,气囊面罩加压人工呼吸,1-2 min后多可逆转,不要轻易气管插管。异丙酚对心肺功能的影响与剂量、注药速度有关,剂量以1.5 mg/kg为宜,还应根据患者的体质、年龄、饮酒史及基础疾病等情况进行个体化给药,合理控制剂量。一般冠心病者异丙酚安全剂量为(1.5±0.5) mg/kg;对可能发生严重并发症者需多加谨慎,年老体弱者因肠道准备及禁食可能发生虚脱,应于术前补足血容量,异丙酚用量宜小且需缓慢注射。异丙酚的过敏反应表现为过敏性红斑,对激素或非那根治

疗有效。此外,无痛内镜术还可能有癫痫样抽搐、头晕、幻觉等并发症,均为一过性,无生命危险。

注意事项:为确保患者安全,无痛内镜术应严格按照手术室麻醉指南配备检查室:氧气管,充足可靠的吸引,至少能输送90% O₂的自动充气手动复苏器,足够的麻药和设备,符合“基本麻醉监护标准”的足够监视设备,足够的电源插座且需连接应急电源,观察患者和监视的设备保证,足够的照明,为患者、机器、支持设备提供足够大的空间,心脏紧急除颤器等。时刻做好准备,以应付随时发生的紧急情况,制定和随时修改方案,防患于未然。

在操作过程中应注意:(1)检查前详细了解患者情况,对患有多种重要脏器疾病、一般情况较差而且目前诊断等情况不明者,不应贸然施行无痛内镜术。(2)应由具有熟练麻醉基本知识及心肺复苏技能的麻醉师与技术熟练的内镜医师共同进行,两者良好的配合可缩短操作时间,减少用药量、并发症及危险发生率。静注药物时要慢推以防止静脉炎,要边注药边密切观察患者病情。(3)进镜动作要轻柔,进入口腔内如发现分泌物较多应先吸净,在口腔内少注气、不注水,以免引起呛咳、误吸。术中应严格监测血压、心率、呼吸、血氧饱和度,常规鼻导管给氧。(4)若操作时间长,可适量追加丙泊酚。老年人的丙泊酚剂量要适当减小,并注意保持呼吸道通畅,因其易合并呼吸暂停或血氧饱和度降低;体质量超重或特别紧张的患者用药量可适当偏大。(5)术前向患者讲明无痛术的操作程序和注意事项有助于缓解其紧张情绪。(6)术后观察30-60 min待患者完全清醒后方可离开,需家属陪同,术后当天不能驾车,不能从事高空作业或操作重型机器,以免发生意外。

5 结论

随着经济水平的提高,人们追求无痛化、舒适化医疗服务的倾向日益强烈。在静脉全麻下实施胃镜、肠镜检查和治疗已逐渐被民众所接受,且为消化专科医生提高临床诊治水平提供了有益的帮助。以丙泊酚为基础的麻醉方案作为无痛内镜诊治术经临床实践证实是安全有效的^[54-70],各种方案均可获得满意的麻醉效果,实践操作中可根据内镜中心配备的复苏设备、麻醉师的经验以及药物来源等灵活选用,既保证患者安全平稳地承受内镜下诊治,又不过度增加其经济负担。无论采用哪种方案,常备急救器

械及药品都是非常必要的. 在操作中严密监测血压、心率、脉搏、血氧饱和度, 是提高无痛内镜诊治技术的成功率和安全性的关键. 无痛内镜诊治技术的研究和临床应用, 相信会随着静脉麻醉药和现代麻醉方案的发展而不断完善.

6 参考文献

- Krstić MN, Martinov J, Krstić SN, Saranović DJ, Lausević Z, Milosavjević T, Jovanović I, Alempijević T, Marisavljević D, Pesko P. The role of wireless capsule endoscopy in the evaluation of patients with suspected small bowel bleeding: a single center experience. *Acta Chir Iugosl* 2007; 54: 25-33
- Rondonotti E, Villa F, Mulder CJ, Jacobs MA, de Franchis R. Small bowel capsule endoscopy in 2007: indications, risks and limitations. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6140-6149
- Kalantzis C, Apostolopoulos P, Mavrogiannis P, Theodorou D, Papacharalampous X, Bramis I, Kalantzis N. Capsule endoscopy retention as a helpful tool in the management of a young patient with suspected small-bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1289-1291
- Kovács M, Pák P, Pák G, Fehér J. Screening and surveillance for hereditary polyposis and non-polyposis syndromes with capsule endoscopy. *Orv Hetil* 2008; 149: 639-644
- Spada C, Riccioni ME, Familiari P, Marchese M, Bizzotto A, Costamagna G. Video capsule endoscopy in small-bowel tumours: a single centre experience. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 497-505
- Kurella RR, Ancha HR, Ancha HB, Lightfoot SA, Guild RT, Hartly RF. Obscure GI bleeding due to gastrointestinal stromal tumor (GIST) diagnosed by capsule endoscopy. *J Okla State Med Assoc* 2008; 101: 35-37
- Cellier C. Obscure gastrointestinal bleeding: role of videocapsule and double-balloon enteroscopy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 329-340
- Wei W, Ge ZZ, Gao YJ, Hu YB, Xiao SD. An analysis of failure and safety profiles of capsule endoscopy. *Zhonghua Neike Zazhi* 2008; 47: 19-22
- Niv Y. Efficiency of bowel preparation for capsule endoscopy examination: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1313-1317
- Nakamura T, Terano A. Capsule endoscopy: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2008; 43: 93-99
- 毛登明, 高采平, 彭燕, 李昌平, 唐世孝, 杜国莲. 无痛胃镜临床应用体会(附370例报告). *泸州医学院学报* 2005; 28: 339-341
- 庞家武, 黄永昌, 蒙春霞. 无痛胃镜126例临床研究. *华夏医学* 2007; 20: 1217-1219
- 张树兵, 任建刚. 1200例无痛胃镜检查治疗体会. *西南军医* 2007; 9: 147-148
- 方丹青. 全身麻醉用于无痛肠镜检查可行性的临床探讨. *中国医药学刊* 2005; 1: 13-15
- 骆泉, 罗文文, 潘柏森. 无痛肠镜与普通肠镜检查临床分析. *现代中西医结合杂志* 2007; 16: 3986
- 王之标. 无痛胃镜检查在胃食管返流病诊断上的应用研究. *基层医学论坛* 2006; 10: 1060
- 陈仁军, 胡春涛, 倪辉. 无痛胃镜检查术的临床应用. *中国现代医生* 2007; 45: 29
- 沈雁冰, 郑纯梅. 无痛胃镜技术的安全隐患因素及其对策探讨. *现代预防医学* 2007; 34: 4396-4397
- 王波, 方芬, 殷新光, 杨志宏, 阮水良, 季霞, 王敏娟, 石柱枝. 无痛胃镜检查技术临床应用价值探讨. *浙江中西医结合杂志* 2007; 17: 357-358
- 胡思光, 毕新生, 梅华, 刘文领. 异丙酚复合芬太尼或咪唑安定用于无痛肠镜的对比观察. *赣南医学院学报* 2007; 27: 55-57
- 尚铁军. 丙泊酚复合雷米芬太尼静脉麻醉在无痛肠镜检查中的应用. *中国伤残医学* 2007; 15: 43-44
- 苏洪清. 咪唑安定复合异丙酚用于老年患者无痛肠镜的效果观察. *江西医药* 2007; 42: 339-340
- 韩劲松. 芬太尼复合丙泊酚在无痛肠镜检查中的应用. *江苏医药* 2007; 33: 627
- 姜景卫. 丙泊酚不同配伍在无痛肠镜检查中的对比观察. *当代医学(学术版)* 2007; 112: 114-115
- 陈友伟, 李素芝, 彭华, 陈强. 异丙酚在无痛肠镜中的应用. *西藏科技* 2007; 9: 48
- 农光, 李泽均, 黄伟芝, 罗正同, 周育华. 依托咪酯复合芬太尼在老年人无痛肠镜检查和治疗的应用. *广西医学* 2007; 29: 1542-1543
- 骆泉, 罗文文, 潘柏森. 721例无痛肠镜检查结果分析. *浙江实用医学* 2007; 12: 356-357
- 黄乔东, 卢振和, 高崇荣. 舒芬太尼配伍异丙酚用于无痛肠镜的临床观察. *中国疼痛医学杂志* 2006; 12: 18-20
- 房津辉, 李秀梅, 钱英, 王淑芹, 李银秋, 杨勇. 无痛肠镜检查的临床应用. *黑龙江医学* 2006; 30: 244-245
- 钱耀亮, 陈金生, 黄乔东, 卢振和, 高崇荣. 三联药在无痛肠镜检查和治疗中的应用. *中国医院药学杂志* 2006; 26: 435-437
- 张忠, 雷立芳. 异丙酚与小剂量咪唑安定在无痛肠镜中联合应用的研究. *湖南师范大学学报(医学版)* 2006; 3: 28-30
- 封卫征, 祝义军, 周仁龙, 史东平, 杭燕南. 雷米芬太尼复合丙泊酚在老年患者无痛肠镜检查中的应用. *临床麻醉学杂志* 2006; 22: 342-344
- 郑义, 彭贵勇. 无痛肠镜检查在39例高血压及冠心病患者中的应用. *贵州医药* 2006; 30: 719
- 王莉, 李艳华, 郭强, 唐天云, 宁杰, 李菊兰. 丙泊酚不同方式输注在无痛肠镜检查中的比较. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 135-137
- 莫晨, 徐铭宝, 黄燕苹, 盛梓松, 吴小娥, 李冬梅, 支楠. 应用丙泊酚实施无痛肠镜的临床研究. *武警医学* 2006; 17: 673-676
- 刘福贵, 王晓红, 刘芳. 丙泊酚在无痛电子胃镜检查中的应用. *医药论坛杂志* 2007; 28: 81
- 袁荷梅. 异丙酚静脉麻醉施行无痛胃镜检查的临床观察. *全科医学临床与教育* 2005; 3: 170-172
- 王社军, 韩庆录. 异丙酚麻醉在门诊胃镜检查中的实用性及安全性评价. *中国全科医学* 2005; 8: 1252
- 李雅兰, 王小平, 彭雪梅. 开展丙泊酚无痛胃肠镜术1000例体会. *中国处方药* 2005; 40: 23-24
- 李岩, 孟瑞霞. 麻黄碱与异丙酚、芬太尼配伍用于无痛胃镜的临床观察. *河南外科学杂志* 2007; 13: 36-37
- 单热爱, 廖跃光, 刘金龙, 陈新荣, 魏俊, 黄才斌, 叶军明. 静脉联合用药在无痛胃镜中的应用. *广东医学* 2007; 28: 385-386
- 孟瑞霞, 李岩. 胃镜检查中异丙酚复合芬太尼或咪唑安定的对比. *医药论坛杂志* 2006; 27: 41-43
- 赵宏, 孙艺丹. 异丙酚分别联合芬太尼和咪唑安定应用于无痛胃镜的临床效果评价. *新疆医科大学学报* 2005; 28: 638-642
- 段立杰, 任凤琢, 陈宁. 异丙酚复合芬太尼麻醉用于胃镜检查的临床观察. *武警医学* 2006; 17: 43-44
- 何玉宁. 丙泊酚伍用氯胺酮、芬太尼用于无痛胃镜检查的效果比较. *实用临床医学* 2005; 6: 99-100
- 王东红, 王静杰, 王志军. 胃镜检查中全凭静脉麻醉的应用体会. *中国医药导报* 2007; 4: 167
- 陶晓三, 邓揆根. 瑞芬太尼在无痛肠镜检查中的应用.

- 江西医药 2005; 40: 747-748
- 48 吴静, 陈德坚. 无痛胃镜检查的不良反应与对策. 实用医技杂志 2007; 14: 323-324
- 49 王燕, 刘蕾, 许亚平. 无痛胃镜检查意外及并发症的防治. 实用医技杂志 2006; 13: 1391
- 50 徐富星, 季大年. 无痛苦消化内镜技术临床应用现状. 中国实用内科杂志 2005; 25: 221-222
- 51 侯贵文, 李金荣, 孙桂玲. 无痛胃镜检查的临床应用. 实用临床医药杂志 2007; 11: 139-140
- 52 成宏伟, 黄震, 焦胜. 无痛胃镜检查上消化道疾病4185例. 中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 59
- 53 周乐丹, 张曙林, 周伟华, 李珍发. 异丙酚联合用药与异丙酚单药用于无痛胃镜和肠镜的比较. 中国医学工程 2006; 14: 305-307
- 54 王洪云, 高军, 黄年根, 张吉翔. 无痛胃镜诊治小儿上消化道疾病127例临床分析. 中国现代医生 2007; 45: 33-35
- 55 陈友伟, 李素芝, 彭华, 陈强. 无痛胃镜技术在拉萨地区的应用. 西藏科技 2007; 11: 56-57
- 56 成宏伟, 焦胜, 谢祝平, 黄震. 无痛胃镜下治疗食管静脉曲张45例. 实用临床医药杂志 2007; 11: 124-125
- 57 顾红祥, 刘玉杰, 张志坚, 黄友明, 陈雪梅, 麦海珠, 杨巧玲. 特殊人群上消化道异物的无痛胃镜治疗. 中国内镜杂志 2007; 13: 166-168
- 58 刘美玉, 吴晨, 达娟, 孙建宏. 瑞芬太尼与丙泊酚复合液在门诊无痛胃镜中的应用. 新乡医学院学报 2007; 24: 169-171
- 59 张晓华, 朱人敏, 白玛觉群. 高海拔地区无痛胃镜检查的临床观察. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2645-2648
- 60 李莉, 吕海权, 陈瑜, 杨传. 老年人无痛胃镜检查Holten监测30例. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2266-2267
- 61 张庆明. 无痛肠镜检查在高血压患者中的应用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 922-924
- 62 潘林娜, 张志燕, 李曼. 无痛结肠镜检查技术在电烧治疗结肠息肉中的临床应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2506-2508
- 63 Lee IL, Wu CS. Less patient discomfort by one-man colonoscopy examination. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 635-638
- 64 Takada M. Self-propelled colonoscope for painless examination. *Biomed Instrum Technol* 2005; 39: 242-245
- 65 邓智郁. 瑞芬太尼用于无痛胃镜的临床观察. 中国误诊学杂志 2008; 8: 89
- 66 宋华如. 无痛胃镜临床应用观察. 实用医技杂志 2007; 14: 50-51
- 67 黄增相, 吴建胜, 付美英, 陈先亲. 丙泊酚静脉麻醉于无痛胃镜中的临床价值. 实用医学杂志 2007; 23: 386-387
- 68 焦杰. 无痛胃镜在诊疗中的应用分析. 中国现代医药杂志 2007; 9: 55-56
- 69 姬勇, 姜海波. 两种麻醉方法在无痛胃镜中的效果比较. 实用医技杂志 2007; 14: 1147-1148
- 70 朱晓岚, 厉玉红, 潘江静. 无痛胃镜的临床应用分析. 浙江临床医学 2007; 9: 79

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 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化道肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2008-09-30.

3 联系方式

刘成海, 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肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

NADPH氧化酶产生的活性氧簇对肝星状细胞内信号转导的调控

何文华, 朱萱

何文华, 朱萱, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本文由何文华撰写; 朱萱审阅修改。

通讯作者: 朱萱, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. jyyfyzx@163.com

电话: 0791-8692505

收稿日期: 2008-03-13 修回日期: 2008-04-12

Participation of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase in regulating signal transduction in hepatic stellate cells

Wen-Hua He, Xuan Zhu

Wen-Hua He, Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jyyfyzx@163.com

Received: 2008-03-13 Revised: 2008-04-12

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are established molecules that are injurious to such biomolecules as DNA and protein, and that can induce lipid peroxidation. However, it is now held that Nox/Duox family of NADPH oxidases generate ROS in a carefully regulated manner, which can act as second messengers influencing signal transduction in various cells including hepatic stellate cells (HSCs). This paper focused on mechanism of ROS generated by NOX/Duox regulating signal transduction, and then reviewed signal transduction of ROS-mediated liver profibrogenic factors, e.g., transforming growth factor- β (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), Angiotensin II (Ang II) and leptin, *et al* in HSCs.

Key Words: NADPH oxidase/Dual oxidase; Reactive oxygen species; Signal transduction; Hepatic stellate cells

He WH, Zhu X. Participation of reactive oxygen species

generated by NADPH oxidase in regulating signal transduction in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1897-1903

摘要

活性氧簇(ROS)长期被认为是一类损伤DNA、蛋白等生物分子,引起脂质过氧化反应的细胞有害分子。现在认为NADPH氧化酶(Nox)/Dual氧化酶(Duox)家族是以精确调节的方式产生ROS,能作为第二信使影响包括肝星状细胞(HSCs)在内的各种细胞的信号转导。本文讨论NOX/Duox产生的ROS调控信号转导的机制,并对近年来关于ROS介导的促肝纤维化因子(如转化生长因子(TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管紧张素II(Ang II)和瘦素(leptin)等)在HSCs内信号转导的研究作一综述。

关键词: NADPH氧化酶/Dual氧化酶; 活性氧簇; 信号转导; 肝星状细胞

何文华, 朱萱. NADPH氧化酶产生的活性氧簇对肝星状细胞内信号转导的调控. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1897-1903

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1897.asp>

0 引言

活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是一类氧衍生的分子,包括超氧化物(superoxide, O₂⁻)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)、羟自由基(hydroxyl radical)及各种脂质过氧化反应的产物,线粒体偶联的酶,细胞色素P450一氧化酶(CYP 2E1)、NOX、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)及参与花生四烯酸代谢的酶都能产生ROS^[1]。由于ROS能与大多数细胞大分子发生反应,使酶失活,引起DNA损伤,修饰翻译后的蛋白及脂质过氧化反应损伤细胞膜,长期将ROS视为对细胞有害的分子^[2-3]。然而最近的研究发现,NOX/Duox家族产生的ROS参与介导细胞内许多信号通路,参与调控细胞的生长,细胞分裂,分化,迁移,凋亡及衰老等许多生理活动,也与疾

■背景资料

肝星状细胞在肝纤维化的发病中扮演主要角色,各种旁分泌、自分泌的促肝纤维化因子,都要通过信号转导使肝星状细胞激活、转化、增殖、分泌细胞外基(ECM)及更多的促肝纤维化因子,形成恶性循环,导致肝纤维化、肝硬化。近年来针对促肝纤维化因子在肝星状细胞内的信号转导有了更深入的研究,阻断这些促肝纤维化因子在肝星状细胞内的信号转导有望减轻甚至逆转肝纤维化。

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科; 张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■ 研发前沿

近年来,在肝星状细胞信号转导的研究领域出现了新热点, NADPH氧化酶产生的活性氧簇作为细胞内信号转导的第二信使角色得到了国内外学者的重新认识和关注,如抑制NADPH氧化酶表达或抑制NADPH氧化酶的活性,减少活性氧簇产生可阻断TGF- β 、PDGF及AngII等在肝星状细胞内的信号转导。

病的发生密切相关^[4-5]。下面我们就NOX产生的ROS调控细胞内信号转导的机制及其介导促肝纤维化因子在HSCs内信号转导的研究现状作一综述。

1 NOX的结构、功能及其产生的ROS介导细胞内信号转导的机制

NOX是由6个亚基构成的多蛋白复合体,最初在吞噬细胞发现他的表达。吞噬细胞型NOX的结构和功能已研究清楚,他的催化亚基gp91^{Phox}(又称为NOX2)和调节亚基p22^{Phox}在细胞膜上形成异二聚体(又称为黄素细胞色素b 558),其他亚基通常位于细胞质,包括p47^{Phox}, p40^{Phox}, p67^{Phox}和小G蛋白Rac(small GTPase Rac),吞噬细胞型NOX激活的经典机制是各种刺激诱导p47^{Phox}, p67^{Phox}, p40^{Phox}和Rac激活,然后这4种细胞质内的蛋白向细胞膜易位,与其他两个亚基p22^{Phox}和NOX2相互作用,结果将NADPH的两个电子连续传递给氧分子而产生超氧化物^[6-7]。非吞噬细胞型NOX在结构与功能上都与吞噬细胞型NOX相似,只是不同类型的细胞NOX的亚基构成不同。目前发现了6种gp91^{Phox}(NOX2)的同源蛋白(NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1和DUOX2), p47^{Phox}和p67^{Phox}也发现了他们的同系物,分别是NOXO1(NOX organizer 1)和NOXA1(NOX activated 1)^[8-9]。Rac蛋白的亚基有Rac1, Rac1b, Rac2和Rac3, Rac2只参与吞噬细胞型NOX的激活, Rac1则参与所有非吞噬细胞型NOX的激活^[10]。

NOX/Duox产生的ROS是受精确调节的,他在信号转导、天然免疫和激素合成等许多生物学功能中发挥了关键作用^[8,11]。现已证明,ROS和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)一样是细胞内信号转导的第二信使^[12]。NOX产生的ROS介导了细胞内许多信号通路,如丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)通路^[13-14]、Janus激酶-信号转导子及转录激活子(JAK-STAT)通路^[15]、核因子- κ B(NF- κ B)通路^[16]等,参与调控细胞的生长,细胞分裂,分化,迁移,凋亡及衰老等许多生理活动,也与疾病的发生密切相关^[4,5,11]。

蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)和蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)分别使蛋白磷酸化和去磷酸化来调控细胞内信号传导通路,ROS一方面刺激酪氨酸及丝氨酸/苏氨酸磷酸化而激活PTK,另一方面选择性地氧化修饰PTP活性中心的半胱

氨酸残基(cysteine residue),使PTP失活,促进信号级联放大^[17]。半胱氨酸还以硫醇盐(thiolate)的形式存在于硫还氧蛋白(Trx),蛋白激酶C(PKC), Rac蛋白、胱门蛋白酶(caspases)、激活蛋白-1(AP-1)和NF- κ B上,他们都可被ROS氧化修饰,谷氧还蛋白可通过巯基-二硫键交换将他还原成硫醇盐,从而恢复PTP的活性^[12]。ROS还有调节离子通道的作用,他能抑制慢钾通道(IKv)减少K⁺电流^[18],激活Ca²⁺通道触发Ca²⁺的信号传导,降低三磷酸肌醇(IP3)的阈值促进细胞内贮存的Ca²⁺释放,影响Ca²⁺依赖的信号转导^[19]。ROS还可能通过模拟配体-受体相互作用直接激活生长因子受体^[20]。

稳态信号传导(homeostatic signaling)要求ROS限制于细胞特定的空间内,亚细胞定位NOX与PTP的功能发现,这两个系统常共区域化(colocalization),ROS信号传导与Ca²⁺瞬时增加过程也有区室化(compartmentalization)的现象^[17]。细胞内ROS的浓度也是受严格调控,最近研究证明H₂O₂不能自由通过生物膜,他受水通道蛋白(aquaporins)转运调节^[21],而O₂-则是通过氯通道-3(CIC-3)跨膜转运^[22]。各种生长因子,细胞因子,趋化因子及其他刺激可活化NOX产生大量的ROS^[8]。当内源性或外源性ROS增多时,ROS从原来限定的空间逃逸,触发应激信号传导(stress signaling)^[17],NOX持续产生过量的ROS可引起动脉粥样硬化、高血压、肺纤维化等各种慢性疾病^[5]。

2 NOX产生的ROS参与HSCs内的信号转导

HSCs表达非吞噬细胞型NOX, Bachmann *et al*^[23]最早发现HSCs表达p22^{Phox}。后来Bataller *et al*^[24]发现在培养激活的HSCs及从肝纤维化患者新分离的HSCs内p47^{Phox}、gp91^{Phox}和NOX1的mRNA都有高表达,但在静止的HSCs没有表达。Adachi *et al*^[25]分别从mRNAs和蛋白水平检测到LI-90细胞(HSCs系)表达p22^{Phox}, gp91^{Phox}, p47^{Phox}和p67^{Phox}。Proell *et al*^[26]研究发现在TGF- β 刺激HSCs后24 h NOX4和p47^{Phox}的mRNA表达就已增加,48 h NOX活性明显升高。Rac1被认为是NOX激活的关键亚基^[27],NOX活化产生的ROS作为第二信使介导了各种促肝纤维化因子在细胞内信号转导。

2.1 ROS介导TGF- β 在HSCs内的信号转导 TGF- β 是关键促肝纤维化因子,他能激活HSCs转化为肌纤维母细胞(myofibroblast, MFB),促进

细胞外基质(ECM)合成, 通过下调金属蛋白酶(MMPs)和上调金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的表达减少ECM降解^[28]. 近年研究发现TGF- β 能诱导各种细胞内的NOX激活, 产生的ROS介导了细胞内信号传导. 如TGF- β 1诱导成心肌纤维细胞产生ROS介导Smad2/3的磷酸化^[29], 诱导人肺动脉平滑肌细胞(HPASMC)产生ROS, 氧化修饰细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2), 使生长信号级联放大^[30], 诱导人肺纤维细胞内H₂O₂增加, 进而引起Ca²⁺内流, MAPK及AP-1激活^[31]. Proell *et al*^[26]研究发现在TGF- β 促进HSCs转化为MFB的过程中依赖NOX的激活及ROS的产生. 可溶性的TGF- β II型受体(TGF- β R II)与TGF- β 结合后, 能降低NOX的活性, 减少ROS产生, 从而阻止HSCs的激活^[32]. 抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)能抑制TGF- β 介导HSC内的Smad2、Smad3磷酸化和Smad7 mRNA的表达^[33]. 维甲酸(retinoic acid)能阻断TGF- β 诱导HSCs内ROS增加及钙内流, 抑制 α -SMA表达, 减轻肝纤维化^[34].

2.2 ROS介导PDGF在HSCs内的信号转导 PDGF是HSCs最有力的促有丝分裂剂, Sundaresan *et al*^[35]很早就发现PDGF的信号转导依赖H₂O₂的产生. Catarzi *et al*^[36]研究认为PDGF刺激NIH3T3细胞(鼠纤维细胞)引起磷脂酰肌醇(-3)激酶(PIP3)和蛋白激酶C(PKC)的激活与NOX活化产生的H₂O₂有关. 现已明确酪氨酸磷酸化和ROS是PDGF信号传导的两个轴, 控制着诸如成簇黏附激酶(FAK)、GTP酶活化蛋白(GAP)、含有SH2酪氨酸磷酸酶(SHP-2), 磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2), 磷脂酶C γ (PLC γ)、PI3K等许多下游信号通路的开放与关闭^[37]. Adachi *et al*^[25]研究表明, PDGF是通过诱导NOX活化产生ROS来激活HSCs及促他增殖的, PDGF-BB激活原代HSCs的NOX产生ROS, ROS刺激P38MAPK磷酸化, P38MAPK激活后诱导HSCs增殖, 使用NOX的抑制剂DPI(diphenylene iodonium)或加拿大麻素(apocynin)能抑制PDGF-BB诱导ROS产生及HSCs增殖. Adachi *et al*^[38]发现高分子量脂联素(HMW Adiponectin)可通过激活腺苷单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)来抑制PDGF诱导的HSCs增殖, 而AMPK抑制HSCs增殖的机制是通过抑制NOX产生ROS进而抑制AKT(又称为蛋白激酶B, PKB)信号通路, 使HSCs表达CDK抑制蛋白p27(kip1)和p21(cip1)增加. 值得注意的是, 抗氧化剂NAC虽然能阻断TGF- β 信号通路^[33], 但不能阻止HSCs的PDGF β 型受体及细胞内ERK、

PKB/Akt磷酸化, 可能NAC介导细胞内的还原-氧化(cellular redox)不是特异作用于PDGF信号通路的^[39].

2.3 ROS介导Ang II在HSCs内的信号转导 Ang II也是一个主要的促肝纤维化因子, 他诱导肝脏的炎症反应, 刺激HSCs激活、增殖、移行, 分泌促炎细胞因子及胶原^[40-41]. Bataller *et al*^[24]研究证实Ang II在肝内的致纤维化作用也是通过激活NADPH氧化酶产生ROS来实现的, Ang II与AT1受体结合后诱导p47^{phox}磷酸化, NOX被激活并产生ROS, ROS通过氧化还原修饰使AKT和MAPKs磷酸化, 增强AP-1的DNA结合活性. NAC和DPI能减弱Ang II刺激HSCs引起的DNA合成、I型胶原mRNA表达、细胞移行、TGF- β 1和其他炎性细胞因子的分泌^[24]. Li *et al*^[42]研究发现, 表没食子儿茶素没食子酸脂(EGCG)能抑制Ang II诱导的NOX表达及ROS的产生, 阻断ROS依赖的p38和JNK信号通路从而抑制NF- κ B的激活. Ang II依赖ROS激活的信号通路还有Src分子C端激酶(c-Src)、富脯氨酸的酪氨酸激酶2(proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2)、PI3-K等^[43], 此外Ang II激活NOX产生的ROS还能抑制慢钾通道(IKv)减少K⁺电流^[18], 激活钙通道引起Ca²⁺内流^[44].

2.4 ROS介导leptin在HSCs内的信号转导 Leptin是近年来发现的促肝纤维化因子, 他能上调HSCs的TGF- β R II表达^[45], 并促进HSCs合成TGF- β ^[46]、金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)^[47]、I型胶原^[45,48], 加重硫代乙酰胺(thioacetamide)诱导的鼠肝纤维化^[46,49]. Saxena *et al*^[50]研究发现Leptin依赖ERK和Akt磷酸化促进HSCs增殖并抑制他的凋亡. Cao *et al*^[47]研究进一步发现Leptin是通过H₂O₂介导p38、ERK1/2信号通路及JAK/STAT通路激活, 从而促进HSCs合成TIMP-1的. 他也依赖H₂O₂激活ERK1/2、p38、JAK1和JAK2, 抑制基质金属蛋白酶-1(MMP-1)基因的表达^[51], 促进I型胶原的表达^[52]. 单用二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)或S-腺苷甲硫氨酸(SAMe)都能减少瘦素刺激的TIMP-1的mRNA和蛋白表达, 联合使用DLPC和SAMe能完全阻断ERK1/2、p38的磷酸化及TIMP-1的表达^[53], DLPC和SAMe能阻止Leptin或甲萘醌(menadione)引起的H₂O₂产生, 恢复消耗的谷胱甘肽(GSH), 阻断H₂O₂介导ERK1/2和p38的激活, 完全抑制I型胶原的mRNA表达^[54].

2.5 ROS还介导了其他促肝纤维化因子在HSCs内的信号转导 乙醛是酒精性肝病中的主要促

■创新盘点

本文就NADPH氧化酶/Dual氧化酶产生的活性氧簇调控信号转导的机制, 以及近年来关于活性氧簇介导的促肝纤维化因子在肝星状细胞内信号转导的研究作了较新且全面的阐述.

■应用要点

本文对防治肝纤维化有指导作用,未来我们可以选择针对肝星状细胞的NOX表达或对NOX的活性有抑制作用的抗氧化剂,来阻断促肝纤维化因子在肝星状细胞内的信号转导,达到阻止静止的肝星状细胞激活、促进肝星状细胞凋亡,减轻甚至逆转肝纤维化的作用。

肝纤维化因子之一^[55]。Novitskiy *et al*^[56]研究发现乙醛可引起小鼠HSCs内ROS产生增加,雷洛昔芬(raloxifene)能抑制NOX产生O₂⁻,减少乙醛引起H₂O₂和O₂⁻的产生。乙醛诱导HSCs合成胶原也依赖H₂O₂介导PKC δ /ERK1/2及c-Abl信号通路的激活和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的磷酸化,过氧化氢酶(catalase)能阻断乙醛诱导的PPAR γ 磷酸化,抑制胶原产生^[57]。Sugimoto *et al*^[58]研究发现高糖溶液通过PKC依赖途径激活HSCs的NOX产生ROS,ROS介导MAPK磷酸化,导致HSCs增殖并合成I型胶原。Itagaki *et al*^[59]发现雌二醇抗肝纤维化的作用是通过抑制NOX活性来减少ROS产生,阻断MAPK信号通路及转录因子的激活,从而抑制TGF- β 1的表达和HSCs的激活,孕酮则有相反的作用。亮氨酸(leucine)也能诱导HSCs的NOX产生ROS,ROS介导了胰岛素受体/胰岛素样生长因子-I受体(IR/IGF-IR)的激活和ERK, Akt及哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的磷酸化,最后导致HSCs合成I型胶原增加,这一作用可以被加拿大麻素和谷光甘肽阻断^[60]。Kojima-Yuasa *et al*^[61]研究发现锌缺乏的HSCs内谷光甘肽水平下降,细胞产生H₂O₂增加,导致HSCs激活。Zhan *et al*^[62]研究显示凋亡小体使HSCs内的NOX活化进而激活HSCs促进肝纤维化。ROS还可能是其他各种促肝纤维化因子细胞内信号传导的共同第二信使,如ROS介导了内皮素-1(ET-1)^[63],血管内皮细胞生长因子(VEGF)^[64]等生长因子、细胞因子在其他细胞的信号转导。

2.6 ROS介导NF- κ B信号通路的激活 NF- κ B可能不是介导HSCs激活和增殖的关键因子,但他能使激活的HSCs/MFB持续活化或永生^[65]。在HSCs激活过程中NF- κ B的活性持续升高,而I κ B- α 在细胞质与细胞核内持续减少^[66]。HSCs内ROS的增加可能是NF- κ B活性是持续升高的原因,由于NF- κ B存在半胱氨酸残基^[12],ROS可通过氧化修饰直接激活NF- κ B。既往研究就证明各种抗氧化剂如维生素E, α -硫辛酸(α -lipoic acid), 丁羟甲苯(BHT)及NAC都能抑制NF- κ B的激活^[67]。最近Li *et al*^[68]的研究发现不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)诱导HSCs内ROS的产生后激活了NF- κ B依赖的信号通路,使TGF- β 1表达增加,导致HSCs激活,抗氧化剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrrolidine dithiocarbamate)可以拮抗这一作用。

3 结论

既往我们对ROS在肝纤维化发病的认识局限在他损伤DNA、蛋白、与膜发生脂质过氧化反应,而视之为损伤肝细胞的有害分子,而上述的资料表明NOX产生的ROS作为共同的第二信使介导了许多促肝纤维化因子在HSCs内的信号转导,这些信号通路与HSCs的活化、增殖及肝纤维化发病密切相关^[69-70],因此清除HSCs内过多的ROS,能阻断这些促肝纤维化因子在HSCs内的信号转导,达到阻止静止的HSCs激活、促进HSCs凋亡、减轻甚至逆转肝纤维化的作用。但并非所有的抗氧化剂都能达到这一作用,有报道抗氧化剂谷胱甘肽乙酯(GSH-EE)或水溶性生育酚(trolox)清除HSCs内ROS后,反而阻止了内源性2-花生四烯酸甘油(2-AG)诱导的HSCs凋亡,这可能与2-AG不是作用于NOX,而是通过使线粒体产生大量的ROS有关^[71]。因此我们认为,只有抑制HSCs的NOX表达或抑制NOX的活性来清除HSCs内过多的ROS,才能阻断ROS介导的促肝纤维化因子在HSC内的信号转导,这将是治疗肝纤维化的一个新途径。在这一领域中药有很大潜力,如上述绿茶中提取的EGCG^[42]及丹参中提取的熊果酸(ursolic acid)^[72]都能抑制NOX表达,减少ROS的产生。但NOX产生低水平的ROS介导稳态的信号传导,完全抑制了NOX活性可能影响细胞正常的生长、分裂和分化,这值得我们进一步研究。

4 参考文献

- 1 Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 223-230
- 2 Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6: 205-228
- 3 Termini J. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res* 2000; 450: 107-124
- 4 Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 216-225
- 5 Lambeth JD. NOX enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 332-347
- 6 Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 342-344
- 7 Dang PM, Cross AR, Quinn MT, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4262-4265
- 8 Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of NOX and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 319-331
- 9 Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S,

- Coant N, Daniel F, Ogier-Denis E. The NOX/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 953-959
- 10 Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 2006; 98: 453-462
- 11 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313
- 12 Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C246-C256
- 13 Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2175-2183
- 14 Gu Y, Xu YC, Wu RF, Souza RF, Nwariaku FE, Terada LS. TNF α activates c-Jun amino terminal kinase through p47(Phox). *Exp Cell Res* 2002; 272: 62-74
- 15 Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 321-326
- 16 Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res* 2005; 42: 415-423
- 17 Terada LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J Cell Biol* 2006; 174: 615-623
- 18 Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 2005; 96: 659-666
- 19 Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 15749-15757
- 20 Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15
- 21 Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 994-1003
- 22 Hawkins BJ, Madesh M, Kirkpatrick CJ, Fisher AB. Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 2002-2012
- 23 Bachmann S, Ramasubbu K. Immunohistochemical colocalization of the alpha-subunit of neutrophil NADPH oxidase and ecto-5'-nucleotidase in kidney and liver. *Kidney Int* 1997; 51: 479-482
- 24 Bataller J, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394
- 25 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
- 26 Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007; 6: 1
- 27 Choi SS, Sicklick JK, Ma Q, Yang L, Huang J, Qi Y, Chen W, Li YX, Goldschmidt-Clermont PJ, Diehl AM. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology* 2006; 44: 1267-1277
- 28 Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007; 6: 7
- 29 Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005; 97: 900-907
- 30 Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP, Hoidal JR. Transforming growth factor-beta1 induces NOX4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 2006; 290: L661-L673
- 31 Junn E, Lee KN, Ju HR, Han SH, Im JY, Kang HS, Lee TH, Bae YS, Ha KS, Lee ZW, Rhee SG, Choi I. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-beta 1-induced IL-6 expression. *J Immunol* 2000; 165: 2190-2197
- 32 Cui X, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Inoue H, Shono M, Tamaki K, Fukuno H, Ueno H, Ito S. Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *J Hepatol* 2003; 39: 731-737
- 33 Meurer SK, Lahme B, Tihaa L, Weiskirchen R, Gressner AM. N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-beta signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1026-1034
- 34 Yang KL, Chang WT, Chuang CC, Hung KC, Li EI. Antagonizing TGF-beta induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx. *Biochim Biophys Res Commun* 2008; 365: 484-489
- 35 Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-299
- 36 Catarzi S, Biagioni C, Giannoni E, Favilli F, Marcucci T, Iantomasi T, Vincenzini MT. Redox regulation of platelet-derived-growth-factor-receptor: role of NADPH-oxidase and c-Src tyrosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 166-175
- 37 Kang SW. Two axes in platelet-derived growth factor signaling: tyrosine phosphorylation and reactive oxygen species. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 533-541
- 38 Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* 2008; 47: 677-685
- 39 Borkham-Kamphorst E, Meurer SK, Gressner

■ 名词解释

促肝纤维化因子: 本文提到的促肝纤维化因子指各种参与肝纤维化发病的生长因子(如转化生长因子- β), 细胞因子(如瘦素), 激素(如孕酮)及其他介质(如乙醛)等。

■同行评价

本文选题较新,对临床认识肝纤维化发生有一定的意义,特别是对今后的抗肝纤维化提供了一定的理论基础。

- AM, Weiskirchen R. Disruption of intermolecular disulfide bonds in PDGF-BB dimers by N-acetyl-L-cysteine does not prevent PDGF signaling in cultured hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1711-1718
- 40 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- 41 Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G642-G651
- 42 Li HL, Huang Y, Zhang CN, Liu G, Wei YS, Wang AB, Liu YQ, Hui RT, Wei C, Williams GM, Liu DP, Liang CC. Epigallocatechin-3 gallate inhibits cardiac hypertrophy through blocking reactive oxidative species-dependent and -independent signal pathways. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1756-1775
- 43 Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 269-280
- 44 Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1302-1314
- 45 Tang M, Potter JJ, Mezey E. Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 906-911
- 46 Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36: 12-21
- 47 Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependent MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 4292-4304
- 48 Saxena NK, Saliba G, Floyd JJ, Anania FA. Leptin induces increased alpha2(I) collagen gene expression in cultured rat hepatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 311-320
- 49 Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4822-4826
- 50 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18: 1612-1614
- 51 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2007; 46: 124-133
- 52 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H₂O₂-dependent MAPK pathways. *J Cell Biochem* 2006; 97: 188-197
- 53 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC and SAME combined prevent leptin-stimulated TIMP-1 production in LX-2 human hepatic stellate cells by inhibiting HO-mediated signal transduction. *Liver Int* 2006; 26: 221-231
- 54 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC and SAME prevent alpha1(I) collagen mRNA up-regulation in human hepatic stellate cells, whether caused by leptin or menadione. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 50-55
- 55 Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med* 2001; 7: 408-413
- 56 Novitskiy G, Traore K, Wang L, Trush MA, Mezey E. Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1429-1435
- 57 Ceni E, Crabb DW, Foschi M, Mello T, Tarocchi M, Patussi V, Moraldi L, Moretti R, Milani S, Surrenti C, Galli A. Acetaldehyde inhibits PPARgamma via H₂O₂-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2006; 131: 1235-1252
- 58 Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, Tsuruta S, Fukushima M, Iwao M, Sonta T, Kotoh K, Inoguchi T, Nakamuta M. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase. *Liver Int* 2005; 25: 1018-1026
- 59 Itagaki T, Shimizu I, Cheng X, Yuan Y, Oshio A, Tamaki K, Fukuno H, Honda H, Okamura Y, Ito S. Opposing effects of oestradiol and progesterone on intracellular pathways and activation processes in the oxidative stress induced activation of cultured rat hepatic stellate cells. *Gut* 2005; 54: 1782-1789
- 60 Perez de Obanos MP, Lopez-Zabalza MJ, Arriazu E, Modol T, Prieto J, Herraiz MT, Iraburu MJ. Reactive oxygen species (ROS) mediate the effects of leucine on translation regulation and type I collagen production in hepatic stellate cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1681-1688
- 61 Kojima-Yuasa A, Umeda K, Ohkita T, Opere Kennedy D, Nishiguchi S, Matsui-Yuasa I. Role of reactive oxygen species in zinc deficiency-induced hepatic stellate cell activation. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 631-640
- 62 Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 435-443
- 63 Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 208-215
- 64 Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 731-739
- 65 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58
- 66 Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor-kappaB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IkappaB family proteins. *Hepatology* 1999; 30: 761-769
- 67 Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of

- oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 49-98
- 68 Li JC, Chang L, Lu D, Jiang DJ, Tan DM. Effect of asymmetric dimethylarginine on the activation of hepatic stellate cells and its mechanism. *Zhongnandaxue Xuebao Yixueban* 2007; 32: 427-432
- 69 申月明, 朱萱. 肝星状细胞激活与信号转导. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 873-878
- 70 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙. 肝纤维化的信号转导通路. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2223-222
- 71 Siegmund SV, Qian T, de Minicis S, Harvey-White J, Kunos G, Vinod KY, Hungund B, Schwabe RF. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 2007; 21: 2798-2806
- 72 Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Voller N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Forstermann U, Li H. Ursolic acid from the Chinese herb danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates NOX4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2007; 195: e104-e111

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性的旬刊杂志, 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领域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 2008-06-18)

PTEN与肝脏疾病研究进展

郝礼森, 张晓岚

■背景资料

PTEN是迄今发现的第一个具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因。通过对细胞内多条信号转导通路的负性调控, 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移, 诱导肿瘤细胞凋亡。近年来, 对PTEN的研究逐渐从肿瘤领域延伸到一些非肿瘤领域, 其在某些非肿瘤肝脏疾病中的作用正逐渐被揭示。

郝礼森, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

郝礼森, 华北煤炭医学院附属医院 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 本文由郝礼森综述, 张晓岚审校。

通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科, lanz63@163.com

电话: 0311-66002954

收稿日期: 2008-03-11 修回日期: 2008-04-12

Advances in PTEN and hepatic diseases

Li-Sen Hao, Xiao-Lan Zhang

Li-Sen Hao, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. lanz63@163

Received: 2008-03-11 Revised: 2008-04-12

Abstract

Role of PTEN in tumorigenesis has been a hotspot of research in tumor domain. Researchers have recently been concerned about its additional role in non-tumor diseases. For liver diseases, apart from researches of PTEN effects on hepatic cellular cancer pathogenesis, there have been some other studies on relationship between PTEN and other liver diseases. This paper reviewed relationship between PTEN and liver diseases as well as its identification, structure and function.

Key Words: PTEN; Liver diseases; Hepatocellular carcinoma

Hao LS, Zhang XL. Advances in PTEN and hepatic diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1904-1911

摘要

过去, PTEN在肿瘤发生发展中的作用是研究的热点。近年来, 一些学者广泛关注PTEN在某些非肿瘤疾病中的作用。肝脏疾病方面, 除对PTEN在肝细胞癌发生发展中的作用进行研究外, 也有一些PTEN与其他肝脏疾病关系的研

究。本文就PTEN的发现、结构、功能及与肝脏疾病的关系等作一综述。

关键词: PTEN; 肝脏疾病; 肝细胞癌

郝礼森, 张晓岚. PTEN与肝脏疾病研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1904-1911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1904.asp>

0 引言

PTEN是迄今发现的第一个具有双重特性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因, 通过对细胞内多条信号转导通路的负性调控, 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移, 诱导肿瘤细胞凋亡, 对维持细胞的正常生理活动发挥重要作用。PTEN在肿瘤发生发展中的作用备受关注, 已成为研究的热点。在肝脏疾病方面, 除了对肝细胞癌的研究外, 近年来, 对PTEN与肝细胞癌以外的其他肝脏疾病, 如非酒精性脂肪性肝炎、肝脂肪变性等的相关性也进行了探讨。本文就PTEN的发现、结构、功能及与肝脏疾病的关系等作一综述。

1 PTEN的发现

PTEN(PTEN/MMAC1/TEP1)是1997年由美国三家实验室先后发现并克隆的一个新的肿瘤抑制基因。1997-03 Li *et al*^[1]在浸润性乳腺癌转移灶中发现了染色体10q23特定区域的纯合性缺失, 并分离出一种新的基因, 通过对其开放性读码框序列进行分析, 发现他可编码蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP), 并与张力蛋白、辅助蛋白有大片同源区, 因此, 将其命名为第10号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN)。同时, Steck *et al*^[2]在胶质母细胞瘤中克隆到定位于10q23.3, 与多种进展期肿瘤突变相关的基因, 称之为多种进展期肿瘤突变基因(mutated in multiply advanced cancer 1, MMAC1)。同年4月, 另一研究小组^[3]在研究细胞内PTP时分离克隆到一种新的酪氨酸磷酸酶, 该酶在人的上皮细胞中表达丰

■同行评议者

林志辉, 教授, 福建省立医院消化内科

富, 并可被转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)下调, 因而将其命名为TGF- β 调节的上皮细胞富含的磷酸酶(TGF- β regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1, TEP1)。现已证明, PTEN、MMAC1、TEP1为同一基因, 编码同一种蛋白质, 统称为PTEN。

2 PTEN的结构及分布

2.1 PTEN基因结构 PTEN基因定位于10q23.3, 全长200 kb, 包含9个外显子和8个内含子; 其cDNA的5'端是由804个核苷酸组成的非编码区, 含多个CGG重复序列, 为甲基化提供了基础, PTEN的高甲基化使基因处于静止状态, 导致PTEN低水平转录及PTEN蛋白的减少甚至缺失; 非编码区后是开放阅读框, 由1209个核苷酸组成, mRNA长5.5 kb, 编码403个氨基酸的蛋白产物; PTEN基因的第5外显子十分重要, 编码PTEN蛋白磷酸酶核心基序^[2-4]。

2.2 PTEN蛋白结构 PTEN蛋白是具有脂质磷酸酶活性及蛋白磷酸酶活性的双重特异性磷酸酶, 在酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶介导的信号转导过程中发挥重要作用, PTEN功能的实现和调节与其蛋白结构域密切相关。从结构上看, PTEN蛋白是由403个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量55 kDa, 由N端的磷酸酶结构域、C2结构域及C端的尾部结构域组成^[4-5]。

PTEN蛋白的磷酸酶结构域由N端第1-185位氨基酸组成, 其中第123-130位氨基酸构成了其磷酸酶核心, 具有与脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶的双重特异性磷酸酶催化中心同源的HCXXGRXXR序列, 表明其具有双重特异性磷酸酶功能。其中124位半胱氨酸及130位精氨酸是其催化活性不可缺少的^[4]。值得注意的是, 磷酸酶结构域尤其是磷酸酶核心内的点突变可导致PTEN蛋白的脂质磷酸酶和/或蛋白磷酸酶活性丧失, 例如H123Y(第123位上的组氨酸被酪氨酸取代)、C124S(第124位上的半胱氨酸被丝氨酸取代)突变导致磷酸酶活性完全丧失, 而G129E(第129位上的甘氨酸被谷氨酸取代)突变仅丧失脂质磷酸酶活性, 保留蛋白磷酸酶活性。同时, 磷酸酶结构域在PTEN与细胞膜的静电结合中也发挥重要作用^[5]。另外, PTEN蛋白的N末端区域179个氨基酸序列(第7-185位氨基酸)与细胞骨架中的张力蛋白和辅助蛋白具有高度的同源性^[4]。辅助蛋白与神经突触小泡的运输有关; 而张力蛋白在细胞聚集黏着时, 在锚着点通过

黏着斑与肌动蛋白细丝形成复合体, 共同参与细胞生长调节, 也可能在肿瘤细胞浸润、血管发生及肿瘤转移中发挥一定作用。

C2结构域位于磷酸酶结构域后, 由C末端区域的第186-351位氨基酸构成, 无Ca²⁺配体, 因而类似蛋白激酶C的C2结构域^[5]; C2结构域与磷酸酶结构域之间有密切的接触面, 二者共同组成催化单位, 如剪除C2结构域C端少数残基可使磷酸酶活性完全丧失。C2结构域的作用可概括为^[5-7]: (1)介导胞质内PTEN与细胞膜的瞬间结合, 保证PTEN生物活性作用的发挥; (2)增加PTEN蛋白的稳定性; (3)保证磷酸酶结构域催化基团正有效的空间定位, 以发挥其对底物的作用。因此, C2结构域的完整性对PTEN蛋白的磷酸酶活性具有重要意义。

PTEN蛋白的C端尾部结构域是一个由约50个氨基酸组成的C末端, 含有2个氨基酸单字母编码(proline-glutamic-acid-serine-threonine, PEST)结构域序列和一个PDZ(PSD-95/Dlg/ZO1)同源结构域结合序列及一些能够被磷酸化修饰的位点^[4-5]。

PEST结构域序列为一富含脯氨酸(P)、谷氨酰胺(E)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)的约10个氨基酸组成的结构序列。C端的2个PEST序列分别位于第350-375位和第379-396位氨基酸。PEST结构域序列有助于蛋白折叠, 缺失将导致PTEN的降解速度加快。因此, PEST序列的存在对PTEN的稳定性和细胞膜定位起到一定作用, 如果敲除PEST序列可通过影响蛋白折叠导致PTEN表达下降^[8]。

PDZ同源结构域结合序列位于C末端的第400-403位氨基酸, 是一蛋白间相互作用的结构域^[5]。其作用主要是通过参与蛋白质间的相互作用增强PTEN的磷酸酶活性和信号通路的转导效率, 也就是说, PTEN蛋白可通过PDZ结构域结合序列与其他含有PDZ结构域结合序列的蛋白相互作用而影响PTEN的功能^[9]。如PTEN蛋白能够与具有多个PDZ结构域结合序列的反向膜关联鸟苷酸激酶(membrane associated guanylate kinase inverted, MAGI)相结合, 从而增强PTEN对下游丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶B(serine-threonine protein kinase B, Akt)活性的抑制作用, 当敲除PDZ结构域结合序列则PTEN对Akt的抑制能力明显下降^[10]。此外, PDZ结构域结合序列亦参与维护PTEN蛋白的稳定性^[4-5]。

PTEN蛋白C端尾部的一些氨基酸残基, 如

■ 研究前沿

近年来, 在PTEN与肝脏疾病的研究方面, 除了仍集中于肝细胞癌的研究外, PTEN与NASH、脂肪肝变性等非肿瘤肝脏疾病的相关性也受到了一定的关注。

■创新盘点

本文就PTEN的结构、生物学功能、与肝脏疾病的关系及目前在肝脏疾病领域的最新研究等作了较全面的阐述。

丝氨酸370、丝氨酸385、酪氨酸240、酪氨酸315、酪氨酸336、苏氨酸382和苏氨酸383等是能够被磷酸化修饰的位点,这些位点的突变将缩短PTEN蛋白的半衰期,降低PTEN蛋白的稳定性^[4-5,11]。但也有报道认为蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, CK2)对PTEN蛋白C端尾部的丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化修饰可负性调节caspase-3在C端尾部区域对PTEN的裂解,从而增加PTEN蛋白的稳定性^[8]。另外,C末端磷酸化修饰也可导致PTEN蛋白的构象改变,进而掩盖PDZ结合序列的结合位点,抑制PTEN被募集入细胞膜内形成复合物^[5],并且C末端磷酸化能够干扰PTEN与细胞膜的静电结合^[8]。这提示C末端磷酸化修饰可能影响PTEN的亚细胞定位。

2.3 PTEN的亚细胞定位 过去认为PTEN蛋白主要定位于细胞质^[3],后来发现PTEN蛋白的亚细胞定位可能与PTEN蛋白的功能及某些肿瘤的发生有关,其不同的细胞内分布可能损害了PTEN的功能,亚细胞定位的改变可能是肿瘤形成的首要步骤。Perren *et al*^[12]发现正常胰岛细胞中PTEN蛋白主要分布在胞核内,而大部分内分泌性胰腺肿瘤细胞的PTEN蛋白则主要分布在胞质;Liu *et al*^[13]也认为PTEN在胞核和胞质定位的不同对细胞的生长调节起着不同的作用,在肿瘤细胞中主要定位于细胞质,而在已分化或静止期细胞主要定位于细胞核。Whiteman *et al*^[14]对皮肤黑色素瘤PTEN蛋白表达进行研究时发现胞核内PTEN下降的程度明显大于胞质内下降的程度。近年来的研究显示胞质和胞核的PTEN蛋白执行着不同的功能,胞质PTEN蛋白下调Akt的磷酸化、上调p27的表达,并且是细胞凋亡所必需;而胞核PTEN蛋白则下调细胞周期素D1(cyclin D1)、阻止丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的磷酸化,为阻止细胞生长于G₀-G₁期所必需^[15-16]。这进一步表明PTEN的亚细胞定位与其功能的发挥有关。此外,PTEN蛋白的C末端结构域也可能影响PTEN的亚细胞定位^[5]。

3 PTEN的生物学功能

PTEN编码具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性的双重特异性磷酸酶,使某些磷脂或蛋白激酶相应位点去磷酸化,通过负性调控磷脂酰肌醇-3激酶(phosphoinositol-3-kinase, PI3K)/Akt、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)及MAPK细胞外信号调节激酶

(extracellular signal-regulated kinase, ERK)等信号转导抑制肿瘤细胞周期的运行,诱导肿瘤细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞的黏附、迁移和分化^[17-22]。

PTEN负性调控肿瘤细胞周期的作用主要是通过其磷酸酶活性对PI3K/Akt及MAPK/ERK1/2信号通路负性调控实现的^[18,23-24],并且主要是细胞核的PTEN参与了细胞周期的调控^[16,25-26]。其机制可概括为^[25-30]:(1)通过抑制PI3K/Akt或MAPK/ERK1/2信号通路特异性诱导细胞周期素依赖激酶抑制因子p21、p27和p51的产生。(2)下调MAPK/ERK1/2介导的胞核cyclinD1水平。(3)通过Akt、糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3beta, GSK-3beta)途径降解胞核cyclin D1。

PTEN蛋白的脂质磷酸酶活性可使磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate, PIP3)去磷酸化转变为磷脂酰肌醇二磷酸(phosphatidylinositol-4, 5-triphosphate, PIP2)而失活,继而降低Akt的磷酸化,抑制PI3K/Akt信号,激活capase-3、capase-7、capase-9,发挥诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[4,15,20]。有趣的是,PTEN蛋白的亚细胞定位也参与了对细胞凋亡的诱导,与其调控细胞周期的作用发生在细胞核相反,诱导细胞凋亡主要是胞质PTEN的作用^[14-15]。在最近的研究中,Lin *et al*^[31]发现PTEN缺失使肾癌细胞的抗凋亡能力增强,并且抗凋亡能力的增强与胞质PI3K/Akt依赖的p12水平及稳定性增加有关,因为p12可调节DNA损坏后的修复和凋亡倾向。

PTEN抑制肿瘤细胞黏附和迁移的作用主要与其蛋白磷酸酶活性有关。其机制可能为^[4,32-33]:(1)使FAK去磷酸化,负性调控FAK/p130相关底物(P130 Crk2 associated substrate, p130cas)途径,影响肌动蛋白骨架重构和黏着斑复合体的形成,从而抑制肿瘤细胞的黏附、迁移;(2)PTEN蛋白的N端含有一段与细胞辅助蛋白和张力蛋白的同源序列,张力蛋白在锚着点通过黏着斑与肌动蛋白细丝形成复合体,PTEN通过肌动蛋白与FAK、Src、酪氨酸激酶、生长因子受体和整合素等形成复合物并降低其磷酸化作用。(3)抑制Shc磷酸化,进而抑制Shc介导的肿瘤细胞迁移;(4)抑制整合素和生长因子介导的Ras/MAPK通路,抑制肿瘤细胞迁移。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可降解细胞外间质,在一些纤维化疾病及肿瘤的侵袭力方面发挥重要作用。研究发

现, 一些肿瘤如胰腺癌、胃癌及恶性胶质瘤等的PTEN表达与MMP-2及MMP-9的表达呈负相关, 并且过表达的PTEN可通过抑制肿瘤细胞MMP-2及MMP-9的表达、上调基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-2)的表达抑制肿瘤的侵袭和转移^[34-36]。而对PTEN调控MMP的机制进行的研究显示, PTEN可通过下调PI3K/Akt信号负调控核转录因子- κ B(NF- κ B)及下调ERK1/2信号负调控转录激活蛋白-1(activating protein, AP-1), 进而抑制MMP-9表达及细胞侵袭力^[37-38]。这些资料表明PTEN可通过负性调控MMPs的表达, 抑制肿瘤细胞的侵袭力。

研究发现, 狗血管肉瘤的发生发展存在PTEN的异常, PTEN的点突变或C端结构域缺失将导致血管肉瘤细胞获得生存优势^[39]。在最近的研究中, Suzuki *et al*^[40]在对特异性内皮细胞PTEN突变小鼠进行研究时发现, PTEN杂合性丢失使小鼠新生血管增加, 纯合性丢失则由于内皮细胞的过度增生损害了心血管的形成和重塑而死于胚胎期。PTEN对血管生长的影响可能是通过调控PI3K信号级联来实现的, 研究发现当PI3K被抑制后由PTEN表达缺失或降低导致的血管增生症状则消失^[40-41]。

免疫系统是重要的监护系统, 其功能紊乱可导致机体对细胞恶变的免疫监视失控, PTEN对维持免疫系统的稳定性具有重要作用。研究发现, 特异性B细胞PTEN基因突变小鼠出现外周血B细胞及CD4⁺ T细胞增多, 产生大量自身抗体, 胸腺结构及外周免疫系统也遭到破坏, 增多的B细胞迁移能力增强, 抵抗凋亡, 并可发生子宫内膜癌、前列腺癌及乳腺癌^[42]; 而特异性T细胞PTEN基因缺失的小鼠也出现胸腺增生及T细胞淋巴瘤^[43]。进一步的研究显示, 无论是T细胞还是B细胞, 其生长、增殖及存活与PI3K/PIP3信号密切相关, PTEN可通过对PIP3的调控发挥对T细胞和B细胞的影响^[44-45]。

4 PTEN与肝细胞癌

正常人体的肝组织中存在PTEN的基因及蛋白表达, 且表达水平较高^[2]; 而一系列研究显示肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中存在PTEN的表达异常。Fujiwara *et al*^[46]在37例HCC标本中发现有12例的10q上存在至少有1个位点的等位基因缺失, 8例存在部分缺失; Yu *et al*^[47]在检测HCC中PTEN 5'端的甲基化状态时发现, PTEN表达降

低与促甲基化因素有关, 提示PTEN失活可能发生在转录和转录后的全过程; 而Ma *et al*^[48]在对外培养的肝癌细胞系进行检测时发现, PTEN的低表达可能部分是由于其启动子的活性丧失所致; Zhang *et al*^[49]在34例HCC中没有发现PTEN基因纯合性和杂合性丢失, 但有4例样本存在点突变, 10例HCC组织中有5例表现出PTEN在mRNA水平表达的降低; 在最近的研究中, Wang *et al*^[50]对56例肝癌标本和6个肝癌细胞系的PTEN蛋白表达、第5和第8外显子的基因突变、启动子甲基化等进行了检测, 结果显示, 56例肝癌标本中只有24例有PTEN蛋白表达(占42.9%)、32例癌旁肝组织的PTEN蛋白表达阳性, 6个肝癌细胞系中有3个PTEN蛋白表达低下; 56例肝癌标本中有5例发现在内含子4上存在突变, 9例(16.1%)存在启动子甲基化, 而无第5和第8外显子的基因突变。这些资料表明PTEN基因的缺失、突变或表达产物的失活与肝细胞癌的发生发展密切相关。

PTEN的表达低下不仅参与了HCC的发生与发展, 也与HCC的转移有关。Dong-Dong *et al*^[51]用免疫组织化学SP法对120例HCC(其中有33例有淋巴结转移)标本及其癌旁肝组织和10例正常肝组织的PTEN表达进行了检测, 结果发现PTEN在所有癌旁肝组织和正常肝组织均有表达, 定位于细胞质, 而在120例HCC的表达率分别为: 12.5%阴性、17.5%弱阳性及70%强阳性, 主要定位于细胞核, 与其对应的含淋巴结转移例数的百分率分别为: 80%(12/15)、57.14%(12/21)及10.71%(9/84), 提示PTEN丢失可能与HCC的转移有关。

一系列研究显示HCC组织的PTEN表达状况在预测HCC的预后方面具有潜在的应用价值, 甚至可作为HCC的预后指标之一。Hu *et al*^[52]为了研究PTEN的表达对HCC患者的预测作用, 应用免疫组织化学检测了105例HCC标本的PTEN蛋白表达, 并结合病情进展进行了分析, 结果发现PTEN表达低下的患者较表达正常的患者总的生存率缩短, 而复发率增高; 在另一项关于PTEN表达对HCC患者的预测作用的研究中显示^[53], PTEN蛋白表达低下的HCC患者, 门静脉分支侵犯、血清AFP水平异常的发生率较高, PTEN蛋白表达阴性的HCC患者中, ChildB或ChildC患者显著多于ChildA患者; 在最近的研究中发现PTEN的低表达不仅参与了HCC的发病机制, 而且与P27、P53的高表达一起可作为预

■名词解释

乙型肝炎病毒X蛋白(HBx): 乙型肝炎病毒基因含有4个开放读码框, 分别为S、C、P和X, 其中由X基因编码的蛋白质即为HBx, HBx由154个氨基酸组成, 相对分子量为17 kDa, 与乙型肝炎病毒感染和肝癌的发生密切相关。

■同行评价

本文用大量篇幅介绍PTEN的一般生物学特性,并对其与肝脏疾病的关系进行了论述,具有一定的可读性。

测HCC患者病程的指标^[54-55]。这些资料证实HCC组织的PTEN表达缺失或低下的HCC患者预后较表达正常的差,PTEN的表达与HCC的预后有关。此外,PTEN蛋白在HCC组织中的表达水平与肿瘤的病理学分级和疾病进程呈负相关^[56-57]。

另外,PTEN在HCC的表达也与HCC的治疗有关,某些药物可通过上调PTEN的表达而发挥对HCC的治疗作用。在最近一项为了解扶正解毒汤对患HCC的无胸腺小鼠的作用而进行的研究显示,扶正解毒汤能延长患HCC小鼠的存活时间并减少肿瘤的转移,其治疗作用部分是通过上调肝脏PTEN的表达而实现的^[58];而Lah *et al*^[59]在研究水飞蓟素对体外培养的肝癌细胞的影响时也发现,水飞蓟素抑制肝癌细胞生长的作用与其增加PTEN的活力和降低Akt的磷酸化密切相关。这表明PTEN表达的变化与HCC的治疗密切相关。

5 PTEN与其他肝脏疾病

国内外有关PTEN与肝癌以外的肝脏疾病的报道甚少。在非肿瘤肝脏疾病中,非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)由于其可进展为肝硬化和肝癌而越来越引起人们的重视^[60]。研究发现特异性肝细胞PTEN缺陷小鼠在40周龄时肝细胞出现大泡样脂肪变及气球样变、肝小叶有炎细胞浸润以及肝窦周围发生纤维化等类似人NASH的组织学表现,在80周龄时,所有的PTEN缺陷小鼠出现肝脏腺瘤,66%的发生肝癌^[61-63]。这似乎表明PTEN在NASH的形成中扮演重要角色。进一步的研究发现特异性肝细胞PTEN缺陷小鼠的肝脏组织学表现及其产生机制与人非酒精性脂肪性肝病一致^[64-65],在引起肝细胞PTEN缺陷小鼠的肝脏脂肪性炎症损害中主要是脂肪酸合成的基因表达上调,脂肪酸 β 氧化的相关基因表达增加,肝细胞膜的脂质过氧化物引起肝细胞的氧化应激导致了肝脏炎症损害。这可能为我们弄清NASH的发病机制及进行有效的治疗提供了启示。

一些研究显示PTEN的表达异常参与了肝脂肪变性的发生。在PTEN缺失的鼠类肝脏表现出脂肪酸的合成增加、肝脏肿大和脂肪肝形成的变化^[66],而Waris *et al*^[67]在研究慢性丙型肝炎引起的肝脂肪变性时发现丙型肝炎诱发氧化应激,继而引起PTEN的失活和PI3K/Akt信号的活化^[67];进一步的研究表明在人和大鼠脂肪变性的肝组织中PTEN的表达均下调,受高水平不饱

和脂肪酸影响的肝细胞的PTEN表达下调能诱导肝脂肪变性,并且哺乳动物雷帕霉素靶分子(mammalian target of rapamycin, mTOR)和NF- κ B也参与了此过程^[68]。这表明PTEN的低表达与肝脂肪变性的发生有相关性。

乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)在乙型肝炎患者发生肝癌的过程中扮演重要作用,而HBx可能是通过抑制PTEN的作用导致了肝癌的发生^[37,69]。近年的研究^[70]进一步证实PTEN的表达可降低HBx诱导的PI3K/Akt活性、Akt及Bad的磷酸化,以及HBx对凋亡蛋白caspase 3的抑制和对DNA裂解的保护等一系列HBx产生的抗肝细胞凋亡信号;同时PTEN还能使HBx介导的肝细胞生长阻止于G₁期。这些结果表明PTEN对HBx介导的信号有强烈的调节作用,PTEN可能是一个阻止乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起肝癌的重要靶点。

6 结论

PTEN是迄今发现的第一个具有双重特性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,自发现以来受到众多学者的关注,对于PTEN的磷酸酶活性及其作用底物、对细胞内信号转导的影响、在肿瘤发生发展中的作用等研究已取得初步进展。近年来,对PTEN的研究已从肿瘤领域逐渐延伸到一些非肿瘤领域,在肝脏疾病方面,除了对肝癌的研究外,一些学者也对PTEN与NASH、肝脂肪变性等非肿瘤肝脏疾病的关系进行了探讨。研究表明,PTEN的表达异常参与了肝癌的发生发展,并与其病理学分级和预后有关;PTEN的缺失或低表达也可能与NASH、肝脂肪变性的发生具有相关性。但对于PTEN在肝纤维化形成和发展中的作用国内外尚无研究报道。总之,PTEN在非肿瘤肝脏疾病中的研究甚少,在肝纤维化中的作用尚不清楚,有待进一步研究探讨。

7 参考文献

- 1 Li J, Yen C, Liaw D, Podyspanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 2 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat*

- Genet* 1997; 15: 356-362
- 3 Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
 - 4 Hlobilkova A, Knillova J, Bartek J, Lukas J, Kolar Z. The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003; 147: 19-25
 - 5 Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7491-7496
 - 6 Georgescu MM, Kirsch KH, Kaloudis P, Yang H, Pavletich NP, Hanafusa H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 2000; 60: 7033-7038
 - 7 Murray D, Honig B. Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol Cell* 2002; 9: 145-154
 - 8 Torres J, Rodriguez J, Myers MP, Valiente M, Graves JD, Tonks NK, Pulido R. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* 2003; 278: 30652-30660
 - 9 Valiente M, Andres-Pons A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, Antonarakis SE, Pulido R. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem* 2005; 280: 28936-28943
 - 10 Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 48627-48630
 - 11 Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 2001; 276: 993-998
 - 12 Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA, Heitz PU, Eng C. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* 2000; 157: 1097-1103
 - 13 Liu JL, Mao Z, LaFortune TA, Alonso MM, Gallick GE, Fueyo J, Yung WK. Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. *Cancer Res* 2007; 67: 11054-11063
 - 14 Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavay S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2002; 99: 63-67
 - 15 Chung JH, Eng C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 8096-8100
 - 16 Minaguchi T, Waite KA, Eng C. Nuclear localization of PTEN is regulated by Ca(2+) through a tyrosyl phosphorylation-independent conformational modification in major vault protein. *Cancer Res* 2006; 66: 11677-11682
 - 17 Yi HK, Kim SY, Hwang PH, Kim CY, Yang DH, Oh Y, Lee DY. Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 760-767
 - 18 Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 605-616
 - 19 Weng LP, Brown JL, Baker KM, Ostrowski MC, Eng C. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1687-1696
 - 20 Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S, Bratasz A, Trigg NJ, Kutala VK, Hideg K, Kuppusamy P. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* 2007; 282: 28609-28618
 - 21 Gautam A, Li ZR, Bepler G. RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* 2003; 22: 2135-2142
 - 22 Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1904-1914
 - 23 Park JK, Jung HY, Park SH, Kang SY, Yi MR, Um HD, Hong SH. Combination of PTEN and gamma-ionizing radiation enhances cell death and G(2)/M arrest through regulation of AKT activity and p21 induction in non-small-cell lung cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70: 1552-1560
 - 24 Hlobilkova A, Ehrmann J, Sedlakova E, Krejci V, Knizetova P, Fiuraskova M, Kala M, Kalita O, Kolar Z. Could changes in the regulation of the PI3K/PKB/Akt signaling pathway and cell cycle be involved in astrocytic tumor pathogenesis and progression? *Neoplasma* 2007; 54: 334-341
 - 25 Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res* 2003; 63: 282-286
 - 26 Chung JH, Ostrowski MC, Romigh T, Minaguchi T, Waite KA, Eng C. The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2553-2559
 - 27 Wu RC, Li X, Schonthal AH. Transcriptional activation of p21WAF1 by PTEN/MMAC1 tumor suppressor. *Mol Cell Biochem* 2000; 203: 59-71
 - 28 Choi HJ, Chung TW, Kang SK, Lee YC, Ko JH, Kim JG, Kim CH. Ganglioside GM3 modulates tumor suppressor PTEN-mediated cell cycle progression-transcriptional induction of p21(WAF1) and p27(kip1) by inhibition of PI-3K/AKT pathway. *Glycobiology* 2006; 16: 573-583
 - 29 Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998; 12: 3499-3511
 - 30 Moon SK, Kim HM, Kim CH. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression via the regulation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 2004; 421:

- 267-276
- 31 Lin PY, Fosmire SP, Park SH, Park JY, Baksh S, Modiano JF, Weiss RH. Attenuation of PTEN increases p21 stability and cytosolic localization in kidney cancer cells: a potential mechanism of apoptosis resistance. *Mol Cancer* 2007; 6: 16
 - 32 Cai XM, Tao BB, Wang LY, Liang YL, Jin JW, Yang Y, Hu YL, Zha XL. Protein phosphatase activity of PTEN inhibited the invasion of glioma cells with epidermal growth factor receptor mutation type III expression. *Int J Cancer* 2005; 117: 905-912
 - 33 Rinker-Schaeffer CW, O'Keefe JP, Welch DR, Theodorescu D. Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3882-3889
 - 34 Tao J, Xiong J, Li T, Yang Z, Li X, Li K, Wu H, Wang C. Correlation between protein expression of PTEN in human pancreatic cancer and the proliferation, infiltration, metastasis and prognosis. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2006; 26: 444-447
 - 35 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 3579-3583
 - 36 Furukawa K, Kumon Y, Harada H, Kohno S, Nagato S, Teraoka M, Fujiwara S, Nakagawa K, Hamada K, Ohnishi T. PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules. *Int J Oncol* 2006; 29: 73-81
 - 37 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
 - 38 Shukla S, MacLennan GT, Hartman DJ, Fu P, Resnick MI, Gupta S. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2007; 121: 1424-1432
 - 39 Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, Lamerato-Kozicki AR, Bianco SR, Wojcieszyn JW, Breen M, Helfand SC, Modiano JF. Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Vet Pathol* 2005; 42: 618-632
 - 40 Suzuki A, Hamada K, Sasaki T, Mak TW, Nakano T. Role of PTEN/PI3K pathway in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 172-176
 - 41 Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N, Hung MC. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3257-3263
 - 42 Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, Sasaki T, Mak TW, Nakano T. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2003; 197: 657-667
 - 43 Hagenbeek TJ, Spits H. T-cell lymphomas in T-cell-specific Pten-deficient mice originate in the thymus. *Leukemia* 2008; 22: 608-619
 - 44 Janas ML, Hodson D, Stamatakis Z, Hill S, Welch K, Gambardella L, Trotman LC, Pandolfi PP, Vigorito E, Turner M. The effect of deleting p110delta on the phenotype and function of PTEN-deficient B cells. *J Immunol* 2008; 180: 739-746
 - 45 Harris SJ, Parry RV, Westwick J, Ward SG. Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2008; 283: 2465-2469
 - 46 Fujiwara Y, Hoon DS, Yamada T, Umeshita K, Gotoh M, Sakon M, Nishisho I, Monden M. PTEN / MMAC1 mutation and frequent loss of heterozygosity identified in chromosome 10q in a subset of hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 287-292
 - 47 Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, Chen J, Zhang L, Wu M, Zhen S, Zhu J. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer* 2002; 2: 29
 - 48 Ma DZ, Xu Z, Liang YL, Su JM, Li ZX, Zhang W, Wang LY, Zha XL. Down-regulation of PTEN expression due to loss of promoter activity in human hepatocellular carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4472-4477
 - 49 Zhang L, Yu Q, He J, Zha X. Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines. *Mol Cell Biochem* 2004; 262: 25-33
 - 50 Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37: 389-396
 - 51 Dong-Dong L, Xi-Ran Z, Xiang-Rong C. Expression and significance of new tumor suppressor gene PTEN in primary liver cancer. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 67-71
 - 52 Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM, Tai MH. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1929-1940
 - 53 Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Tsuchiya M, Nagasue N. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer* 2002; 100: 152-157
 - 54 Huang AM, Ding Y, Liu JF, Gao LY, Zang SB, Chen SP. Expression of survivin, p27 and PTEN in hepatocellular carcinoma and their clinical significances. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2008; 16: 17-20
 - 55 Hu TH, Wang CC, Huang CC, Chen CL, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM, Changchien CS, Tai MH. Down-regulation of tumor suppressor gene PTEN, overexpression of p53, plus high proliferating cell nuclear antigen index predict poor patient outcome of hepatocellular carcinoma after resection. *Oncol Rep* 2007; 18: 1417-1426
 - 56 Wan XW, Jiang M, Cao HF, He YQ, Liu SQ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 100-106
 - 57 Wu SK, Wang BJ, Yang Y, Tian YJ, Bao JJ, Feng XH, Yang DL. Expressions of phosphorylated-Smad2 and PTEN in hepatocellular carcinomas and adjacent liver tissues. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 567-571
 - 58 Yin LR, Chen ZX, Zhang SJ, Sun BG, Liu YD, Huang HZ. Expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in liver of athymic mice with hepatocellular carcinoma and the effect of Fuzheng Jiedu Decoction. *World J Gastroenterol* 2008;

- 14: 108-113
- 59 Lah JJ, Cui W, Hu KQ. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5299-5305
- 60 Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, Dominguez A, Fernandez-Escalante JC, Crespo J, Pons-Romero F. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma. *Obes Surg* 2005; 15: 442-446
- 61 Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004; 113: 1774-1783
- 62 Sato W, Horie Y, Watanabe S, Suzuki A. Tumor suppressor gene PTEN and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Nippon Rinsho* 2005; 63: 1475-1483
- 63 Watanabe S, Horie Y, Suzuki A. Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2005; 33: 161-166
- 64 Horie Y, Ohshima S, Sato W, Suzuki A, Watanabe S. Hepatocyte-specific Pten deficient mice. *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1033-1042
- 65 Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, Sato W, Dohmen T, Ohshima S, Goto T, Suzuki A. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S96-S100
- 66 Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim YJ, Sherwin R, Devaskar S, Lesche R, Magnuson MA, Wu H. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2082-2087
- 67 Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol* 2007; 81: 8122-8130
- 68 Vinciguerra M, Veyrat-Durebex C, Moukil MA, Rubbia-Brandt L, Rohner-Jeanrenaud F, Foti M. PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via an NF-kappaBp65/mTOR-dependent mechanism. *Gastroenterology* 2008; 134: 268-280
- 69 Chung TW, Lee YC, Ko JH, Kim CH. Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3453-3458
- 70 Kang-Park S, Im JH, Lee JH, Lee YI. PTEN modulates hepatitis B virus-X protein induced survival signaling in Chang liver cells. *Virus Res* 2006; 122: 53-60

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, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 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 2008-06-18)

遗传多态性与肠易激综合征发病的关系

邱敏霞, 刘诗

■背景资料

功能性胃肠病病因及发病机制尚不明确, 因此对其采取正确治疗一直是临床的难点. 本文综述了针对目前对肠易激综合征基因水平的研究, 认为其发病与遗传学及相关基因多态性的关系是密不可分的.

邱敏霞, 刘诗, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 420022

作者贡献分布: 文献检索, 资料分析和论文撰写由邱敏霞完成; 选题和审校由刘诗完成.

通讯作者: 刘诗, 420022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. shiliugao@yahoo.com

电话: 027-85726447

收稿日期: 2008-01-26 修回日期: 2008-03-25

Relationship between genetic polymorphism and irritable bowel syndrome pathogenesis

Min-Xia Qiu, Shi Liu

Min-Xia Qiu, Shi Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 420022, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Shi Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 420022, Hubei Province, China. shiliugao@yahoo.com

Received: 2008-01-26 Revised: 2008-03-25

Abstract

Irritable bowel syndrome is a common functional disorder, whose etiology remains unknown. Previous researches indicated that its pathogenesis might be associated such factors as gastrointestinal motor abnormality, altered visceral sensation, psychological factors, neurotransmitter and imbalance of gastrointestinal flora, intestinal infection and food intolerance, etc. Besides, recent research has touched on relationship between genetics and IBS. This paper reviewed relationship between the inheritance, gene-linked polymorphism and irritable bowel syndrome pathogenesis.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Gene polymorphism; Serotonin transporter

Qiu MX, Liu S. Relationship between genetic polymorphism and irritable bowel syndrome pathogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1912-1916

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)

是最常见的一种功能性疾病, 病因尚不清楚, 先前的研究表明其发病机制与下列因素有关: 胃肠动力学异常, 内脏感觉异常, 精神因素, 神经递质和肠道菌群失衡, 肠道感染以及食物不耐受等因素. 而近来遗传因素和IBS发病关系的研究也进一步深入, 本文综述遗传和相关基因多态性与IBS发病之间的联系.

关键词: 肠易激综合征; 基因多态性; 5-HT转运体

邱敏霞, 刘诗. 遗传多态性与肠易激综合征发病的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1912-1916

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1912.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性肠病. 既往分别在胃肠动力^[1], 内脏敏感性^[2], 精神心理因素^[3-4], 肠道菌群失调^[5-8], 肠道感染^[9]和食物不耐受等相关因素方面进行了较多的研究. 因其病因及发病机制不明确, 使其治疗方面也存在一定的难度. 遗传学及相关基因与IBS病因及发病机制的关系也逐渐被关注与研究.

1 遗传学和发病机制

Morris-Yates *et al*研究显示^[12], 对686例双胞胎进行问卷调查, 其中33例(4.8%)有一个或者多个胃肠道症状, 功能性肠病的一致性在单卵双胞胎是33%, 而在双卵双胞胎是12% ($P < 0.05$), 此研究说明功能性肠病的发病可能受遗传控制. Leczy *et al*^[13]对10, 699例进行了问卷调查, 其中6060个双胞胎, 同时对其父母是否也患有IBS进行了调查, 问卷结果是单卵双胞胎有17%的一致性, 双卵双胞胎8%的一致性, 这一结果进一步支持了遗传因素在IBS发病中起到重要作用. 因此, 近来对遗传因素与IBS发病关系进行了大量的研究.

动力、分泌及内脏感觉改变是肠易激综合征的特征, 在消化道黏膜层肠嗜铬细胞和感觉神经之间的5羟色胺(serotonin, 5-HT)信号通路

■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

调节胃肠道功能,发现5-HT信号通路的改变有可能参与IBS患者肠道功能及感觉改变的发病机制^[14-21]. IBS的5-HT信号通路改变的要素包括:肠嗜铬细胞数量、色氨酸羟化酶信号水平、血清5-HT水平和5-HT再摄取转运体的表达等. IBS患者中先天的和环境因素均可导致5-HT再摄取转运体水平的降低,5-HT选择性再摄取转运体基因启动子区多态性导致了患者的遗传易感性,而炎症介质可诱发5-HT再摄取转运体水平的下调^[22]. 当然,仍需进一步的研究以获取更全面的了解5-HT信号通路的改变,他们的诱因与影响以及其中何种变化有病理生理学的意义.

2 5-HT 转运体多态性

2.1 与IBS的关系 国内外部分研究表明5-HT遗传因素可能与IBS的发病相关^[23-28],人类5-HT转运体基因存在多个多态性位点. 国外研究显示启动子区的5-HT转运体基因相关多态区(5-HT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR)和内含子二区的可变数串联重复序列(variable number tandem repeats, VNTRs)多态性与IBS相关. Saito *et al*^[29]一项遗传药理学研究比较IBS与正常对照者5-HTTLPR和GNbeta3-C825T等位基因多态性的基因频率区别,所有调查对象均完成调查问卷和抽血,PCR方法检测DNA分型. 结果显示混合型IBS中5-HT转运体基因的相关多态区中S等位基因出现频率高于正常对照组,从而认为5-HTTLPR与混合型IBS发病有关,而与腹泻型IBS和便秘型IBS发病无明显关联. GNbeta3-C825T的基因多态性与所有类型IBS患者无明显联系. Wang *et al*^[30]也研究了5-HT转运体多态性与肠易激综合症的关系,他们使用PCR方法测定81例IBS患者与48例正常对照者5-HT转运体基因内含子二区VNTRs和5-HTTLPR的区别,结果发现相对于正常对照者,IBS患者的VNTRs区有较高频率的STin2.12/10基因型和较低频率的STin2.12/12基因型,而这个区的基因多态性在便秘型IBS,腹泻型IBS和混合型IBS之间无明显差异. 5-HTTLPR等位基因L/L基因型在便秘型IBS患者中出现频率高于腹泻型和混合型IBS患者,同时L/S基因型出现频率降低,另有便秘型IBS中VNTRs中STin2.12/12基因型和5-HTTLPR中L/L基因型关联出现的频率是高于混合型IBS和正常对照者的. Yeo *et al*^[31]以194例北美白种女性IBS患者和448例白种女性健康对照为对象,以9种5-HT转运体多态性为基础,对所有受试者

DNA进行PCR分析,也同样发现5-HT转运体是女性腹泻型IBS的一种潜在的疾病候选基因. Li *et al*^[32]探讨5-HT转运体与IBS发病的关系中,用PCR方法检测使用罗马II标准诊断的87例IBS患者和96例正常对照者的5-HT转运体基因多态性,结果也同样显示5-HTTLPR等位基因L/L基因型出现频率在便秘型IBS患者显著高于对照组. 谭慧珍 *et al*^[33]和谢军 *et al*^[34]的研究也同样显示. 5-HT转运体多态性与IBS患者抑郁和焦虑症状的关系亦有报道. Jarrett *et al*^[35]研究了两种精神症状与两种5-HT转运体多态区:分别是位于启动子区5-HTTLPR和内含子二区可变数串联重复序列(STin2 VNTR),对21例男性患者和117例女性患者,均行精神健康史和现在的心理不良应激评估,并取血做基因分型. 结果发现存在纯合的短等位基因5-HTTLPR或携带有STin2 VNTR等位基因的患者较其他更易有抑郁,焦虑病史和一般的心理不良应激,这个结果支持了IBS的生物-心理-医学模式,也支持了5-HT转运体基因型可以改变抑郁发作的风险.

2.2 调节5-HT转运体多态性的相关细胞因子 有多项研究显示肠道黏膜5-HT转运体在结肠炎动物模型、炎症性肠病和IBS患者肠道黏膜中表达是降低的,而5-HT转运体的功能和表达的改变可能是上述疾病中肠道功能紊乱(动力改变、黏膜分泌以及感觉异常)的发病基础. 为了能找出引起5-HT转运体表达下调的调节因子, Foley *et al*^[36]选用了来源于有活性的人淋巴细胞作为条件培养基,培养结肠上皮细胞(Caco2,这种培养基促成了5-HT再摄取),培养的细胞分别被IFN- γ (500 $\mu\text{g/L}$), TNF- α (50 $\mu\text{g/L}$), IL-12(50 $\mu\text{g/L}$)处理,经过3 d的培养,结果发现IFN- γ 和TNF- α 导致了5-HT运载体功能的降低,这两种细胞因子也使得5-HT运载体mRNA和蛋白水平降低.

3 GNbeta3-C825T 基因多态性

GNbeta3通过配体激活作用影响G蛋白翻译,已有报道说明功能性消化不良与GNbeta3基因的纯合基因型C825T多态现象有关^[37],而与下消化道功能紊乱的关系还不明确. Andresen *et al*^[38]研究比较GNbeta3基因型的发病在功能性胃肠病患者与正常对照者之间的不同,并检测GNbeta3-C825T在IBS,上腹痛综合征和IBS合并上腹痛综合征,以及上消化道症状评分高低患者之间遗传性的不同,结果发现GNbeta3-C825T基因多态现象与下消化道功能紊乱疾病之间并无关系.

■ 研发前沿
TNF- α 和IL-10 基因多态性, α_2 -肾上腺素能受体与IBS关系均是目前国内外研究重点.

■ 相关报道

目前针对基因多态性与IBS关系研究的文献比较丰富的, Saito *et al*以及Wang *et al*的研究均系统具体的针对5-HT转运体多态性与IBS关系进行。

这一点在Saito *et al*^[29]的研究中也同样显示。另有Cao *et al*^[39]研究提示GNbeta3-C825T多态性与抑郁障碍存在明显的相关性, 认为GNbeta3-C825T等位基因增加了抑郁障碍患病风险。

4 TNF- α 和IL-10基因多态性

炎症可能在部分IBS患者发病机制中起到一定作用, 持续的炎症反应, 起因于细胞因子调节炎症反应的不平衡, 而细胞因子受基因控制已经确立, 那么IBS患者中是否存在特有的遗传素质所致的抗炎细胞因子产生的改变, 很多学者对此进行了研究。Frieling *et al*^[40]的研究显示炎症可致IL-10启动子区基因多态性的变化。Gonsalkorale *et al*^[41]分别从230例IBS患者和正常对照者的外周血细胞因子中提取DNA, 通过对IL-10的-1082区的检测分析, 结果发现IBS患者有明显的高表达IL-10水平基因型的减少。这一结果提示了至少部分IBS患者存在抗炎因子IL-10的量较正常对照低的遗传素质。另有van der Veek *et al*^[42]研究了TNF- α 和IL-10基因多态性和IBS发病的关系, 具体针对IBS患者TNF- α 和IL-10的基因启动子区单核苷酸多态性, 通过分别从IBS患者和正常对照的外周白细胞中提取DNA, 分析单个核苷酸TNF- α 的-308和-1082的单核苷酸多态区和IL-10的-819单核苷酸多态区的基因型和等位基因频率, 结果发现纯合子高表达TNF- α 比较少见, 杂合子TNF- α 基因型(G/A)IBS患者显著高于正常对照者, 更多的患者相对于对照组表现为A等位基因的高阳性率, 且同样的倾向出现在腹泻型IBS与其余两种亚型相对比的情况下。IL-10基因型在患者和正常对照组单个核苷酸多态区同样分布, IBS患者中拥有高表达TNF- α 和低表达IL-10基因型发生率较对照组高, 在腹泻型IBS较便秘型和混合型IBS患者高。Wang *et al*^[43]也研究了IL-10基因启动子区域的-1082, -819, -592位置的三倍体等位基因与腹泻型IBS的关系, 他们利用放大受阻突变体系PCR方法扩增出IL-10基因启动子区域的-1082, -819, -592, 比较其腹泻型IBS患者与正常对照者的区别, 发现腹泻型IBS患者IL-10基因启动子-819区有较高频率的T/T基因型以及-592区A/A基因型出现频率增加, 均较健康对照者有显著性差异。其结果进一步支持了遗传决定免疫反应在IBS发病中存在作用的新设想, 更多的研究须解决哪些确定的细胞因子基因多态性与IBS各种亚型的关系。

5 α_2 -肾上腺素能受体与IBS

胃肠道受外周去甲肾上腺素能神经支配来调节各种消化功能^[44]。包括黏膜分泌, 肠道蠕动和消化道感觉, 并通过 α_2 -肾上腺素能受体活动, 此类受体几乎参与了所有肠道神经递质接头前调节, 他们也同样在突触后间隙起到作用。临床研究显示 α_2 -肾上腺素能受体在结肠蠕动幅度和感觉方面均有作用, 且用 α_2 -肾上腺素能受体激动剂可以改善肠道功能诱导IBS患者症状缓解。而遗传研究表明 α_2 -肾上腺素能受体基因多态性在功能性下消化道疾病中与便秘及躯体症状有着明显联系。有证据显示交感肾上腺素能功能障碍与IBS的发病也有一定关系^[45]。临床术后肠梗阻模型表明在肠肌从单核细胞中 α_2 -肾上腺素能受体强烈表达, 该受体通过阻碍肠道神经传递, 促进该区黏膜炎症反应, 从而致术后消化道功能异常。因此认为 α_2 -肾上腺素能受体在肠道炎症反应过程中是上调的, α_2 -肾上腺素能受体调节机制所致的动力改变在炎症和非炎症区都是存在的, 此项研究为今后在针对 α_2 -肾上腺素能受体靶向药物治疗IBS提供了可能性的前提。人类的 α_2 -肾上腺素能受体分为 α_{2A} , α_{2B} 和 α_{2C} ^[46-47]。Kim *et al*^[48]研究结果显示两种不同的 α_{2A} 和 α_{2C} 肾上腺素能受体与便秘型IBS及高的躯体症状评分患者有关。

6 结论

IBS与遗传学存在着密切的关系, 其中5-HT转运体基因多态性在IBS发病中起着很重要的作用, IBS患者中5-HT转运体STin2.12/10基因型的出现可能与IBS发病有关, 而其基因联合多态区等位基因L/L基因型和其与STin2.12/10基因型关联出现增加了便秘型IBS的发病率, 而L/S基因型的出现增加了腹泻型-IBS的发病率^[49]。5-HT转运体基因多态性也与IBS患者抑郁焦虑症状的发生也存在密切关系。虽然在一项5-HT转运体蛋白活动中基因编码的功能性多态现象与IBS关系的Meta分析中, Van Kerkhoven *et al*^[50]通过描述5-HT产生长链和短链等位基因多态现象的频率, 评价了5-HT转运体蛋白活动中基因编码的功能性多态现象与IBS的关系, 8个被选的研究描述了总共1034例IBS患者及1377例正常对照者短链等位基因的发生与IBS发病风险增加并无联系。Lee *et al*^[51]的研究也同样认为总体来说两者之间并无明显联系。尽管如此, 大量的实验还是为5-HT转运体基因多态性与IBS的发病

关系提供了肯定的依据, 仍需进一步的研究来证实其中具体的联系以及机制。

7 参考文献

- 1 Cole SJ, Duncan HD, Claydon AH, Austin D, Bowling TE, Silk DB. Distal colonic motor activity in four subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 345-355
- 2 Qian JM. Serotonin, visceral sensation in irritable bowel syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 2067-2068
- 3 Kovacs Z, Kovacs F. Depressive and anxiety symptoms, coping strategies in patients with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Psychiatr Hung* 2007; 22: 212-221
- 4 Pae CU, Masand PS, Ajwani N, Lee C, Patkar AA. Irritable bowel syndrome in psychiatric perspectives: a comprehensive review. *Int J Clin Pract* 2007; 61: 1708-1718
- 5 Othman M, Aguero R, Lin HC. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 11-16
- 6 Quigley EM. Bacteria: a new player in gastrointestinal motility disorders--infections, bacterial overgrowth, and probiotics. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 735-748
- 7 Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 41-47
- 8 Riordan SM, Kim R. Bacterial overgrowth as a cause of irritable bowel syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 669-673
- 9 Wang L, Fang X, Pan G. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002; 41: 90-93
- 10 Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101
- 11 Ausloos F, Belaiche J, Louis E. Food intolerance and allergy in the irritable bowel syndrome. *Rev Med Liege* 2005; 60: 744-749
- 12 Morris-Yates A, Talley NJ, Boyce PM, Nandurkar S, Andrews G. Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1311-1317
- 13 Levy RL, Jones KR, Whitehead WE, Feld SL, Talley NJ, Corey LA. Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* 2001; 121: 799-804
- 14 Wang SH, Dong L, Luo JY, Gong J, Li L, Lu XL, Han SP. Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6041-6047
- 15 Crowell MD. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1285-1293
- 16 Spiller R. Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 Suppl 2: 25-31
- 17 Cervio E, Rondanelli M, Balestra B, Dellabianca A, Agazzi A, Giacosa A, Tonini M. Recent insights into the pathogenesis of abdominal symptoms in functional bowel disorders. *Recenti Prog Med* 2007; 98: 69-73
- 18 Greenwood-van Meerveld B. Importance of 5-hydroxytryptamine receptors on intestinal afferents in the regulation of visceral sensitivity. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 Suppl 2: 13-18
- 19 Costedio MM, Hyman N, Mawe GM. Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 376-388
- 20 Crowell MD, Harris L, Jones MP, Chang L. New insights into the pathophysiology of irritable bowel syndrome: implications for future treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 272-279
- 21 Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 3-14
- 22 Mawe GM, Coates MD, Moses PL. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1067-1076
- 23 谢军, 李瑜元, 聂玉强, 梁培智, 张龙. 广东省汉族人群肠易激综合征5-羟色胺转运蛋白基因多态性研究. *中华医学杂志* 2005; 85: 1933-1935
- 24 Talley NJ. Environmental versus genetic risk factors for irritable bowel syndrome: clinical and therapeutic implications. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 82-88
- 25 Holtmann G. IBS: a syndrome or many diseases? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18 Suppl: 91-97
- 26 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2405-2408
- 27 Pata C, Erdal ME, Derici E, Yazar A, Kanik A, Ulu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1780-1784
- 28 Camilleri M. Pharmacogenomics and functional gastrointestinal disorders. *Pharmacogenomics* 2005; 6: 491-501
- 29 Saito YA, Locke GR 3rd, Zimmerman JM, Holtmann G, Slusser JP, de Andrade M, Petersen GM, Talley NJ. A genetic association study of 5-HTT LPR and GNbeta3 C825T polymorphisms with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 465-470
- 30 Wang BM, Wang YM, Zhang WM, Zhang QY, Liu WT, Jiang K, Zhang J. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Zhonghua Neike Zazhi* 2004; 43: 439-441
- 31 Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbins M, Knaggs A, Asquith S, Taylor I, Bahari B, Crocker N, Rallan R, Varsani S, Montgomery D, Alpers DH, Dukes GE, Purvis I, Hicks GA. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome in women. *Gut* 2004; 53: 1452-1458
- 32 Li YY, Nie YQ, Xie J, Tan HZ, Zhou YJ, Wang H. Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome and their impact on tegaserod treatment. *Zhonghua Neike Zazhi* 2006; 45: 552-555
- 33 谭慧珍, 谢军, 李瑜元, 聂玉强, 林曼鹏, 曾辉, 周鹏志. 5-羟色胺转运体蛋白基因多态性与替加色罗治疗便秘型肠易激综合征疗效的关系. *广东医学* 2006; 27: 84-85
- 34 谢军, 李瑜元, 聂玉强, 梁培智, 张龙. 肠易激综合征5-羟色胺转运蛋白基因多态性研究. *广州医学院学报*

■创新盘点

此文与其它相关文章不同之处在于不仅综述了5-HT转运体多态性与IBS关系, 还针对诸如GNbeta3-C825T基因多态性等其它与IBS发病关系密切的相关基因多态性研究作了综述。

■同行评价

本文就某些基因多态性与肠易激综合征发病的关系进行综述,对IBS发病的分子机制进行较深入的探讨,对指导临床有一定价值。

- 2005; 33: 1-4
- 35 Jarrett ME, Kohen R, Cain KC, Burr RL, Poppe A, Navaja GP, Heitkemper MM. Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome. *Biol Res Nurs* 2007; 9: 161-169
- 36 Foley KF, Pantano C, Ciolino A, Mawe GM. IFN-gamma and TNF-alpha decrease serotonin transporter function and expression in Caco2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G779-G784
- 37 Grudell AB, Camilleri M, Carlson P, Gorman H, Ryks M, Burton D, Baxter K, Zinsmeister AR. An exploratory study of the association of adrenergic and serotonergic genotype and gastrointestinal motor functions. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 213-219
- 38 Andresen V, Camilleri M, Kim HJ, Stephens DA, Carlson PJ, Talley NJ, Saito YA, Urrutia R, Zinsmeister AR. Is there an association between GNbeta3-C825T genotype and lower functional gastrointestinal disorders? *Gastroenterology* 2006; 130: 1985-1994
- 39 Cao MQ, Hu SY, Zhang CH, Xia DS. Study on the interrelationship between 5-HTTLPR/G-protein beta3 subunit (C825T) polymorphisms and depressive disorder. *Psychiatr Genet* 2007; 17: 233-238
- 40 Frieling T. Functional and inflammatory bowel disorders. *Med Klin (Munich)* 2006; 101 Suppl 1: 139-142
- 41 Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003; 52: 91-93
- 42 van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2510-2516
- 43 Wang BM, Jiang XZ, Yang YL, Liu WT, Cao XC, Zhao XZ. A study of interleukin-10 gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Zhonghua Neike Zazhi* 2006; 45: 289-292
- 44 Blandizzi C. Enteric alpha-2 adrenoceptors: pathophysiological implications in functional and inflammatory bowel disorders. *Neurochem Int* 2007; 51: 282-288
- 45 Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Zinsmeister AR. Autonomic dysfunction in gastrointestinal motility disorders. *Gut* 1993; 34: 397-401
- 46 Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Expansion of the alpha 2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha 2-adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5094-5098
- 47 Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6301-6305
- 48 Kim HJ, Camilleri M, Carlson PJ, Cremonini F, Ferber I, Stephens D, McKinzie S, Zinsmeister AR, Urrutia R. Association of distinct alpha(2) adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 2004; 53: 829-837
- 49 谭慧珍, 谢军, 冯崇廉, 曾晖, 梁庆辉, 周鹏志. 肝郁脾虚型肠易激综合征与5-羟色胺转运体基因多态性的关系. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 147-149
- 50 Van Kerkhoven LA, Laheij RJ, Jansen JB. Meta-analysis: a functional polymorphism in the gene encoding for activity of the serotonin transporter protein is not associated with the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 979-986
- 51 Lee DY, Park H, Kim WH, Lee SI, Seo YJ, Choi YC. Serotonin transporter gene polymorphism in healthy adults and patients with irritable bowel syndrome. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 18-22

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. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-18)

排便图式及其在便秘治疗中的转换与构建

陈峰, 蔡而玮, 邓正明

陈峰, 邓正明, 福州市第一医院肛肠科 福建省福州市 350009
蔡而玮, 福建省人民医院肛肠科 福建省福州市 350009
作者贡献分布: 陈峰对此文作主要贡献; 此文由陈峰、蔡而玮及邓正明提出设计; 蔡而玮与邓正明审阅; 写作由陈峰完成。
通讯作者: 陈峰, 350009, 福建省福州市, 福州市第一医院肛肠科. fzsychen@163.com
电话: 0591-3269925-731
收稿日期: 2008-01-28 修回日期: 2008-04-01

Transformation and construction of a new defecation schema for treatment of constipation

Feng Chen, Er-Wei Cai, Zheng-Ming Deng

Feng Chen, Zheng-Ming Deng, Department of Coloproctology, Fuzhou Municipal First Hospital, Fuzhou 350009, Fujian Province, China
Er-Wei Cai, Department of Coloproctology, Fujian Provincial People's Hospital, Fuzhou 350009, Fujian Province, China
Correspondence to: Feng Chen, Department of Coloproctology, Fuzhou Municipal First Hospital, Fuzhou 350009, Fujian Province, China. fzsychen@163.com
Received: 2008-01-28 Revised: 2008-04-01

Abstract

This paper investigated psychological changes in patients with constipation based on J.Piagetian cognitive constructivism and held that psychological disturbance of defecation was attributable to the disorder of auto-regulation's equilibrium mechanism between assimilation and accommodation. And this paper thereby proposed the psychotherapy model of "cognition-coordination-construction" to help patients establish a new defecation schema to achieve both short-term and long-term therapeutic effects.

Key Words: Constipation; Defecation schema; Cognitive structure; Construction

Chen F, Cai EW, Deng ZM. Transformation and construction of a new Defecation schema for treatment of constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1917-1919

摘要

从皮亚杰的平衡化建构理论出发探讨便秘患

者心理变化, 认为排便心理障碍的根本原因是由于患者的排便图式中同化与顺应之间自动调节的平衡机制出现障碍, 从而提出“认知-协调-建构”的排便心理治疗模式, 以帮助患者构建适合自己的排便图式, 提高便秘治疗的近期和远期疗效。

关键词: 便秘; 排便图式; 认知结构; 建构

陈峰, 蔡而玮, 邓正明. 排便图式及其在便秘治疗中的转换与建构. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1917-1919
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1917.asp>

0 引言

目前有关便秘的研究多是临床应用, 而较少探讨便秘患者在诊疗过程中内在心理结构所发生的变化. 本文基于皮亚杰(J.Piaget)的平衡化建构图式理论, 引入“排便图式”的概念, 即排便的认知结构来分析便秘患者心理障碍的产生, 提出治疗便秘的“认知-协调-建构”模式。

1 认知结构以及排便图式在排便信息加工过程中的作用

认知结构(cognitive structure)也称为“认知图式”, 皮亚杰认为认知结构来源于主客体的相互作用并内化于大脑中而形成, 是知识的内容及知识的组织形式, 他的基本功能表现为: 获得外部信息, 并将这些信息转化为自身的知识结构, 最终用他指导自己的实际行为^[1]. 排便是一种复杂而又协调的生理反射机能, 最初是一些遗传性的本能反射动作, 在发育成长过程中, 随着适应各种环境如工作生活条件、饮食习惯、身体结构与功能及心理因素等种种变化的基础上, 不断地改变和复杂化而逐渐形成对排便反射这种机能的一种内在心理结构. 因此, 排便是一种认知结构, 对此我们引入“排便图式”这个概念, 即排便的认知结构来反映对参与排便过程的各器官之间自动协调起积极组织和建构作用的功能结构, 他包括患者对排便的认识及机体对排便过程的协调能力这两种具体的组成部分, 既是对过去日常排便信息经验和知识的总

■背景资料

便秘是常见的胃肠道症状之一, 其病因复杂, 发病机制涉及多个系统, 治疗棘手, 临床上以泻剂或促动力等药物治疗, 易产生依赖且副作用多; 采用外科治疗远期疗效并不理想, 近来兴起的生物反馈训练, 治疗效果并不如预期的理想. 本文试图通过调节便秘患者的排便心理障碍, 提高对便秘的正确认知, 消除负性情绪, 以期进一步提高治疗效果。

■同行评议者

马欣, 主任医师, 甘肃省人民医院消化科

■研发前沿

当前对便秘的病因病机、生理病理等方面的研究虽然取得许多可喜的进展,对便秘治疗也积累了一定的经验,但在临床上仍常见到许多患者反复求医而疗效不佳,尤其是远期疗效,如何巩固和提高疗效仍是目前研究的难点。

结,同时又影响和决定着后来排便过程,并在整个排便过程发挥了自动调节的重要作用。

从信息加工角度来说,排便就是对排便信息处理的过程,与通常认知的加工模型一样,包括感觉、记忆、控制和反应过程^[2]。其中排便的认知结构指导着患者的对来自排便过程各方面的排便信息的加工、整合,当粪便由直肠进入结肠时的物理刺激,患者产生排便感觉时,并在头脑中产生了一系列对排便信息加工的过程;这些排便信息经过编码后进入记忆系统,并和记忆系统中已有的信息进行比较,通过短时记忆中对排便信息进一步精细的加工选择,扬弃那些与以往重复没有加工的信息,将得到不同的新知识与经验保存到长时记忆中而丰富排便的认知结构;在控制过程中,患者对排便加工过程进行控制,通过鉴别直肠内容物性质,实现随意延缓排便,控制粪便的能力;反应过程是对整个排便的认知加工过程的各种排便信息输入、输出结果进行综合判断,以决定是否维持肛门自制,这些过程相互作用相互影响整个排便的过程,患者正是经过长期反复对排便信息加工的经验积累而逐渐形成整体上相对稳定的排便图式。

2 图式学说与排便的认知结构

皮亚杰的图式学说认为图式(schema)就是动作的结构或活动格式,最初来源于先天遗传,以后在适应环境的过程中,一方面通过同化作用而进行的内化建构,使主体动作本身的内部协调;另一方面通过顺应作用而进行的外化建构,以协调客体之间的外部关系。图式通过内外双重建构相互协调而不断地改变和丰富和发展起来,是主体反应刺激和认识事物的前提和基础^[3],其中同化、顺应、平衡是图式发展的三个基本的过程。同化(assimilation)指主体在机能上将客体整合到自己的活动格式中,我们可将同化过程中的“客体”理解为排便各种信息,将图式这个概念理解为排便的内在知识结构,由于外界各种因素的影响,如忧愁、紧张或生活环境的变化等,人们行为就会产生适应性的变化。把从外界新获得关于排便知识和经验等新信息纳入到原有排便图式中,使原有排便图式不断巩固和扩大的即是排便的同化过程。当客观条件变化如年老体弱、内脏下垂等原因,使患者旧的排便认知结构不再能有效地适应新的变化,同化不能取得成功,人们改变自己的排便图式以适应外界的各种变化,称为顺应(accommodation)。他不同于同化只能引起

图式的量的变化,顺应是一种质的变化,表明在外部各种因素的作用下患者的内部排便认知结构得到改造、重新建构。平衡(equilibration)是指同化作用和顺应作用两种机能的协调一致,皮亚杰认为图式是不断建构起来的,建构活动就是同化和顺应之间的平衡化过程,这是通过自身的自我调节来实现的,正如皮亚杰所指出“自动调节则正是平衡化的本性”^[4]。故排便认知结构不是僵化不变的,而是在原有的排便认知结构的基础上,通过顺应作用适应外界环境的同时也在组织自身,在同化作用组织自身的同时也在适应外界。因此,对外适应和对内组织的自动调节是实现平衡化机制不可分割的两方面,从而使认知结构在同化和顺应之间的相互作用下不断发生量变和部分质变的过程中,能够保持着动态平衡的局面。

3 排便图式平衡化的异常

排便图式既非先天形成,也非客观环境单纯作用下的结果,而是机体与外界相互作用过程中反复通过对排便过程中所获得的信息进行加工而不断自动调节着同化和顺应之间的平衡中逐步形成。虽然在一定范围内人们能够对外界各种因素如忧愁、紧张或生活环境的变化等影响,产生适应性的变化,对排便图式自觉调整从而恢复平衡,但如果遭受到影响排便的因素过多或长期反复,同化和顺应之间平衡化失常超出自身承受力的限度,就会导致个人对环境变化的自动调节机制失效,从而形成排便的心理障碍。因此,从排便图式平衡化失常原因这角度来看排便的心理障碍分为同化超强于顺应与顺应强于同化两种情况。同化强于顺应时,患者不顾机体自身参与排便过程的器官结构或功能的异常或周围环境的改变,强烈要求以往正常的排便作为标准,通过服用泻药或其他手段以达到通便的目的,缺乏恰当的顺应而出现不协调;此时诊疗上应促进患者通过自我调节加强外界变化对内部排便知识结构重新建构的顺应作用,同时抑制排便图式对排便信息吸收的同化作用,也就是说,这种情况下治疗重点在于引导患者重新建构内部的排便知识结构。顺应大于同化时,患者经常忽视便意,对排便情况不关心,没有形成稳定的排便图式,同时极容易受机体的变化或周围环境的影响,这是缺少所必要的同化所造成排便心理的平衡化故障,此时患者内部的排便图式对排便信息处理加工的同化作用

■相关报道

近来研究表明便秘与结肠癌、乳腺癌疾病、早老性痴呆等疾病的发生密切相关,在这些便秘患者中65%存在心理障碍,对便秘治疗缺乏信心者占50%以上。

小于排便信息对患者内部的排便图式的顺应作用时, 这时加强患者的排便图式对排便信息的过滤、吸收的同化作用, 治疗重心在于提高患者的排便图式的稳定性。

4 “认知-协调-建构”模式

通过研究分析可见, 产生排便心理障碍的根本原因是由于同化与顺应之间自动调节的平衡机制出现障碍。一般来说异常的排便图式是患者长期异常排便积累的结果, 在进行诊治之前, 头脑已经形成了相当顽固的异常排便的认知结构, 具有相当的稳定性, 并成为支配患者排便的潜意识, 对此我们提出“认知-协调-建构”的排便心理治疗模式, 认为便秘治疗不仅仅是为了通便, 而是重新启动平衡化机制的正常运作, 通过“认知→协调→建构”以实现从旧的平衡向新的平衡转化, 因此整个排便障碍心理治疗可分为认知、协调与建构三个阶段。(1)认知阶段: 面对长期受便秘困扰的患者, 首先让患者认识到排便图式在排便过程中所发挥的重要作用, 理解到长期便秘所形成的异常排便图式与便秘相互影响相互加强是造成如今排便不顺利这种恶性循环的一个重要因素, 以调动患者识别与纠正异常的排便认知结构的积极性, 通过把排便的正常机制及便秘的病理改变等相关知识详细教授给患者, 引导患者对自己排便失衡的原因进行探讨, 以消除患者的悲观和失望情绪, 使患者对排便整个心境得到改善, 同时在解释分析患者排便认知中所存在的错误基础上根据每个患者的病情特点, 帮助患者领悟适合自己正确的排便图式。(2)协调阶段: 排便心理障碍就是旧排便图式与外部客观条件变化协调的障碍, 因此在协调阶段的重点在于分析同化和顺应哪一方面出现问题, 针对性进行治疗, 以实现同化和顺应之间新的平衡, 同时治疗中要根据患者自身的调节能力与所受到异常因素严重程度, 充分运用包括各种中西药物、生物反馈以及外科手术等各种方法与手段, 尽力调节和纠正好患者的排便障碍病理基础, 为更好促进排便的认知心理结构转化创造条件; 再者需要持之以恒、一定强度的认知治疗引发便秘患者的新旧认知心理的激烈冲突, 来动摇顽固旧的异常排便图式, 只有在纠正患者的便秘认识上的心理障碍基础, 才能更好促使正常排便规律的建构。(3)建构阶段: 便秘患者的正常排便规律不应以

正常人的排便习惯作为标准, 当前迫切需要建立正确的排便障碍患者的正常排便标准的评估体系, 包括坚持合理饮食和形成良好的生活习惯等方面, 用以指导患者正常排便规律的建构, 同时要认识到这种建构是在患者已有排便认知结构基础上通过医者与患者相互交流的能动建构过程, 因此医师既是治疗者又是教育者, 建构阶段的关键在于让患者认识新旧排便图式之间的区别与联系, 并指导患者制定实现二者转换的方法与步骤, 以达到逐步形成对排便障碍患者而言正常的排便图式。

总之, “认知-协调-建构”的模式治疗便秘与目前人们仅重视改善排便状况的治疗方法不同在于他重视通过认知提高患者对便秘的认识, 并在常规治疗便秘基础上, 强调帮助患者构建适合自己的排便图式, 以巩固、提高疗效, 尤其是远期疗效, 从而减少长期使用通便药导致的不良反应。在临床实践中我们运用“认知-协调-建构”的模式治疗便秘患者, 也取得较好疗效, 但目前例数尚少, 尚缺少大样本临床观察来探索适合便秘患者特点较完善的治疗方案, 这有待于我们下一步研究。

5 参考文献

- 1 Sonnenberg A, Tsou VT, Muller AD. The "institutional colon": a frequent colonic dysmotility in psychiatric and neurologic disease. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 62-66
- 2 Chattat R, Bazzocchi G, Balloni M, Conti E, Ercolani M, Zaccaroni S, Grilli T, Trombini G. Illness behavior, affective disturbance and intestinal transit time in idiopathic constipation. *J Psychosom Res* 1997; 42: 95-100
- 3 Nehra V, Bruce BK, Rath-Harvey DM, Pemberton JH, Camilleri M. Psychological disorders in patients with evacuation disorders and constipation in a tertiary practice. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1755-1758
- 4 Kamm MA. Challenges in functional bowel disease. *Eur J Surg Suppl* 2001; : 24-29
- 5 Dykes S, Smilgin-Humphreys S, Bass C. Chronic idiopathic constipation: a psychological enquiry. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 39-44
- 6 Christer R, Robinson L, Bird C. Constipation: causes and cures. *Nurs Times* 2003; 99: 26-27
- 7 彭聃龄, 张必隐. 认知心理学. 第1版. 杭州: 浙江教育出版社, 2004: 2
- 8 陈致宇, 陈世权. 管理系统认知结构及其知识获取. 商业研究 2006; 17: 23-26
- 9 车丽萍. 论皮亚杰认知学说与信息加工过程的内在一致性. 前沿 1995; 5: 29-36
- 10 左任侠, 李其维. 皮亚杰发生认识论文选. 第2版. 上海: 华东师范大学出版社, 1991: 142
- 11 Irvine EJ, Ferrazzi S, Pare P, Thompson WG, Rance L. Health-related quality of life in functional GI disorders: focus on constipation and resource utilization. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1986-1993

■应用要点

本文强调通过认知提高患者对便秘的认识, 纠正便秘患者的排便图式中同化与顺应之间自动调节的平衡化机制异常, 帮助患者构建适合自己的排便图式。

■同行评价

本文立意新颖, 论据充足, 内容详实, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

N-去硫酸肝素对体外培养人胃癌SGC-7901细胞bFGF表达的影响

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 耿建国

■背景资料

胃癌是我国常见的消化系统肿瘤, 胃癌的转移是造成该病的主要死亡原因, 而胃癌的转移是一个多因素、多步骤的过程, 目前对胃癌的转移缺少有效的治疗方法。

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 上海市第六人民医院消化内科 上海市 200233

耿建国, 中国科学院上海细胞生物学研究所 上海市 200031
作者贡献分布: 陈明祥与陈金联对此文所作贡献均等; 此课题由陈明祥, 陈金联, 陈维雄, 朱金水及陈尼维设计; 研究过程由陈明祥, 陆金来及洪静操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由耿建国提供; 数据分析由陈明祥完成; 本论文写作由陈明祥与陈金联完成。

通讯作者: 陈金联, 200233, 上海市第六人民医院消化内科。

wqq_021002@163.com

电话: 021-64834597

收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-03-16

***In vitro* effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma cell line SGC-7901**

Ming-Xiang Chen, Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Jian-Guo Geng

Ming-Xiang Chen, Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Jian-Guo Geng, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Correspondence to: Dr. Jin-Lian Chen, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China. wqq_021002@163.com

Received: 2008-01-24 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human gastric carcinoma SGC-7901 cells *in vitro*.

METHODS: Human gastric carcinoma cell line SGC-7901 was cultured *in vitro*, and then treated with N-desulfated heparin at different concentrations (0.1, 1.0 g/L). Meanwhile, SGC-7901 cells cultured in single RPMI 1640 medium were used as controls. Each group contained 3 parallel samples. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real time polymerase chain

reaction (PCR) were used to detect the expression of bFGF in SGC-7901 cells at 12 h and 24 h, respectively.

RESULTS: After treatment with 0.1 or 1.0 g/L N-desulfated heparin for 12 or 24 h, bFGF protein expression was decreased significantly ($t = 7.502, P = 0.002; t = 55.416, P = 0.000; t = 52.221, P = 0.000; t = 48.080, P = 0.000$). The expression of bFGF (CT value) in each N-desulfated heparin group was higher than that in the control group at the same time. The inhibition of N-desulfated heparin on bFGF protein and mRNA expression in SGC-7901 cells was dose- and time-dependent.

CONCLUSION: N-desulfated heparin can inhibit the expression of bFGF in gastric cancer cell line SGC-7901 in a dose- and time-dependent manner *in vitro*.

Key Words: N-desulfated heparin; SGC-7901 gastric carcinoma cell; Basic fibroblast growth factor; ELISA; Real time PCR

Chen MX, Chen JL, Lu JL, Hong J, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Geng JG. *In vitro* effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1920-1925

摘要

目的: 探讨N-去硫酸肝素对体外培养人胃癌SGC-7901细胞碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。

方法: 体外培养人胃癌SGC-7901细胞, 加入含不同浓度N-去硫酸肝素(0.1、1.0 g/L, N-去硫酸肝素组)的RPMI 1640培养液, 并设对照(为培养液), 每组平行3个样本。培养12、24 h, 应用双抗体夹心ABC-ELISA法及实时荧光定量PCR法检测胃癌细胞bFGF的表达。

结果: 与对照组相比, 0.1、1.0 g/L N-去硫酸肝素组培养12、24 h, bFGF的表达下降均有

■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

统计学意义($t = 7.502, P = 0.002; t = 55.416, P = 0.000; t = 52.221, P = 0.000; t = 48.080, P = 0.000$); 相同时间下各浓度的N-去硫酸肝素组中bFGF mRNA的表达(CT值)较对照组高. N-去硫酸肝素对胃癌细胞bFGF蛋白及mRNA表达的抑制作用具有剂量及时间依赖性.

结论: N-去硫酸肝素可以显著抑制体外培养人胃癌细胞bFGF的表达, 且具有时间、剂量依赖性.

关键词: N-去硫酸肝素; SGC-7901胃癌细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; ELISA; 实时荧光定量PCR

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 耿建国. N-去硫酸肝素对外培养人胃癌SGC-7901细胞表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1920-1925
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1920.asp

0 引言

胃癌是我国常见的消化道肿瘤, 胃癌的转移是造成该病的主要死亡原因, 而胃癌的转移是一个多因素、多步骤的过程, 目前对胃癌的转移缺少有效的治疗方法. 业已证实, 几乎所有实体肿瘤的生长和转移均依赖于新生血管提供大量的营养物质与生长因子^[1-2]. 实体肿瘤的生长通常分为无血管期和血管期. 即肿瘤长至直径1-2 mm时, 肿瘤分泌若干因子刺激血管形成, 获得血供的肿瘤继续增大乃至转移, 因此新生血管的形成是实体瘤生长的关键. 肿瘤血管形成受多种因子调节, 其中具有重要实际意义的是碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), 他与肿瘤血管形成高度相关^[3]. 以往的研究表明, 肝素为高度硫酸化蛋白多糖, 作为抗凝剂, 已被广泛用于临床^[4]. 然而, 由于肝素强烈的抗凝活性, 限制了他的临床应用, 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗肿瘤作用^[5-7]. 携带聚苯乙烯的非抗凝性肝素比普通肝素有更强的抑制肿瘤血管生成作用^[8]. 本实验研究用N-去硫酸肝素对外培养胃癌SGC7901细胞进行处理, 并通过ELISA和荧光定量PCR方法检测胃癌细胞bFGF的表达, 旨在为胃癌的治疗找到一个新的治疗途径.

1 材料和方法

1.1 材料 bFGF包被抗体R&D MAB293, 检测抗体PeproTech 500-P10Bt. N-去硫酸肝素由中国科学院上海细胞生物学和生物化学研究所提供. 人胃癌SGC-7901细胞株购自中国医学科学院上海细

表 1 bFGF探针序列

bFGF探针序列	
荧光探针:	5'-TGTGGCACTGAAACGAACTGGG-3'
正义链探针:	5'-GTCACGGAATACTCCAGTTGGT-3'
反义链探针:	5'-CCGTTTTGGATCCGAGTTTATACT-3'

胞所. 逆转录酶、Taq DNA聚合酶、引物和荧光标记探针由中山大学达安基因股份有限公司(广州)提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含体积分数100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养, 在37°C、体积分数50 mL/L CO₂、饱和湿度的条件下培养24 h, 然后换用不含胎牛血清的DMEM培养液同步化24 h, 然后换培养液与N-去硫酸肝素, 分别培养12 h与24 h. 每个10 mL培养基加SGC-7901胃癌细胞3×10⁶个细胞, 每组培养3瓶. 收集培养上清液-80°C保存. 胃癌培养细胞于冻存管保存(液氮).

1.2.2 标准曲线建立: 实验前20 min从冰箱中取出试剂盒, 以平衡至室温(20-25°C). 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μL, 第一孔加标准品100 μL, 混匀后用加样器吸出100 μL, 移至第二孔. 如此反复作对倍稀释至第七孔, 最后, 从第七孔中吸出100 μL弃去, 使之体积均为100 μL. 第八孔为空白对照. 待测品孔中每孔各加入待测样品100 μL. 将反应板置37°C 120 min. 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干. 每孔中加入第一抗体工作液50 μL. 将反应板充分混匀后置37°C 60 min. 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干. 每孔加酶标抗体工作液100 μL. 将反应板置37°C 60 min. 洗板同前. 每孔加入底物工作液100 μL, 置37°C暗处反应5-10 min. 每孔加入50 μL终止液混匀. 在492 nm处测吸光值.

以标准品500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.81、0 ng/L之A值在半对数纸上作图, 画出标准曲线. 将浓度作为X轴(对数轴), A值作为Y轴(线性轴). 所有A值都应减除空白值后再行计算. 曲线应为一光滑曲线. 根据样品A值在该曲线图上查出相应人bFGF含量. 所有的数据由分析软件Ascent software for Multiskan进行处理. bFGF探针序列见表1.

1.2.3 荧光定量PCR测定肿瘤细胞bFGF mRNA表达: TRIzol法抽提小鼠胃癌细胞总RNA, 加DEPC水溶解RNA, -80°C保存备用. 取出RNA

■ 研发前沿

肝素为高度硫酸化蛋白多糖, 作为抗凝剂, 已被广泛用于临床. 然而, 由于肝素强烈的抗凝活性, 限制了他的临床应用, 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗肿瘤作用.

■相关报道

有报道肝素经化学修饰后,可减少戊糖环中碳氧含量或增加含硫基团,可降低抗凝活性而增强抗炎作用,而其抗凝作用却明显降低,如经修饰后N-去硫酸肝素仅为肝素的1/76,氧去硫酸肝素抗凝活性可降低至肝素5%-30%,N-乙酰化可降低至10%以下,可明显降低出血副反应。

表 2 N-去硫酸肝素对外培养SGC-7901细胞的bFGF和bFGF mRNA表达作用 (mean ± SD, n = 3)

分组	bFGF(ng/L)		bFGF mRNA(CT值)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
对照组	17.724 ± 0.173	19.690 ± 0.111 ^a	25.956 ± 0.505	24.490 ± 0.145 ^a
0.1 g/L N-去硫酸肝素组	15.313 ± 0.394 ^c	13.301 ± 0.166 ^{bc}	30.923 ± 0.612 ^c	32.493 ± 0.358 ^c
1.0 g/L N-去硫酸肝素组	12.173 ± 0.063 ^{ce}	11.174 ± 0.286 ^{ce}	33.826 ± 0.349 ^{ce}	35.446 ± 0.299 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 12 h组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs 0.1 g/L N-去硫酸肝素组。

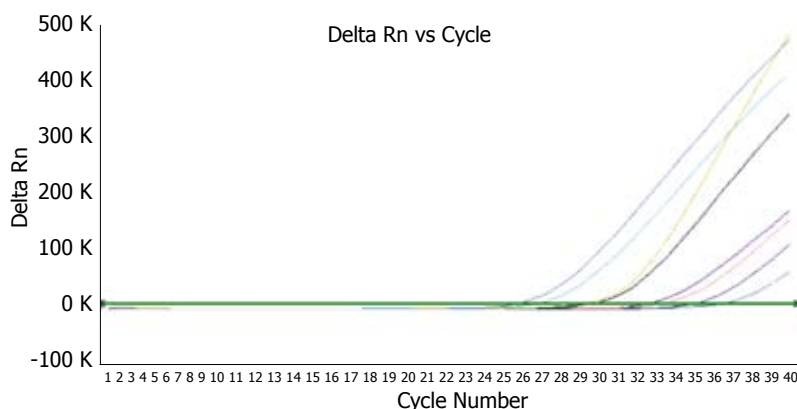


图 1 对照组及不同浓度N-去硫酸肝素(12, 24 h)胃癌细胞bFGF mRNA扩增动力学曲线图。

模板分别加至2 μ L已标记的消毒离心管中, RT-PCR试剂盒解冻, 依次加入稀释的逆转录酶0.5 μ L、dNTP 0.2 μ L, 上下游引物各0.2 μ L, DEPC水4.9 μ L, RT缓冲液2 μ L总体积10 μ L, 然后依次插入预先设置(37 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 3 min加热模块, 逆转录cDNA完成, -80 $^{\circ}$ C保存备用。

取消毒的96孔联体反应板, 分别加入cDNA模板, 取适时荧光定量PCR试剂盒解冻, 依次加入Taq酶1 μ L、dNTP 0.5 μ L、上游引物0.5 μ L、下游引物0.5 μ L, 荧光标记探针0.5 μ L, 5 \times 缓冲液10 μ L、ddH₂O 32 μ L、cDNA5 μ L, 放入全自动实时荧光定量PCR(美国ABI7300)模板中。扩增条件: 93 $^{\circ}$ C 2 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环。应用荧光定量PCR技术检测bFGF mRNA表达。CT值: 目标基因扩增的阈值循环数。

统计学处理 使用SAS6.12统计软件, 实验数据采用mean \pm SD表示, 两组间采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N-去硫酸肝素对胃癌细胞bFGF蛋白表达的影响 ELISA结果可见, 对照组SGC-7901胃癌细胞随着培养时间的延长, bFGF的表达量明显增加($t = 16.567$, $P = 0.000 < 0.05$)。不同浓度的N-去硫酸肝素对外培养SGC-7901胃癌细胞分别作用12、24 h后与对照组相比, bFGF的表达均有

明显下降($t = 7.502$, $P = 0.002 < 0.05$; $t = 55.416$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 52.221$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 48.080$, $P = 0.000 < 0.05$), 且随着N-去硫酸肝素剂量的加大、作用时间的延长, N-去硫酸肝素对bFGF的表达的抑制作用增强了($P < 0.05$), 因而具有剂量及时间依赖性(表2)。

2.2 N-去硫酸肝素对bFGF mRNA表达的影响 使用荧光定量PCR方法, 12 h对照组bFGF mRNA的表达(CT值)较24 h对照组高; 相同时间下各浓度的N-去硫酸肝素组(CT值)较对照组高; 与0.1 g/L N-去硫酸肝素组相比, 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF mRNA的表达(CT值)均明显升高($t = 4.120$, $P = 0.015 < 0.05$; $t = 6.323$, $P = 0.003 < 0.05$); 0.1 g/L、1.0 g/L的N-去硫酸肝素24 h组与12 h组相比, bFGF蛋白表达CT值均升高, 且1.0 g/L N-去硫酸肝素24 h组与12 h组相比, $t = 3.522$, $P = 0.024 < 0.05$ 。由于bFGF mRNA的实际含量与CT值成反比, 因而荧光定量PCR结果表明, N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF的表达的抑制作用呈剂量、时间依赖性(表2, 图1)。

3 讨论

肿瘤的恶性增殖和转移是一个极其复杂的过程, 当肿瘤生长至直径 ≥ 1 mm时, 进一步生长就需要新生血管生长。肿瘤血管生长对实体瘤的发生、发展起着重要的作用, 是影响肿瘤生物学

行为和转移潜能的重要因素. 一些研究表明, 低分子肝素类似物比普通肝素对血管形成具有更强的抑制作用^[9]. N-去硫酸肝素能抑制各种生长因子、细胞分裂素、细胞外基质蛋白的作用, 因此能影响肿瘤细胞增殖、迁移和肿瘤的血管生成从而抗肿瘤转移作用^[10]. 有报道肝素经化学修饰后, 可减少戊糖环中碳氧含量或增加含硫基团, 可降低抗凝活性而增强抗炎作用, 而其抗凝作用却明显降低, 如经修饰后N-去硫酸肝素仅为肝素的1/76^[11-12], 氧去硫酸肝素抗凝活性可降至肝素5%-30%^[13], N-乙酰化可降至10%以下^[14], 可明显降低出血副反应.

bFGF是FGF家族中第一个发现的成员, 他是一种碱性多肽, 由146个氨基酸组成, 基本分子量为18 kDa, pH值为9.6, 主要分布于细胞质中, 含有4个半胱氨酸残基, 通过形成分子内二硫键, 在维持bFGF的三级结构中起重要作用. bFGF的N端和C端区域分别是肝素受体的结合部位. bFGF基因位于人类5号染色体上, 为单拷贝基因, 为三个外显子两个内含子组成. bFGF在体内分布极为广泛, 脑、心、肾、肾上腺、骨和胎盘都有bFGF的存在. bFGF作为一种重要的促血管生成因子, 与肿瘤尤其是实体瘤的关系尤为密切, 具有促进源自中胚层和神经内胚层有丝分裂的活性, 有强烈的促血管内皮细胞分裂增殖和增加血管通透性的作用, 通过促进新生血管形成, 为肿瘤细胞生长提供营养. 另一方面通过自分泌或旁分泌方式促进细胞过度增殖和肿瘤生长^[15]. 最近免疫组化研究发现, 食道癌、前列腺癌、肺癌肿瘤中均发现有不同程度的bFGF量的表达^[16-18]. bFGF参与胃癌的发生、发展、浸润、转移^[19-20]. Zhao *et al*^[21]应用原位杂交技术来检测105例胃癌组织中bFGF mRNA、MMP-9 mRNA和CD34蛋白的表达, 结果发现与阴性对照组相比, 平均微血管密度、bFGF mRNA、MMP-9 mRNA表达均明显高于对照组, 且bFGF mRNA、MMP-9 mRNA与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、血管浸润、肿瘤的生长方式有关, 而与肿瘤的分型与分化无关, 因而认为bFGF可作为一个肿瘤血管形成、浸润转移、胃癌预后的一个有效指标. Noda *et al*^[22]使用原位杂交技术检测bFGF mRNA在16例早期和14例晚期胃癌中的表达以此来阐明bFGF在癌症进展中的作用, bFGF在弥散型胃癌中的表达要高于肠型胃癌的表达, bFGF mRNA阴性表达的胃癌患者生存率要明显高于bFGF mRNA阳性表达的患

者. 研究表明, bFGF在弥散型胃癌特别是晚期胃癌中的表达有着重要的意义.

本研究使用ELISA方法, 12 h的阴性对照组、12 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、12 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量分别为 17.724 ± 0.173 、 15.313 ± 0.394 、 12.173 ± 0.063 ; 24 h的阴性对照组、24 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素组、24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量分别为 19.690 ± 0.111 、 13.301 ± 0.166 、 11.174 ± 0.286 . 根据实验结果, 12、24 h阴性对照组中bFGF的蛋白含量分别为 17.724 ± 0.173 、 19.690 ± 0.111 , 随着培养时间的延长, 培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量是增加的, 两组间bFGF含量有明显差异, 符合胃癌细胞体外培养的增殖规律. 相同时间下, 各浓度的N-去硫酸肝素组与对照组相比, bFGF的含量均有下降, 且 $P < 0.05$, 表明N-去硫酸肝素对培养的胃癌细胞上清液bFGF的表达有抑制作用. 12 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素与24 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素相比, bFGF的含量分别为 15.313 ± 0.394 、 13.301 ± 0.166 , 有下降趋势, 两组数据之间有差异, $t = 8.151$, $P = 0.001 < 0.05$; 12 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素与24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的含量分别为 12.173 ± 0.063 、 11.174 ± 0.286 , 有下降趋势, 两组数据之间有差异, $t = 5.908$, $P = 0.004 < 0.05$; 因此认为, 随着作用时间的延长, 同一浓度的N-去硫酸肝素对培养胃癌细胞上清液中bFGF的表达抑制作用是增强的, 因而具有时间依赖性. 12 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养胃癌细胞上清液中bFGF的蛋白含量分别为 15.313 ± 0.394 、 12.173 ± 0.063 ; 24 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白含量分别为 13.301 ± 0.166 、 11.174 ± 0.286 ; 在相同的时间, 1.0 g/L的N-去硫酸肝素组与0.1 g/L的N-去硫酸肝素组相比, 培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量是降低的, 两组之间均有明显差异($t = 13.630$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 11.141$, $P = 0.000 < 0.05$), 因此认为N-去硫酸肝素对bFGF的表达的抑制作用具有剂量依赖性.

陈金联 *et al*^[23]在研究中发现, N-去硫酸肝素对人胃癌组织原位移植非肥胖性糖尿病(non-obesity diabetes, NOD)重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠转移模型的肿瘤转移、血管生成和血管内皮生长因子(VEGF)表达具有抑制作用. 而其在

■应用要点

N-去硫酸肝素可以显著抑制体外培养人胃癌细胞bFGF的表达, 且具有时间、剂量依赖性.

■同行评价

本文从时效与量效两个方面,应用ELISA法及实时荧光定量PCR法检测胃癌细胞bFGF的表达,能够说明N-去硫酸肝素对外培养人胃癌SGC-7901细胞表达的影响,文章短小,但能够说明问题。

此前的研究中发现, N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤组织VEGF表达和血管生成,从而抑制肿瘤的转移,并且无明显出血等不良反应,这一结果是一致的^[24]。Shi *et al*^[25]在研究中发现, bFGF主要通过PI3K途径增加缺氧状态下VEGF的释放,因而在肿瘤的血管形成中发挥着关键的作用。Yang *et al*^[26]在研究中发现, bFGF能够介导TGF-B在前列腺癌间质中的活化,从而参与肿瘤血管的形成和扩增。Li *et al*^[27]体内外的研究表明, 米非司酮通过抑制胃腺癌MKN-45细胞VEGF的表达,从而抑制细胞转移、血管形成及基底膜异质性黏附作用,最终达到有效抑制胃腺癌MKN-45细胞系的浸润及转移作用。

本研究使用荧光定量PCR方法, 12 h的阴性对照组、0.1 g/L N-去硫酸肝素组、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白表达CT值分别为 25.956 ± 0.505 、 30.923 ± 0.612 、 33.826 ± 0.349 。24 h的阴性对照组、0.1 g/L N-去硫酸肝素、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白表达CT值分别为 24.490 ± 0.145 、 32.493 ± 0.358 、 35.446 ± 0.299 。根据本实验结果,我们不难发现, 0.1、1.0 g/L组的N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞分别作用12、24 h后与对照组相比, CT值均升高($t = 6.261$, $P = 0.003 < 0.05$; $t = 20.694$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 12.827$, $P = 0.002 < 0.05$; $t = 32.919$, $P = 0.000 < 0.05$), 由于bFGF mRNA的实际含量与CT值负相关, 因此认为N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF mRNA的表达具有抑制作用。相同的作用时间, 1.0 g/L的N-去硫酸肝素组与0.1 g/L的N-去硫酸肝素相比, bFGF的蛋白表达CT值也是增高的($t = 13.631$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 11.141$, $P = 0.000 < 0.05$), 由于CT值越高, bFGF mRNA的实际含量越低, 因而1.0 g/L的N-去硫酸肝素比0.1 g/L的N-去硫酸肝素对培养胃癌细胞bFGF mRNA表达的抑制作用更强, 具有剂量依赖性。随着作用时间的延长, 1.0 g/L N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞作用24 h组与作用12 h组相比, CT值升高($t = 5.908$, $P < 0.05$), 因而胃癌bFGF mRNA表达的量减少; 0.1 g/L组的N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞作用24 h组与作用12 h组相比, 胃癌bFGF mRNA表达的量有下降趋势, CT值升高但 $P > 0.05$, 可能与作用浓度偏小有关; 因而认为N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF基因的表达的抑制作用具有时间依赖性。对照组SGC-7901胃癌细胞分别培养12、24 h后, 随着作用时间的延长,

CT值降低, 且 $t = 16.567$, $P = 0.000 < 0.05$, 因此bFGF mRNA的实际表达量是增加的, 与培养胃癌细胞的增殖有关。

细胞肺癌耐药是由于bFGF增加了抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的表达, 激发了小细胞肺癌的耐药。而这种耐药作用的产生是通过包括B-Raf, PKCepsilon, S6K-2多蛋白复合体介导产生的。研究表明, PKCepsilon的过度表达增加了XIAP和Bcl-xL水平和小细胞肺癌细胞的耐药。在一个四环素诱导的系统中, 增加的S6k-2激酶活性诱导了XIAP, Bcl-xL抗肿瘤作用的上调^[28]。目前的研究表明外源性的bFGF能够促进前列腺癌的扩增和转移。肝素类似物调控蛋白(HARP)在bFGF的激发效应中起着非常重要的媒介作用。

总之, bFGF在胃癌的血管形成和肿瘤转移中起着重要的作用, N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤组织bFGF的表达和肿瘤的血管形成, 对胃癌具有抗转移作用且无明显出血不良副反应。进一步应用ELISA及荧光定量PCR方法研究N-去硫酸肝素抗胃癌转移作用及机制, 将对胃癌实体瘤抗转移治疗提供新的途径。

4 参考文献

- 1 Shiraishi N, Sato K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Multivariate prognostic study on large gastric cancer. *J Surg Oncol* 2007; 96: 14-18
- 2 Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Nakao A. Clinical significance of isolated tumor cells and micrometastases in patients with gastric carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 817-823
- 3 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
- 4 Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* 2004; 9: 205-213
- 5 Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodavsky I, Borsig L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* 2007; 21: 3562-3572
- 6 Yu MK, Lee DY, Kim YS, Park K, Park SA, Son DH, Lee GY, Nam JH, Kim SY, Kim IS, Park RW, Byun Y. Antiangiogenic and apoptotic properties of a novel amphiphilic folate-heparin-lithocholate derivative having cellular internality for cancer therapy. *Pharm Res* 2007; 24: 705-714
- 7 Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4833-4838
- 8 Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, Maehara T. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. *Br J*

- Cancer* 2002; 86: 1803-1812
- 9 Norrby K. 2.5 kDa and 5.0 kDa heparin fragments specifically inhibit microvessel sprouting and network formation in VEGF165-mediated mammalian angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 191-198
- 10 陈金联, 陈维雄, 朱金水, 陈明祥, 陆金来, 陈尼维, 陆允敏, 陈国强, 耿建国. N-去硫酸肝素对胃癌转移的抑制作用. *中国临床药理学杂志* 2006; 15: 67-70
- 11 Bjornsson TD, Schneider DE, Hecht AR. Effects of N-deacetylation and N-desulfation of heparin on its anticoagulant activity and in vivo disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 804-808
- 12 Sache E, Maillard M, Malazzi P, Bertrand H. Partially N-desulfated heparin as a non-anticoagulant heparin: some physico-chemical and biological properties. *Thromb Res* 1989; 55: 247-258
- 13 Thourani VH, Brar SS, Kennedy TP, Thornton LR, Watts JA, Ronson RS, Zhao ZQ, Sturrock AL, Hoidal JR, Vinten-Johansen J. Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H2084-H2093
- 14 Kouretas PC, Kim YD, Cahill PA, Myers AK, To LN, Wang YN, Sitzmann JV, Hannan RL. Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation* 1999; 99: 1062-1068
- 15 Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000; 55: 800-806
- 16 Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Baguma-Nibasheka M, Porter GA, Veugelers PJ, Murphy PR, Casson AG. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7683-7691
- 17 Soultz N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF β 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 2006; 29: 305-314
- 18 Zhao J, Liu XY, Zhang QY, Jiang W. Plasma level and prognostic significance of VEGF, bFGF and MMP-9 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 676-679
- 19 Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* 2007; 254: 42-53
- 20 Zhao ZS, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Relationship between bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expression in gastric carcinoma and their clinicopathological features as well as patients survival. *Zhonghua Waike Zazhi* 2005; 43: 169-172
- 21 Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3227-3233
- 22 Noda M, Hattori T, Kimura T, Naitoh H, Kodama T, Kashima K, Pignatelli M. Expression of fibroblast growth factor 2 mRNA in early and advanced gastric cancer. *Acta Oncol* 1997; 36: 695-700
- 23 陈金联, 陈维雄, 朱金水, 洪静, 陆金来, 陈明祥, 陈尼维, 陈国强, 耿建国. 非抗凝N-去硫酸肝素对胃癌转移抑制作用的实验研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 818-821
- 24 Chen JL, Hong J, Lu JL, Chen MX, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Chen GQ, Geng JG. Effect of non-anticoagulant N-desulfated heparin on expression of vascular endothelial growth factor, angiogenesis and metastasis of orthotopic implantation of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 457-461
- 25 Shi YH, Bingle L, Gong LH, Wang YX, Corke KP, Fang WG. Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1-alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells. *Pathology* 2007; 39: 396-400
- 26 Yang F, Strand DW, Rowley DR. Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* 2008; 27: 450-459
- 27 Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1726-1729
- 28 Pardo OE, Wellbrock C, Khanzada UK, Aubert M, Arozarena I, Davidson S, Bowen F, Parker PJ, Filonenko VV, Gout IT, Sebire N, Marais R, Downward J, Seckl MJ. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. *EMBO J* 2006; 25: 3078-3088
- 29 Hatziapostolou M, Polytarchou C, Katsoris P, Courty J, Papadimitriou E. Heparin affinity regulatory peptide/pleiotrophin mediates fibroblast growth factor 2 stimulatory effects on human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 32217-32226

编辑 程剑侠 电编 何基才

NF- κ B p65反义寡核苷酸对TNBS结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子和NF- κ B表达的影响

李弼民, 吕农华, 谢勇, 陈江, 朱萱, 易静

■背景资料

炎症性肠病的病因和发病机制目前尚未完全明确, 也缺乏特异有效的治疗药物。细胞因子在炎症性肠病发生发展中的作用已经被越来越多的研究所证实; 而细胞因子是由NF- κ B所调控也得到了公认。因此NF- κ B已成为研究和开发炎症性肠病治疗新药物的靶标。而p65作为NF- κ B重要的亚基, 在调控靶基因的转录中起着关键性的作用。p65反义寡核苷酸能与mRNA互补杂交形成双股螺旋结构, 因此采用p65反义寡核苷酸能抑制p65 mRNA的成熟及翻译表达功能, 减少p65蛋白的合成, 阻断及抑制NF- κ B的产生、活化, 最终可减少细胞因子的释放, 这些无疑对溃疡性结肠炎具有重要的治疗价值。

■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

李弼民, 吕农华, 谢勇, 陈江, 朱萱, 易静, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

江西省教育厅科技项目资助, No. 2007085

作者贡献分布: 李弼民与吕农华对此文所作贡献均等; 此课题由李弼民, 吕农华, 谢勇设计; 研究过程由李弼民, 陈江, 朱萱及易静操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈江提供; 数据分析由谢勇, 朱萱及易静完成; 本论文写作由李弼民, 吕农华及谢勇完成。

通讯作者: 吕农华, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科。lbmjxmu@yahoo.com.cn

电话: 0791-8692627

收稿日期: 2007-11-19 修回日期: 2008-03-07

Effects of NF- κ B p65 antisense oligonucleotide on the expression of cytokines and NF- κ B in colonic intestinal mucosa of mice with TNBS-induced colitis

Bi-Min Li, Nong-Hua Lv, Yong Xie, Jiang Chen, Xuan Zhu, Jing Yi

Bi-Min Li, Nong-Hua Lv, Yong Xie, Jiang Chen, Xuan Zhu, Jing Yi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of Education Department of Jiangxi Province, No. 2007085

Correspondence to: Dr. Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. lbmjxmu@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-19 Revised: 2008-03-07

Abstract

AIM: To evaluate the effects of nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65 antisense oligonucleotide on the inflammation, expression of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukins (IL-1 β , IL-10) and NF- κ B in colonic intestinal mucosa of mice with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.

METHODS: Fifty BALB/c mice were randomly divided into model control group (UC), antisense oligonucleotide treatment group (ASOND), missense oligonucleotide treatment group (MSOND), and sense oligonucleotide

treatment group (SOND). Experimental colitis was induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)/ethanol enema. Twenty-four hours after modeling, the mice in the ASOND, MSOND and SOND groups were administered with the corresponding oligonucleotides. Inflammatory scores and mucosal morphological changes were evaluated under light microscope. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-10 and NF- κ B were determined by immunohistochemistry.

RESULTS: The inflammatory scores in the ASOND group decreased as compared with those in the UC, MSOND and SOND group (all $P < 0.05$). The mucosal levels of TNF- α , IL-1 β and NF- κ B expression in the ASOND group were significantly lower than those in the UC, MSOND and SOND groups (82.68 ± 14.30 vs 168.48 ± 11.89 , 166.49 ± 11.63 , 176.49 ± 12.33 , $P < 0.05$; 42.42 ± 5.77 vs 168.48 ± 11.89 , 120.43 ± 28.21 , 131.43 ± 30.601 , $P < 0.01$; 62.66 ± 11.32 vs 158.38 ± 12.49 , 161.09 ± 12.73 , 168.64 ± 11.83 , $P < 0.01$), while IL-10 levels were higher (146.68 ± 6.02 vs 62.50 ± 11.57 , 58.44 ± 10.92 , 54.24 ± 10.64 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: ASOND can attenuate the inflammatory degree in mice with experimental colitis and effectively down-regulates TNF- α , IL-1 β and NF- κ B expression while up-regulates IL-10 secretion.

Key Words: Antisense oligonucleotide; Colitis; Cytokine; Immunohistochemistry

Li BM, LV NH, Xie Y, Chen J, Zhu X, Yi J. Effects of NF- κ B p65 antisense oligonucleotides on the expression of cytokines and NF- κ B in colonic intestinal mucosa of mice with TNBS-induced colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1926-1931

摘要

目的: 探讨NF- κ B p65反义寡核苷酸对实验性结肠炎BALB/c小鼠肠黏膜NF- κ B表达的抑制作用和对黏膜肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-10、IL-1 β)表达的影响, 研究其对肠道炎症的治疗作用。

方法: 将50只BALB/c小鼠均分为模型对照组(UC组)、NF- κ B p65反义寡核苷酸组(ASODN组)、错义寡核苷酸组(MSODN组)和正义寡核苷酸组(SODN组), 采用2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠造模. 造模后24 h后对各组进行相应灌肠治疗, 灌肠后第7天处死小鼠, 行光镜下观察肠黏膜炎症并评分, 免疫组化检测各组小鼠肠黏膜中TNF- α 、IL-1 β 、IL-10和NF- κ B表达.

结果: ASODN组小鼠在结肠炎症评分较UC组、MSODN组和SODN组明显改善(均 $P<0.05$). ASODN组小鼠TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B表达较UC组、MSODN组和SODN组明显减少(82.68 ± 14.30 vs 168.48 ± 11.89 , 166.49 ± 11.63 , 176.49 ± 12.33 , $P<0.05$; 42.42 ± 5.77 vs 168.48 ± 11.89 , 120.43 ± 28.21 , 131.43 ± 30.601 , $P<0.01$; 62.66 ± 11.32 vs 158.38 ± 12.49 , 161.09 ± 12.73 , 168.64 ± 11.83 , $P<0.01$), 而IL-10表达则显著增多(146.68 ± 6.02 vs 62.50 ± 11.57 , 58.44 ± 10.92 , 54.24 ± 10.64 , $P<0.01$).

结论: NF- κ B p65反义寡核苷酸可抑制NF- κ B的活化, 降低TNF- α 、IL-1 β 表达, 升高IL-10的表达, 减轻小鼠结肠炎症, 可用于治疗实验性结肠炎.

关键词: NF- κ B p65反义寡核苷酸; 结肠炎; 细胞因子; 免疫组化

李弼民, 吕农华, 谢勇, 陈江, 朱莹, 易静. NF- κ B p65反义寡核苷酸对实验性结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子和NF- κ B表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1926-1931
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1926.asp>

0 引言

随着生活水平的提高, 炎性肠病的发病呈上升趋势. 目前认为其发生与遗传、免疫、感染、环境等因素密切相关, 其中许多细胞因子在炎性肠病的发病中起重要作用, 这些细胞因子有白介素(IL-1 β 、IL-10), 肿瘤坏死因子(TNF- α)等, 而他们的表达又与核因子NF- κ B关系密切, 其相关性也日益受到人们的重视. 我们以半抗原法建立结肠炎BALB/c小鼠模型, 评价NF- κ B p65反义寡核苷酸对2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)所致结肠炎小鼠NF- κ B的抑制作用、对黏膜细胞因子表达以及对结肠炎症的影响, 从而探讨NF- κ B p65反义寡核苷酸治疗结肠炎的疗效及可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c小鼠50只, 体质量20-23 g, 购

自南昌大学医学院实验动物中心, 由南昌大学医学院实验动物中心饲养. 称质量、编号后, 均分为模型对照组(UC组)和NF- κ B p65反义寡核苷酸组(ASODN组)、NF- κ B p65错义寡核苷酸组(MSODN组)、NF- κ B p65正义寡核苷酸组(SODN组). TNBS(购自Sigma公司)(100 g/L)溶液, 与无水乙醇配成1:1混合液. TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、NF- κ B免疫组化试剂盒由Santa Cruz工程有限公司提供. NF- κ B p65寡核苷酸参照Murano等设计的序列^[1], 由上海Generary Bioth公司合成, 其序列为: ASODN 5'-GAAACAGATCGTCCATGGT-3', MSODN 5'-ATGGAGAATATGAAAGTG-3', SOND: 5'-ACCATGGACGATCTGTTTC-3'并全部硫酸磷酸化, PAGE纯化, 纯度>99.9%.

1.2 方法

1.2.1 造模: 造模前小鼠在动物房饲养1 wk, 按照参考文献[2-4]方法采用TNBS灌肠诱导小鼠结肠炎模型. 造模第2天(24 h后), ASODN组、MSODN组、SODN组每只小鼠各自肛门灌25 nmol ASODN、MSODN、SODN, 而UC组则灌0.5 mL生理盐水, 于灌肠后第7天处死所有存活小鼠, 收集小鼠结肠及血液.

1.2.2 光镜观察及炎症评分: 在距肛门4cm处取结肠组织, 制备石蜡切片, 行HE染色, 以盲法观察, 光镜观察肠黏膜损伤情况, 参考文献[5]方法给予评分.

1.2.3 免疫组化测定细胞因子: 取距肛门4cm小鼠肠黏膜组织2块, 常规固定、切片, 染色程序严格按试剂说明书操作. 结果评定: 阳性反应物质定位于巨噬细胞、淋巴细胞或纤维母细胞胞质内, 呈黄褐色或棕色颗粒, 弥漫分布于黏膜固有层及部分上皮内. 随机选择5个视野, 取每视野内的平均阳性细胞数作为计数标准.

统计学处理 各组数据以mean \pm SD表示, 应用统计软件SPSS11.0处理, 计量资料多组间比较进行方差分析, 各组间两两比较行最小显著差异t检验(LSD-检验). 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般情况 UC组、MSODN组、SODN组BALB/c小鼠在灌肠后第1天起出现不同程度的血便、稀便、少动、毛发无光泽、身体蜷缩、食量减少、体质量下降; ASODN组小鼠在灌肠后第1天出现与上述对照组小鼠相似的情况, 在ASODN灌肠后则发生变化, 出现血便、稀便等

■ 相关报道

甘华田 *et al* 采用NF- κ B p65反义核苷酸对溃疡性结肠炎患者肠道黏膜固有层单个核细胞进行干预, 结果发现NF- κ B p65反义核苷酸可以明显减少LPS刺激引起IL-1 β mRNA和IL-8 mRNA表达增强和相应细胞因子分泌水平的提高.

■ 创新盘点

本文结果显示应用反义寡核苷酸技术研究NF- κ B基因得到抑制后,小鼠实验性结肠炎病理状况明显得到改善,对于从分子治疗探讨方面做了有益的研究,选题与研究思路较新颖。

表 1 各组小鼠炎症评分、结肠黏膜细胞因子和NF- κ B的表达 (mean \pm SD)

分组	炎症评分	TNF- α	IL-1 β	NF- κ B	IL-10
UC组	10.32 \pm 1.25 ^a	168.48 \pm 11.89 ^a	115.74 \pm 27.63 ^b	158.38 \pm 12.49 ^b	62.50 \pm 11.57 ^b
AS-ODN组	5.26 \pm 0.88	82.68 \pm 14.30	42.42 \pm 5.77	62.66 \pm 11.32	146.68 \pm 6.02
MS-ODN组	10.40 \pm 1.28 ^a	166.49 \pm 11.63 ^a	120.43 \pm 28.21 ^b	161.09 \pm 12.73 ^b	58.44 \pm 10.92 ^b
S-ODN组	11.20 \pm 1.38 ^a	176.49 \pm 12.33 ^a	131.43 \pm 30.601 ^b	168.64 \pm 11.83 ^b	54.24 \pm 10.64 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ASODN组。

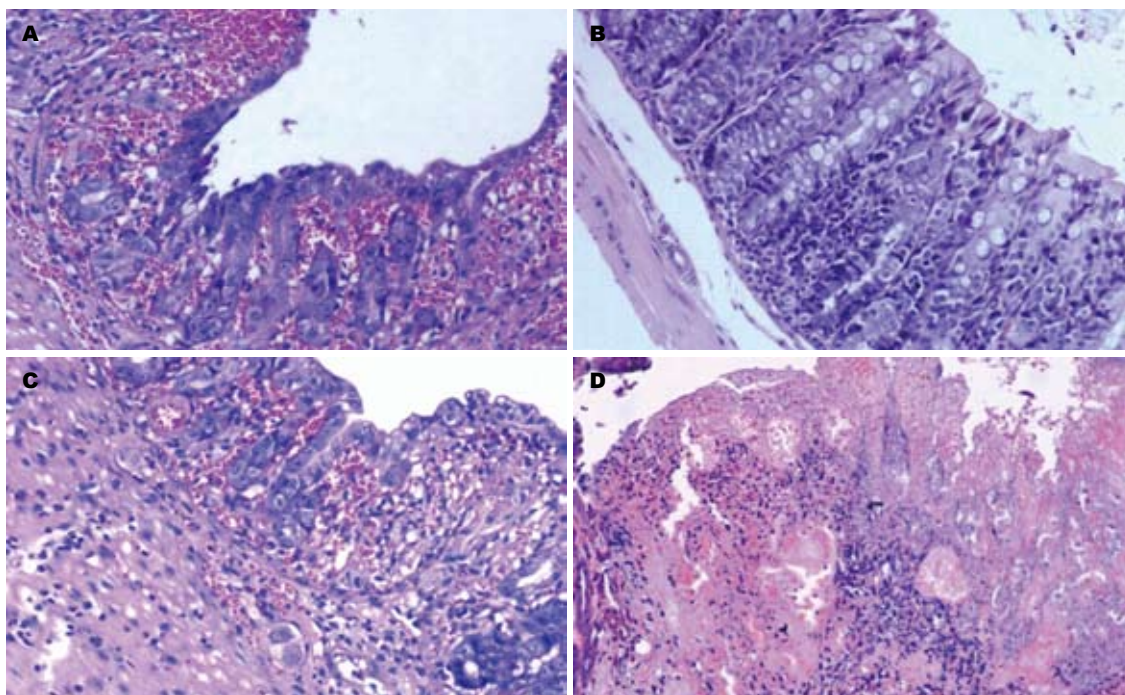


图 1 光镜下小鼠肠黏膜损伤($\times 100$). A: UC组; B: ASODN组; C: MSODN组; D: SODN组。

情况的小鼠减少,仅2只小鼠出现血便、3只小鼠出现持续3 d腹泻,活动性较UC组、MSODN组、SODN组好。

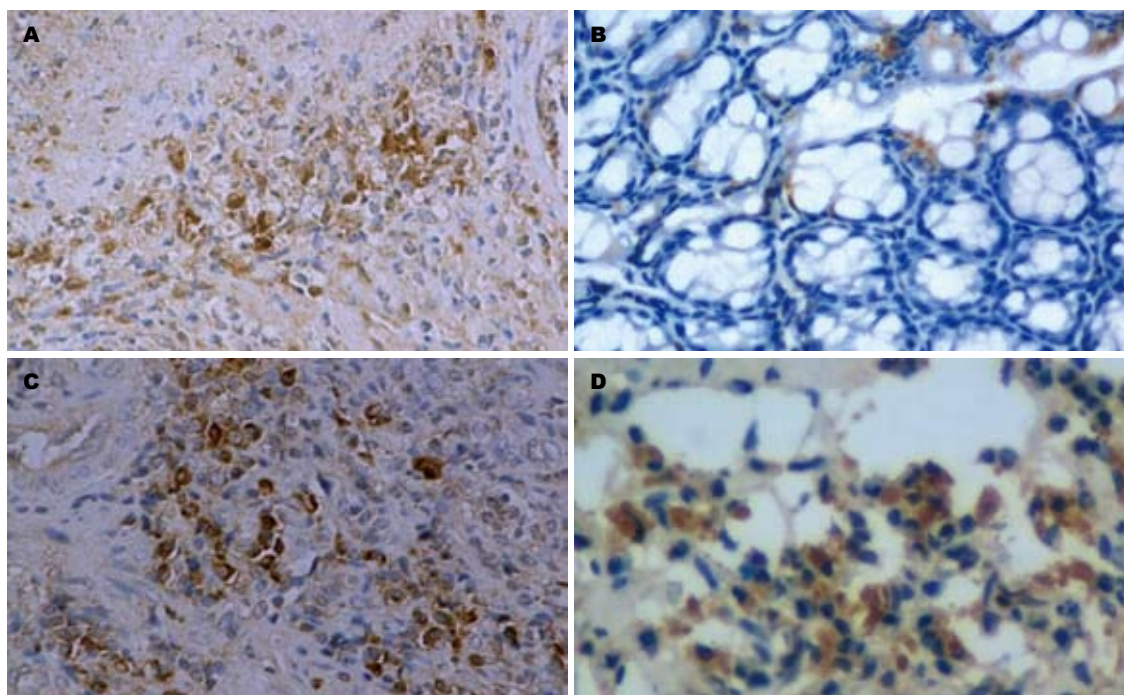
2.2 小鼠结肠大体病理及组织学改变 UC组、MSODN组、SODN组小鼠病变结肠连续性水肿,肠壁明显增厚。剪开肠壁可见黏膜有弥漫性充血、出血、糜烂,镜下可见结肠黏膜上皮糜烂、溃疡及隐窝脓肿形成,杯状细胞消失,固有层中性粒细胞、淋巴细胞浸润,最严重的见全层非局限性透壁性坏死,肠上皮细胞坏死脱落,甚至出现黏膜层、黏膜下层及肌层坏死脱落,全层大量炎症细胞浸润,隐窝变形直至破坏消失(图1A, C-D)。而ASODN组小鼠仅个别小鼠出现黏膜充血、糜烂,所有小鼠炎症细胞浸润也明显减轻,仅部分小鼠黏膜固有层内有少量炎性细胞浸润,见图1B,炎症积分较UC组、MSODN组、SODN组低(表1)。

2.3 结肠黏膜NF- κ B和细胞因子的表达 ASODN

灌肠后可降低肠黏膜NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 表达,提高IL-10的表达(表1)。表现为:(1)ASODN组NF- κ B表达低于UC组、MSODN组、SODN组(图2);(2)ASODN组TNF- α 、IL-1 β 表达也均低于UC组、MSODN组、SODN组(图3-4);(3)ASODN组IL-10表达高于UC组、MSODN组、SODN组(图5)。

3 讨论

炎性肠病的病因和发病机制目前尚不明确。大多数研究认为与免疫反应异常有关,尤其与局部肠黏膜免疫反应异常关系密切^[6-7]。研究发现:细胞因子、生长因子、黏附分子等均参与了肠黏膜局部的炎症和免疫反应。Akazawa, Brynskov *et al*证实,在溃疡性结肠炎病人的血清或结肠黏膜内IL-1, TNF- α 、IL-6, IL-8等促炎性细胞因子明显增加^[8-9],而Schottelius *et al*则直接证实了TNF- α 、IL-1 β 在溃疡性结肠炎发病中的作用^[9],



■应用要点
本研究探讨了NF- κ B p65 ASODN对三硝基苯磺钠(TNBS)结肠炎模型的治疗作用,为寻找一种新的,具有开发潜力的治疗IBD的新药提供实验论据。

图 2 小鼠肠黏膜组织NF- κ B阳性表达($\times 400$). A: UC组; B: ASODN组; C: MSODN组; D: SODN组.

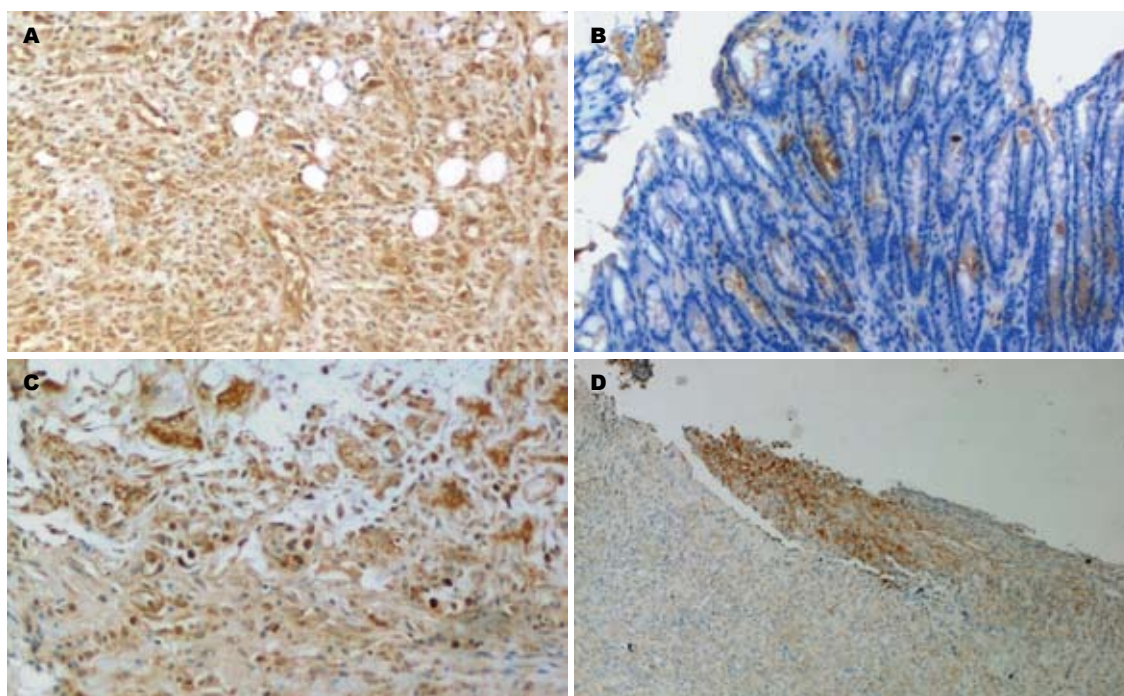


图 3 小鼠肠黏膜组织TNF- α 阳性表达($\times 100$). A: UC组; B: ASODN组; C: MSODN组; D: SODN组.

人们也使用抗TNF- α 单克隆抗体,重组IL-10来治疗炎性肠病并取得了一定的疗效^[11-12],这些研究进一步证明了细胞因子在IBD发生发展中所起的非常重要的作用.由于各种细胞因子的表达均由核因子NF- κ B来调控,因而抑制NF- κ B的活性可有效治疗IBD. IB D治疗药物如柳氮磺氨吡啶(SASP)和5-氨基水杨酸(5-ASA)、皮质类固醇等均直接或间接通过减少靶细胞中的I κ B α 来

抑制NF- κ B的活性,从而减少炎症细胞因子的产生达到治疗目的^[13-15].然而,SASP、5-ASA效果不佳及患者耐受性差则是其主要不足;激素则有很多副作用,如糖耐受能力降低,肾上腺抑制、增加感染的危险性等;因而,寻找及研制新型炎性肠病药物,尤其能直接抑制NF- κ B活性的基因药物则成为研究热点.

甘华田 *et al*采用NF- κ B p65反义核苷酸对

■同行评价
本文立意新颖,观点论述较合理,具有较好的学术价值.

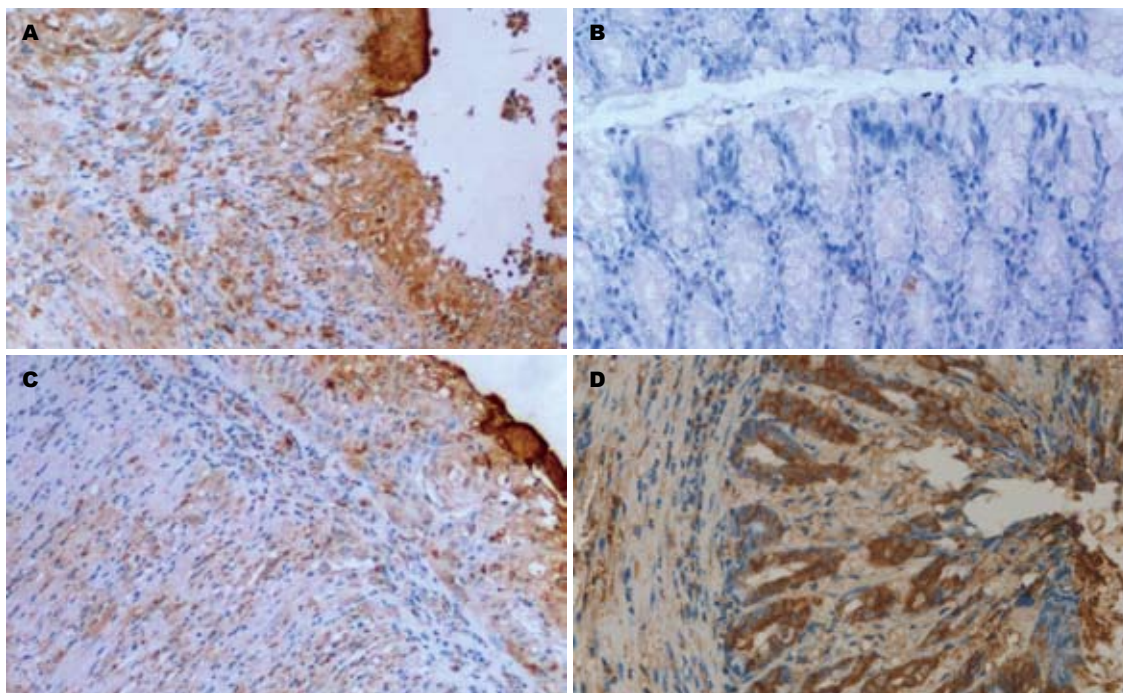


图 4 小鼠肠黏膜组织IL-1β阳性表达(×100). A: UC组; B: ASODN组; C: MSODN组; D: SODN组.

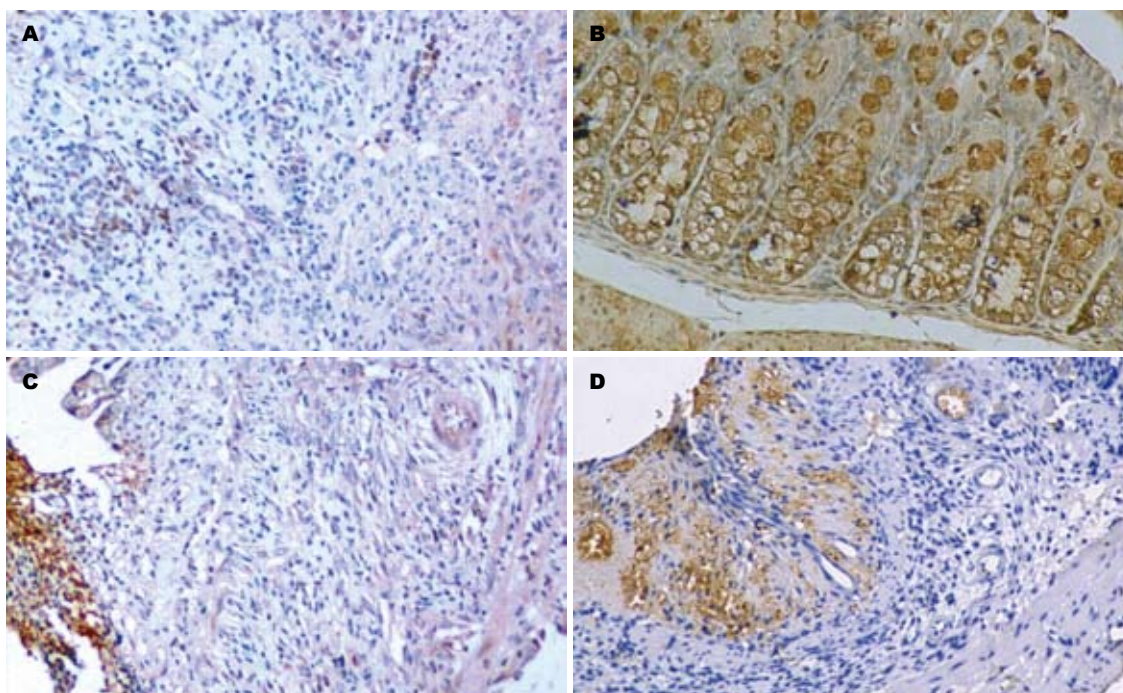


图 5 小鼠肠黏膜组织IL-10阳性表达(×100). A: UC组; B: ASODN组; C: MSODN组; D: SODN组.

溃疡性结肠炎患者肠道黏膜固有层单个核细胞进行干预, 结果发现NF-κB p65反义核苷酸可以明显减少LPS刺激引起IL-1β mRNA和IL-8 mRNA表达增强和相应细胞因子分泌水平的增高^[16]. Neurath *et al*使用NF-κB p65反义核苷酸处理TNBS诱导的小鼠结肠炎模型, 成功地抑制了肠道的炎症^[2]. 此外, Spink *et al*也分别使用NF-κB反义核苷酸使DSS诱导的小鼠结肠炎炎症明

显缓解^[17]. 上述研究表明NF-κB p65反义核苷酸抑制NF-κB活性的可行性, 且有望成为治疗炎性肠病的有效药物.

本研究成功建立了病理学特征与人类炎性肠病十分相似的TNBS BALB/c小鼠急性结肠炎模型. 小鼠经TNBS/Ethanol灌肠后出现不同程度的血便、腹泻、体质量下降等症状, 大肠组织病理学改变发现肠黏膜弥漫性充血、出

血、糜烂、溃疡形成,腺体破坏、炎性细胞浸润等。而经ASODN灌肠治疗后的小鼠,症状明显减轻,病理组织学明显改善,炎症积分较UC组、MSODN组和SODN组降低,有统计学意义,另外ASODN组小鼠结肠TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B表达低于UC组、MSODN组、SODN组,有统计学意义,表明ASODN能通过抑制NF- κ B活性,下调促炎细胞因子的表达,提高抑炎细胞因子的表达,对结肠炎症的抑制作用,与Lawrance *et al*的研究结果相似^[18-19]。

总之,本研究证实了NF- κ B p65反义寡核苷酸能抑制NF- κ B的活化,下调TNBS BALB/c小鼠结肠组织中TNF- α 、IL-1 β ,上调IL-10的表达,降低病理组织学评分,明显减轻结肠炎症。因此NF- κ B p65反义寡核苷酸可用于治疗小鼠实验性结肠炎。

4 参考文献

- Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998-1004
- Menozi A, Pozzoli C, Poli E, Lazzaretti M, Grandi D, Coruzzi G. Long-term study of TNBS-induced colitis in rats: focus on mast cells. *Inflamm Res* 2006; 55: 416-422
- te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 995-999
- McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003; 52: 975-980
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 2007; 8: 171-178
- Akazawa A, Sakaida I, Higaki S, Kubo Y, Uchida K, Okita K. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patients with disease in the inactive phase. *J Gastroenterol* 2002; 37: 345-353
- Melgar S, Yeung MM, Bas A, Forsberg G, Suhr O, Oberg A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 127-137
- Schottelius AJ, Baldwin AS Jr. A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 18-28
- Stack WA, Mann SD, Roy AJ, Heath P, Sopwith M, Freeman J, Holmes G, Long R, Forbes A, Kamm MA. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 1997; 349: 521-524
- Kam LY, Targan SR. Cytokine-based therapies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 302-307
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283-286
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-290
- Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 2000; 119: 1209-1218
- Gan H, Ouyang Q, Chen Y, Liang F. The effects of nuclear factor-kappa B p65 antisense oligonucleotides on expression of proinflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2003; 20: 268-272
- Spiik AK, Ridderstad A, Axelsson LG, Midtvedt T, Bjork L, Pettersson S. Abrogated lymphocyte infiltration and lowered CD14 in dextran sulfate induced colitis in mice treated with p65 antisense oligonucleotides. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 223-232
- Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1750-1761
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1180-1187

编辑 李军亮 电编 郭海丽

食物过敏对小鼠肠道屏障功能及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的影响

黄煌, 郑鹏远, 罗予, 张利利

■背景资料

近年来食物过敏的发病率在全球范围内大大提高, 尤以西方国家为明显。肠道是食物过敏中重要的受累脏器, 对于过敏个体肠道屏障功能的研究对预防及治疗食物过敏有重要的参考意义。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞是发挥抑制性免疫调节功能的T细胞亚群, 其功能紊乱或数目下降是导致自身免疫性及过敏性疾病的重要原因之一。

黄煌, 郑鹏远, 张利利, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

罗予, 河南省医药科学研究所 河南省郑州市 450052

国家自然科学基金资助项目, No. 30772028

作者贡献分布: 黄煌, 郑鹏远及罗予对此文贡献均等; 此课题由黄煌, 罗予及郑鹏远设计; 研究过程由黄煌, 罗予及张利利完成; 研究所用新试剂和分析工具由罗予与郑鹏远提供; 数据分析由黄煌完成; 本论文写作由黄煌及郑鹏远完成。

通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科。medp7123@yahoo.com

电话: 0371-65261035 传真: 0371-63934118

收稿日期: 2008-02-03 修回日期: 2008-04-30

Influence of food allergy on gut barrier function and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in food allergic mice

Huang Huang, Peng-Yuan Zheng, Yu Luo, Li-Li Zhang

Huang Huang, Peng-Yuan Zheng, Li-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772028

Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com

Received: 2008-02-03 Revised: 2008-04-30

Abstract

AIM: To investigate the gut barrier functional changes of ovalbumin-induced allergic mice and to determine whether there is bacteria translocation; and to observe changes of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in FA mice spleen in order to shed light on relationship between CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and food allergy.

METHODS: Twenty BALB/c mice on ovalbumin (OVA)-free diet were randomly divided into experimental group and control group. The mice in experimental group were sensitized with OVA while mice in control group were given normal saline (NS). The intestinal microbial flora was detected by culturing the feces. The

secretory immunoglobulin A (sIgA) in intestinal mucus and the diamine oxidase (DAO) in blood serum were analyzed using ELISA. The mesenteric lymph nodes (MLN), homogenated tissues of livers, lungs, kidneys, and NS used for peritoneal lavage were cultured to determine bacterial translocation. The number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺ Treg cells) in spleens was estimated using flow cytometry.

RESULTS: The number of probiotics in experimental group was significantly lower than that of the control group (*Lactobacillus*: $P = 0.006$; *Bifidobacterium*: $P = 0.016$). In contrast, the number of conditional pathogenic bacteria was significantly higher than that of control group (*Escherichia coli*: $P = 0.001$; *Bacteroides*: $P = 0.001$). Compared with the control group, sIgA (0.107 ± 0.012 vs 0.086 ± 0.008 , $P = 0.001$) in intestinal mucus, DAO (0.357 ± 0.025 vs 0.179 ± 0.035 , $P = 0.001$) in blood serum and frequency of bacteria translocation (47.8% vs 15.6% , $P = 0.001$) were significantly higher in experimental group. The number of CD4⁺CD25⁺ Treg cells was significantly lower in experimental group ($4.350\% \pm 0.619\%$ vs $6.488\% \pm 2.313\%$, $P = 0.001$).

CONCLUSION: Intestinal flora imbalance and high intestinal permeability in ovalbumin-induced allergic mice suggest gut barrier dysfunction. The phenomenon of bacteria translocation is verified in FA mice. Down-regulation of CD4⁺CD25⁺ Treg cells may play an important role in food allergy.

Key Words: Food allergy; Intestinal flora imbalance; Intestinal permeability; Bacterial translocation; CD4⁺CD25⁺ Treg cells

Huang H, Zheng PY, Luo Y, Zhang LL. Influence of food allergy on gut barrier function and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in food allergic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1932-1937

摘要

目的: 观察卵清蛋白肠道致敏BALB/c小鼠时

■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科; 李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

肠道屏障功能变化, 研究有无细菌易位现象发生; 观察其脾细胞中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量的变化以期进一步探讨食物过敏机制。

方法: 无受试蛋白喂养的BALB/c小鼠20只, 随机分为实验组和对照组. 实验组给予以卵清蛋白(OVA), 对照组给予等量生理盐水. 培养法分析粪便菌群、ELISA法测定肠黏液分泌型免疫球蛋白A(sIgA)含量及血清二胺氧化酶(DAO)含量. 对肠系膜淋巴结(MLN)、腹腔灌洗液及肝、肾、肺组织进行培养以探讨有无细菌易位的发生. 同时, 采用流式细胞术分析其脾细胞悬液中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的数量变化

结果: 与对照组相比, 实验组小鼠肠道固有菌群中益生菌乳酸杆菌、双歧杆菌的含量显著降低($P = 0.006$, $P = 0.016$), 条件致病菌大肠杆菌、类杆菌的含量显著升高($P = 0.001$, $P = 0.001$); 肠道黏液中sIgA的含量(A值)显著升高(0.107 ± 0.012 vs 0.086 ± 0.008 , $P = 0.001$); 血清DAO含量(A值)显著升高(0.357 ± 0.025 vs 0.179 ± 0.035 , $P = 0.001$); MLN及外周器官细菌易位率显著升高(47.8% vs 15.6% , $P = 0.001$); 脾细胞悬液中CD4⁺CD25⁺ T细胞数量显著降低($4.350\% \pm 0.618\%$ vs $6.488\% \pm 2.313\%$, $P = 0.001$).

结论: OVA肠道致敏小鼠肠道菌群失调, 肠通透性增高反映肠屏障功能受损, OVA肠道致敏小鼠存在肠道细菌易位现象. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞细胞的下调可能在食物过敏的发生中起重要作用。

关键词: 食物过敏; 肠道菌群; 肠通透性; 细菌易位; CD4⁺CD25⁺调节性T细胞

黄煌, 郑鹏远, 罗予, 张利利. 食物过敏对小鼠肠道屏障功能及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1932-1937
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1932.asp>

0 引言

近年来过敏性疾病的发病率在全球范围内大大提高, 15%-20%的人曾发生IgE介导的对外来抗原的高反应性, 约4%-8%的儿童和1%-2%的成年人发生过食物过敏(food allergy, FA)^[1]. FA的发生机制尚不清楚, 目前的病因研究多集中在Th1/Th2细胞失衡与卫生假说、细菌毒素及食物蛋白的共同作用、口服耐受受损等方面^[2-4]. 其中, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺ regulatory

T cells, CD4⁺CD25⁺ Treg)作为贯穿各个假说的线索倍受研究者的关注. CD4⁺CD25⁺ Treg细胞是新近被认识的一类免疫调节细胞, 主要发挥抑制性免疫调节功能, 其功能紊乱或数目下降是导致自身免疫性及过敏性疾病的重要原因之一^[5]. 在FA中, 肠道是一个主要的受累脏器, 所以对肠道屏障功能的研究可能对FA的病因研究及治疗有一定价值. 肠道屏障包括肠道正常菌群、黏液层、肠上皮细胞层和肠道免疫系统, 其主要功能在于防止肠道内细菌及毒素的易位(bacterial translocation, BT). 目前, 尚未见针对肠道屏障的各个组成来全面评价FA的肠道屏障功能以及在FA中是否存在细菌易位现象的报道. 本文选用常见的食物过敏原卵清蛋白(ovalbumin, OVA)对Balb/c小鼠进行肠道致敏, 对其肠道屏障功能做出全面的评价, 并探讨在FA的发生发展中是否存在BT现象。

1 材料和方法

1.1 材料 卵清蛋白(OVA, Sigma公司), 小鼠sIgA、IgE ELISA定量试剂盒(美国RB公司)、邻连茴香胺(O-dianisidine, Sigma公司), 辣根过氧化物酶(peroxidase-horseradish, Sigma公司), 盐酸戊二胺(cadaverine dihydrochloride, Sigma公司), 二胺氧化酶标准品(diamine oxidase, Sigma公司), FITC-抗鼠CD4、PE-抗鼠CD25(美国eBioscience公司), Balb/c小鼠购于河南省实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 无受试蛋白喂养Balb/c小鼠20只, 体质量18-22 g, 雌雄各半, 随机分为实验组和对照组. 按照文献[6]方法进行致敏, 实验组动物第1天以含OVA 10 μg和Al(OH)₃ 1 mg的无菌生理盐水0.5 mL溶液腹腔注射进行基础致敏; 第15天以含OVA 10 μg的无菌生理盐水0.5 mL ip进行强化致敏; 第20、24、28天以含OVA 0.5 mg的无菌生理盐水0.5 mL进行灌胃激发; 对照组分别以等量生理盐水进行ip及ig. 以腹泻为造模成功标志, 如果被致敏小鼠未出现明显腹泻, 可观察处死后小鼠的肠道内容物, 相对于正常鼠结肠中的球样大便, 水样粪便亦可被视为腹泻^[7].

1.2.2 大便菌群分析: 造模第30天, 取小鼠新鲜粪便, 制成10¹-10⁶稀释倍数的混悬液. 分别接种于相应的培养基上培养大肠杆菌(伊红美兰培养基)、类杆菌(Bds培养基)、乳酸杆菌(Lbs培养基)、双歧杆菌(Blb培养基). 大肠杆菌需氧培养24 h, 其余三菌置于厌氧罐中厌氧培养48 h. 根据

■ 研发前沿

FA的发生机制尚不清楚, 目前的病因研究多集中在Th1/Th2细胞失衡与卫生假说、细菌毒素及食物蛋白的共同作用、口服耐受受损等方面. 其中, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞作为贯穿各个假说的线索倍受研究者的关注。

■ 相关报道

Bjorksten *et al* 的研究表明牛奶过敏儿童较健康儿童肠道内乳酸杆菌比例低, 而需氧菌尤其是肠杆菌、链球菌比例高. 有研究者证实哮喘等过敏性疾病的动物模型中, CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的数量显著下降. 诱导口服耐受失败的小鼠牛奶过敏儿童的外周血单个核细胞中 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的数量显著降低.

表 1 FA及对照组小鼠肠道菌群比较 ($n = 10$, Log₁₀ CFU/g, mean ± SD)

	大肠杆菌	类杆菌	双歧杆菌	乳酸杆菌
实验组	7.139 ± 1.043 ^a	8.153 ± 0.787 ^a	7.049 ± 1.278 ^a	6.151 ± 1.139 ^a
对照组	5.402 ± 0.681	6.151 ± 0.819	8.441 ± 0.639	8.126 ± 0.787

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

表 2 FA及对照组小鼠各相关统计量比较 ($n = 10$, mean ± SD)

	IgE含量(A值)	血清DAO含量(A值)	sIgA含量(A值)	细菌易位率(%)
实验组	0.488 ± 0.099 ^a	0.357 ± 2.528E-02 ^a	0.107 ± 0.012 ^a	47.8 ^a
对照组	0.307 ± 0.071	0.179 ± 3.510E-02	0.086 ± 0.008	15.6

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

菌落形态、涂片分析及耐氧试验结果计算各个菌种每克粪便中菌落形成单位(CFU/g).

1.2.3 血清总IgE和DAO测定: 造模第31天, 摘眼球取血并处死小鼠. 全血37℃静止1 h后, 4℃低温离心取血清. 按试剂盒说明进行血清总IgE测定, 于酶标仪492 nm处读出A值. 取血清按照黎君有^[8]方法使用分光光度计进行血清DAO测定, 436 nm处读出吸光度A值.

1.2.4 细菌易位研究: 小鼠处死后以750 mL/L乙醇浸泡15 min, 于超净工作台内无菌取肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node, MLN)、腹腔灌洗液1 mL、肝脏、肾脏、肺脏置于增菌液中分别进行培养. 需氧24 h后或厌氧35℃增菌48 h后观察是否有细菌生长, 增菌阳性标本进行涂片观察并分别接种于伊红美兰平板及基础厌氧平板上培养, 24 h或48 h后观察并涂片鉴定. 有大肠杆菌(G-兼性厌氧菌)及类杆菌(G-专性厌氧菌)生长者记为阳性. 易位率 = 阳性器官个数/(小鼠个数 × 5).

1.2.5 小肠黏液sIgA测定: 取紧靠回盲部小肠肠段4 cm, 平铺于滤纸上纵向剖开, 刮取肠道内容物及黏液入EP管, 加入1 mL PBS充分匀浆, 10 000 g离心15 min, 取上清, 按ELISA试剂盒说明进行黏液sIgA测定, 在酶标仪492 nm处读出相应A值.

1.2.6 流式细胞仪测定脾脏单个核细胞悬液CD4⁺CD25⁺ Treg细胞: 无菌取脾, 置于缚有200目筛网的平皿上细细剪碎, 以预冷的Hank's液收集细胞, 1500 r/min 10 min离心, 弃上清. 取Tris-NH₄Cl溶液5 mL吹匀细胞, 静置5 min裂解红细胞, 1500 r/min 10 min, 弃上清. PBS液洗涤3次, 使用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培

养液重悬细胞. 调整细胞浓度至(1-2) × 10⁶/L. 将FITC-抗鼠CD4 0.2 μL、PE-抗鼠CD25 0.25 μL加入流式样管底部, 加入500 μL(细胞总数为5 × 10⁵-1 × 10⁶)细胞悬液混匀, 避光静置30 min后1 mL PBS洗涤2次, 500 μL PBS重悬细胞上机检测.

统计学处理 实验结果采用SPSS13.0统计软件包分析. 组间均数比较选用独立样本 t 检验, 易位率的比较采用四格表卡方检验. 采用 $\alpha = 0.05$ 为假设检验标准.

2 结果

2.1 粪便菌群分析 FA小鼠的粪便菌群中, 条件致病菌大肠杆菌($P = 0.001$)及类杆菌($P = 0.001$)的Log₁₀ CFU/g值明显高于对照组, 肠道益生菌双歧杆菌($P = 0.016$)及乳酸杆菌($P = 0.006$)的Log₁₀ CFU/g值则低于对照组(表1).

2.2 血清总IgE和DAO FA小鼠血清总IgE含量(A值)明显高于对照组($P = 0.001$), 本研究所造FA动物模型呈高IgE性反应, 所采用的OVA肠道致敏方法是有效的(表2). 血清DAO含量(A值)明显高于对照组($P = 0.005$). DAO是一种具有高度活性的细胞内酶, 存在于哺乳类动物的黏膜或绒毛上层, 当小肠黏膜机械屏障受损导致通透性增高时, DAO将释放入血导致外周血中DAO含量升高. 该结果提示FA小鼠小肠通透性增高(表2).

2.3 小肠黏液sIgA 小肠黏液sIgA含量(A值)明显高于对照组($P = 0.002$). 作为肠道屏障的重要组成部分, sIgA与食物抗原结合可加强集合淋巴小结对抗原的捕获, 强化肠道的免疫屏障功能. 此结果提示, 在FA中, 小鼠的sIgA反应体系呈亢进状态(表2).

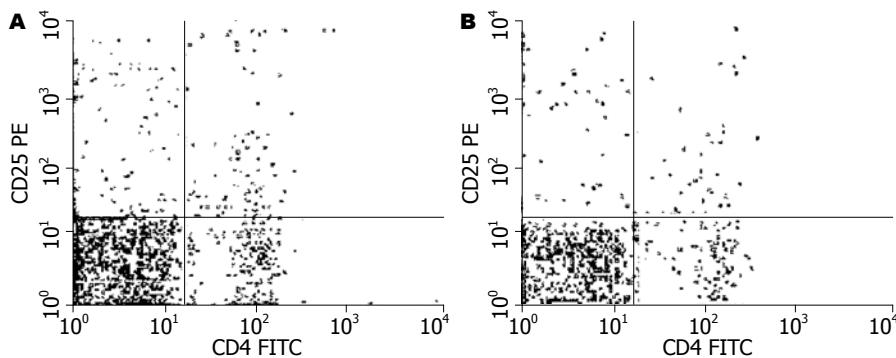


图 1 FA及对照组小鼠脾脏细胞悬液CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的表达. A: 对照组小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的表达(6.4875% ± 2.3129%); B: 实验组小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的表达(4.3500% ± 0.6182%).

创新点
肠道是接受细菌和食物抗原攻击的门户, 同时肠道也是人体最大的免疫器官. 本文选取肠道屏障的组成部分为指标逐一进行分析, 以期对食物过敏小鼠肠道屏障功能作出全面的评价, 并探讨在食物过敏小鼠中是否存在细菌易位现象.

2.4 细菌易位 MLN及肝、肺、肾、腹腔灌洗液培养显示实验组与对照组小鼠均有BT现象发生, 但实验组细菌易位率显著高于对照组($P = 0.001$, 表2).

2.5 脾脏单个核细胞悬液CD4⁺CD25⁺ Treg细胞流式细胞仪分析FA及对照组小鼠脾脏单个核细胞悬液CD4⁺CD25⁺ Treg细胞, 结果表明FA小鼠脾脏中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的数量显著低于对照组(4.3500% ± 0.6182% vs 6.4875% ± 2.3129%, $P = 0.011$, 图1).

3 讨论

FA是一种多因素、多系统参与的, 由遗传背景和环境因素共同作用发生的复杂疾病. FA的症状轻则表现为呕吐、腹泻、呼吸困难、皮疹等不适, 重则发生威胁生命的过敏性休克^[9]. 最近的流行病学调查显示食物过敏在发达国家的发生率大大高于发展中国家. 卫生假说提出过敏反应与细菌、病毒、原生动感染密切相关, 幼年时过少暴露于上述病原体会导致对Th1细胞克隆的不充分刺激, 从而不能与Th2细胞克隆扩增相平衡, 导致一种过敏易患体制^[2]. 我们的研究也表明某些微生物产物, 如葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin B, SEB)可能作为佐剂参与诱导过敏反应^[3]. 然而, 肠道过敏的病原学和发病机制都不甚清楚. 一般认为, 正常情况下肠道免疫系统不会对食物抗原和肠道固有细菌发生免疫反应, 称为口服耐受(oral tolerance)状态^[4]. 这种耐受状态与肠上皮细胞的各组成部分的完整性、树突状细胞(dendritic cell, DC)的提呈作用、CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的作用等因素密切相关^[10]. 所以, 任何对于肠道抗原与肠道免疫系统之间共生状态的干扰作用都会导致食物过敏.

本研究表明FA小鼠肠道内正常菌群已发生明显改变, 条件致病菌数量显著高于对照组小

鼠, 益生菌则低于对照组, 导致肠道屏障的第一道防线被削弱. 血清DAO的增高表明小肠上皮通透性的增高, 这也进一步提示肠道屏障遭到破坏. 研究发现, 当肠黏膜屏障被破坏, 上皮通透性增高时, 食物抗原的经上皮转运会明显加强, 也就是说肠道免疫系统对微生物产物和食物大分子抗原摄取增多, 这样会加剧机体对食物抗原的Th2极化, 发生食物过敏^[11]. 同样, 虽然与其他部位DC相比, 肠道黏膜的DC在一般情况下低表达B7等启动T细胞必要的共刺激分子, 但是当肠通透性增高, DC过多暴露于内毒素等细菌产物时会被启动, 从而启动位于MLN的抗原特异性T细胞, 诱发食物过敏^[12]. 然而本研究也显示, 在上述指标提示肠道屏障功能被削弱的同时, 作为肠道屏障保护性因素的sIgA水平却是增高的. 这就提出了一个问题: sIgA水平的增高能不能有效的提高肠道屏障功能, 抵消菌群失调和上皮通透性增高带来的消极作用, 从而预防BT的发生. 通过对FA小鼠MLN和肝、肺、肾、腹腔灌洗液的培养, 本研究证实了BT的存在. BT是指肠道内可存活的和不能存活的微生物及其产物(包括内毒素等)穿过完整的肠壁到达外周血及器官的过程^[13]. 在急性坏死性胰腺炎、肝硬化、肠梗阻、烧伤、肠外营养以及多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)或者炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)引起肠道屏障功能受损、肠通透性增高时, 可观察到BT现象^[14-16]. 本实验同时表明, 在对照组小鼠中同样有BT现象的存在, 但易位率显著低于实验组小鼠. Karlsson *et al*^[17]的研究表明正常人或某些疾病状态下, BT是一个普遍现象, 由于正常免疫系统的保护作用, 可以有效清除血液及淋巴液中的细菌及毒素, 所以并不会出现诸如自发性腹膜炎、败血症等明显的临床症状. 那么在FA发生发展的过程中, BT是加剧疾病进程导致疾

■应用要点

本研究结果显示在食物过敏小鼠中存在肠道菌群失调、肠道上皮屏障受损现象,导致肠道屏障功能削弱,发生了肠道细菌易位。这提示我们可以将益生菌与肠道黏膜保护剂联合使用以加强过敏个体的肠道屏障功能,减轻肠道损伤。

病恶化还是仅作为一种客观现象存在,还有待于进一步的证实和研究。

CD4⁺CD25⁺ Treg细胞是具有免疫抑制功能的T细胞亚群,其细胞表面表达IL-2受体 α 链(CD25)。在维持机体内环境的稳定、抗感染免疫、诱导移植耐受及自身免疫性疾病等方面发挥重要作用^[18]。此群细胞可通过细胞表面CTLA-4和膜TGF- β 作用抑制靶细胞表面IL-2 α 链表达从而抑制细胞增殖,或分泌IL-10和TGF- β 来发挥抑制作用,还可通过抑制DC对T细胞的抗原提呈作用抑制T细胞的增殖反应^[19]。CD4⁺CD25⁺ Treg细胞对于维持口服耐受有重要的作用。口服耐受被打破或诱导口服耐受失败可能导致对食物抗原的高反应性^[20]。已有研究者证实在哮喘等过敏性疾病的动物模型中,CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的数量下降^[21]。诱导口服耐受失败的牛奶过敏儿童的外周血单个核细胞中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的数量显著降低^[22]。本研究发现在OVA致敏的小鼠中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞数量显著低于对照组,也证实了CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的下降有可能打破口服耐受,诱发食物过敏。

本研究证实FA动物模型中肠道菌群紊乱及肠通透性增高现象的存在,这为我们治疗食物过敏提供了一定的线索。益生菌的重要功能之一就在于维持宿主肠道免疫系统平衡。他们能刺激Treg细胞产生TGF- β 和IL-10,促进口服耐受的形成,并且能够在FA中改善增高的肠道通透性,增强sIgA的分泌,从而有效的提高肠道屏障功能^[23]。临床研究也证实,在炎症性肠病、腹泻、酒精性肝硬化以及一些儿童的过敏性疾病^[24-28](FA、过敏性皮炎等)中应用益生菌是有效的。给予高危新生儿口服鼠李糖乳杆菌能有效的预防抗原特异性湿疹的发生^[29]。益生菌制剂还可以防止心理应激大鼠的肠道细菌易位^[30]。这为我们临床治疗FA提供了依据。针对菌群失调与肠通透性增高并存的现象,我们可以考虑尝试将益生菌及肠道黏膜保护剂联合使用,以期加强肠道屏障的保护作用,减少肠道免疫系统对大分子食物抗原的摄取、防止细菌易位,以预防食物过敏的发生、加剧并减轻食物过敏引起的腹泻等肠道症状。

4 参考文献

- 1 Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008
- 2 Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R.

- Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296: 490-494
- 3 Liu T, Wang BQ, Zheng PY, He SH, Yang PC. Rhinosinosis derived Staphylococcal enterotoxin B plays a possible role in pathogenesis of food allergy. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 24
- 4 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; 206: 232-259
- 5 张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 王雪艳, 丛旭, 魏来, 陈红松. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在慢性乙型肝炎患者免疫发病机制中作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2225-2230
- 6 Knippels LM, Penninks AH, Spanhaak S, Houben GF. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 368-375
- 7 Yang PC, Jury J, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM, Perdue MH. Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol* 2006; 168: 104-114; quiz 363
- 8 黎君友, 于燕, 郝军. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. *氨基酸和生物资源* 1996; 18: 28
- 9 Bischoff SC. Food allergies. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 34-43
- 10 Sampson HA. Food allergy--accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005; 60 Suppl 79: 19-24
- 11 McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 693-702
- 12 Yang PC, Xing Z, Berin CM, Soderholm JD, Feng BS, Wu L, Yeh C. TIM-4 expressed by mucosal dendritic cells plays a critical role in food antigen-specific Th2 differentiation and intestinal allergy. *Gastroenterology* 2007; 133: 1522-1533
- 13 Yu LC, Yang PC, Berin MC, Di Leo V, Conrad DH, McKay DM, Satoskar AR, Perdue MH. Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4. *Gastroenterology* 2001; 121: 370-381
- 14 龚非力. 医学免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2004: 152-153
- 15 Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12; quiz 13
- 16 吴奎, 孙颀, 毕玉田, 夏俊波, 王长征. 哮喘小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量及功能的改变. *中国呼吸与危重监护杂志* 2005; 4: 455-458
- 17 Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199: 1679-1688
- 18 Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 397-425
- 19 Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1493-1502
- 20 Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Ceconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
- 21 Nadler EP, Ford HR. Regulation of bacterial translocation by nitric oxide. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 165-168
- 22 O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial

translocation in humans. *Gut* 1998; 42: 29-35

23 Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-1079

24 杨明, 韩真. 益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1634-1638

25 Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008; 48: 945-951

26 Htwe K, Yee KS, Tin M, Vandenplas Y. Effect of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 214-216

27 Matricardi PM. Probiotics against allergy: data, doubts, and perspectives. *Allergy* 2002; 57: 185-187

28 Ouwehand AC. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 2007; 137: 794S-797S

29 Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-121

30 Zareie M, Johnson-Henry K, Jury J, Yang PC, Ngan BY, McKay DM, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 2006; 55: 1553-1560

■同行评价
本研究内容新颖, 设计合理, 方法先进, 数据可靠, 对预防食物过敏的发生、加剧并减轻食物过敏引起的腹泻具有重要意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成tl/2或T, Vmax不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn.var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-18)

选择性断流术治疗门静脉高压症217例

谢敏, 曹亚娟, 潘一明, 许碧云

■背景资料

传统断流术治疗PHT强调“完全彻底”阻断曲张静脉, 然而, 离断胃左静脉主干与食管旁静脉必将阻断门奇静脉间自然形成的代偿性分流, 使门静脉压力处于过高压状态, 不仅不能增加门静脉的肝脏灌注, 还可促进食管胃底区域静脉曲张再形成和曲张静脉破裂再出血。

谢敏, 曹亚娟, 潘一明, 南京大学医学院附属鼓楼医院普外科 江苏省南京市 210008

许碧云, 南京大学医学院附属鼓楼医院统计科 江苏省南京市 210008

作者贡献分布: 此课题由谢敏设计; 研究过程及资料收集由谢敏、潘一明及曹亚娟完成; 数据分析由曹亚娟及许碧云完成; 本论文写作由谢敏及曹亚娟完成。

通讯作者: 谢敏, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学附属鼓楼医院普外科. m-xie0828@medmail.com.cn

电话: 025-83105115

收稿日期: 2008-02-16 修回日期: 2008-04-18

Management of 217 portal hypertension cases using selective devascularization

Min Xie, Ya-Juan Cao, Yi-Ming Pan, Bi-Yun Xu

Min Xie, Ya-Juan Cao, Yi-Ming Pan, Department of Surgery, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Bi-Yun Xu, Department of Statistics, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Min Xie, Department of General Surgery, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. m-xie0828@medmail.com.cn
Received: 2008-02-16 Revised: 2008-04-18

Abstract

AIM: To determine efficacy of selective devascularization in management of portal hypertension through analysis of such variables as portal pressure, postoperative complications and survival rates, etc.

METHODS: A total of 217 patients with portal hypertension admitted to our hospital Jan. 1993 to Dec. 2007 were divided into three groups based on 5-year blocks: stage 1 group (1993-01/1997-12), stage 2 (1998-01/2002-12) and stage 3 group (2003-01/2007-12). The clinical data concerning preoperative and postoperative differences in free portal pressure, preservation rate of paraesophageal varices, postoperative early complications and the 5-year survival rates were retrospectively analyzed.

RESULTS: The preservation rates of para-

esophageal varices were 33.3% in group 1, 88.2% in group 2 and 93.4% in group 3 and significant differences were detected among the three groups ($P < 0.05$). Significant differences were also detected between preoperative and postoperative free portal pressure in each stage group ($F = 5.22, P < 0.01$). Differences in incidence rates of post-operative early complications were significant among stage 1 (33.3%), stage 2 (14.7%) and stage 3 (13.1%) ($P < 0.05$). 5-year survival rates increased from 74.1% in stage 1 group to 91.2% in stage 2 group, indicating a significant difference ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Selective devascularization lowers free portal pressure more effectively, reduces incidence rates of postoperative early complications and increases 5-year survival rates for patients with portal hypertension.

Key Words: Portal hypertension; Selective devascularization; Paraesophageal varices; Free portal pressure

Xie M, Cao YJ, Pan YM, Xu BY. Management of 217 portal hypertension cases using selective devascularization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1938-1941

摘要

目的: 研究选择性断流术(选择性保留食管旁静脉的断流术)对门静脉高压症临床疗效的影响。

方法: 1993-01/2007-12收治门静脉高压症患者217例, 分为3组: 第1阶段(1993-01/1997-12)组27例, 第2阶段(1998-01/2002-12)组68例和第3阶段(2003-01/2007-12)组122例, 对不同组间食管旁静脉保留率、自由门静脉压变化、临床疗效等进行回顾性对比分析。

结果: 食管旁静脉的保留率第1阶段组33.3%, 第2阶段组88.2%, 第3阶段组93.4%, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$); 与术前比较, 3个阶段组术后自由门静脉压差值有统计学意义($F = 5.22, P < 0.01$); 术后近期并发症的发生率第1阶段组33.3%, 第2阶段组14.7%, 第3阶段组

■同行评议者

傅志仁, 教授, 上海长征医院器官移植科

13.1%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 术后5年生存率从第1阶段组的74.1%, 提高到第2阶段的91.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$).

结论: 选择性断流术能够更有效降低门静脉压力、减少术后近期并发症、提高5年生存率.

关键词: 门静脉, 高血压; 断流术; 食管旁静脉; 自由门静脉压

谢敏, 曹亚娟, 潘一明, 许碧云. 选择性断流术治疗门静脉高压症217例. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1938-1941
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1938.asp>

0 引言

在我国, 断流术仍是门静脉脉高压症(portal hypertension, PHT)外科治疗的主要术式之一^[1-4]. 传统断流术只对门奇交通支进行了阻断, 并未对门静脉血流进行疏导, 术毕自由门静脉压(free portal pressure, FPP)下降不明显, 甚至升高^[5], 导致病理性分流的代偿作用丧失, 促进了门奇静脉之间新的交通支顽固地重建, 最终上消化道静脉曲张再发^[6]. 为了改善此种状况, 我们多年来对贲门周围血管离断术进行细化改进^[7], 逐步提高了对连通门静脉系统和体循环系统的食管旁静脉的保留率.

1 材料和方法

1.1 材料 1993-01/2007-12收治PHT患者217例, 男143例, 女74例, 年龄13-73(平均47.4±13.0)岁. 胃镜或钡餐检查证实存在不同程度的食管胃底静脉曲张者179例, 其中胃镜下见红色征者70例, 术前明确有消化道出血史者141例. 术后证实患有肝炎后肝硬化者187例, 酒精性肝硬化者9例, 血吸虫性肝硬化者7例, 其他14例. 217例患者中共有198例进行了随访, 随访率达91.3%, 随访年限1-12年. 术前按Child-Turcotte-Pugh(CTP)评分标准对患者肝功能进行评估, 常规行腹部B超和CT或MRI检查, 了解肝硬化程度、脾脏大小、腹水、门静脉和脾静脉主干的直径及血流方向、食管胃底周围曲张静脉等情况, 并排除肝脏占位. CTP分级C级及部分B级病例经吲哚氰绿(indocyanine green, ICG)清除试验评估肝脏储备功能. CTP分级C级或肝脏储备功能明显不足的患者, 不同意或无条件行肝脏移植, 但有断流手术指征-控制出血、预防再出血时, 术前给予充分的内科处理. 所有患者均由同一组专科医师择期手术.

1.2 方法 依据手术时间不同, 每5年为一个阶段组进行分析, 即第1阶段: 1993-01/1997-12, 第2阶段: 1998-01/2002-12以及第3阶段: 2003-01/2007-12. 各阶段组患者的平均年龄、男女比例、术前CTP分级、发生大出血的例数以及胃镜或钡餐显示食管胃底静脉中-重度曲张的例数均无显著差异($P > 0.05$, 表1), 具有可比性. 根据食管胃底区的解剖特点, 参照传统Sugiura手术和贲门周围血管离断术, 选择性保留门奇静脉间自然形成的、代偿性扩张的交通支静脉: 食管旁静脉和胃冠状静脉主干, 仅阻断其汇入食管下段和上半胃的穿通支静脉, 对肠系膜上静脉和脾静脉在腹膜后形成的静脉瘤、脐静脉和腹壁静脉等门体交通支也尽可能保留. 常规于手术前后经网膜静脉测定FPP, 并行肝活检. 若患者无上腹部手术史、未行硬化剂治疗或食管下段组织水肿黏连不重, 用一次性吻合器行食管下端横断及吻合, 以阻断胃肠区高压的门静脉血流自胃及食管壁内流向好发破裂出血的食管下段静脉.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包对数据进行处理. 正态分布计量资料以mean±SD表示. 两组间比较计量资料采用t检验或Wilcoxon检验, 多组间比较计量资料采用方差分析. 计数资料采用 χ^2 检验, 等级资料采用Wilcoxon检验. 取检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 食管旁静脉保留率 第1阶段虽然认识到门奇交通支的代偿性分流作用, 但是因为技术上难以确保食管旁静脉和胃冠状静脉主干的选择性保留, 同时因为主观上顾忌传统断流术的权威性, 为力求上半胃及下段食管穿通支离断的彻底性, 致使食管旁静脉的保留率较低, 仅33.3%; 第2, 3阶段随着食管旁静脉选择性保留技术的不断完善, 不仅能彻底离断下段食管和上半胃的穿通支, 又能选择性保留门奇交通支, 使食管旁静脉保留率从88.2%提高到了93.4%; 3个阶段组食管旁静脉保留率的差异有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 手术前后FPP的变化 3个阶段组术后FPP均较术前有所下降; 第1阶段组术后FPP与术前FPP的差异显著($P < 0.05$); 第2, 3阶段组术后FPP比术前下降更显著($P < 0.01$); 对3个阶段组术后FPP差值进行方差分析, 结果表明3个阶段组术后FPP差值的差异有统计学意义($F = 5.22, P < 0.01$); 两两比较发现, 与第1阶段组比较, 第2, 3阶段组术

■ 相关报道

本文作者于2006, 2007年分别在《中华普通外科》, 《中华外科》发表相关文章, 前者以选择性断流术与非选择性断流术进行对比研究其疗效, 后者总结了影响选择性断流术的重要指标, 为临床诊疗提供了参考.

■应用要点

科学进行围手术期管理,对患者进行全面、细致的评估,不过度治疗,细化手术操作,保留机体的代偿机制,大力向基层推广。

表 1 不同阶段组PHT患者一般资料比较 $n(\%)$

	第1阶段 ($n = 27$)	第2阶段 ($n = 68$)	第3阶段 ($n = 122$)	P
平均年龄(岁)	47.5 ± 12.5	46.3 ± 11.6	47.9 ± 13.9	0.448
男/女	18/9	47/21	78/44	0.767
大出血者	17(63.0)	39(57.4)	85(69.7)	0.227
静脉曲张	23(85.2)	57(83.6)	99(81.1)	0.830
CTP分级				0.052
A级	12(44.4)	42(61.8)	85(69.7)	
B级	13(48.1)	25(36.8)	30(38.2)	
C级	2(7.4)	1(1.5)	7(5.6)	

后FPP的差值较大,下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$, 表2)。

2.3 不同阶段组的预后 术后发生腹腔内出血当天再手术者3例,术后3 mo内消化道再出血者3例,腹腔感染伴肝昏迷4例,胸腔积液5例,膈下积液8例,顽固性腹水6例,肝肾功能衰竭5例,胃底瘘1例,术后近期并发症总发生率16.1%(35/217)。术后近期并发症的发生率从第1阶段组的33.3%降低到第2, 3阶段组的14.7%和13.1%,其差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3)。对第1, 2阶段组术后5年生存率进行分析,因复发大出血而死亡者4例,因器官功能衰竭而死亡者9例,5年生存率从第1阶段的74.1%提高到第2阶段的91.2%,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

肝硬化门静脉高压症上消化道出血的患者,尤其是肝功能代偿较好者,仍然主要依赖外科断流术控制出血和预防复发出血^[4,8-15]。传统断流术强调“完全彻底”地阻断曲张静脉的血流来源(尤其是胃左静脉及其与奇静脉交通的食管旁静脉),认为该操作不仅可以防治食管胃底静脉曲张破裂大出血,还可保持较高的门静脉压力,维持门静脉血的肝脏灌注,避免肝功能的进一步恶化,是断流术有别于分流术的主要优势。然而,离断胃左静脉主干与食管旁静脉必将阻断门奇静脉间自然形成的代偿性分流,使门静脉处于过高压状态,而过高的门静脉压力不仅不能增加门静脉的肝脏灌注,还可促进食管胃底区域形成新的侧支血管,导致静脉曲张再形成和曲张静脉破裂再出血^[6,16]。我们从20世纪90年代中后期开始注意保留胃左静脉主干和食管旁静脉的完整性,仅离断胃左静脉进入胃壁和食管旁

表 2 不同阶段PHT患者手术前后FPP的变化 (cmH₂O, mean ± SD)

阶段	术前FPP	术后FPP	FPP差值
1	40.9 ± 4.25	37.9 ± 5.15 ^a	-3.0 ± 5.70
2	46.3 ± 8.24	37.1 ± 5.74 ^b	-9.2 ± 7.52 ^d
3	44.7 ± 8.20	36.3 ± 5.54 ^b	-8.4 ± 7.05 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 术前; ^c $P < 0.01$ vs 第1阶段。

表 3 不同阶段PHT患者术后近期并发症发生率及5年生存率的比较 %(n/n)

阶段	近期并发症总发生率	5年生存率
1	33.3(9/27)	74.1(20/27)
2	14.7(10/68) ^a	91.2(62/68) ^a
3	13.1(16/122) ^a	

^a $P < 0.05$ vs 第1阶段。

静脉进入食管壁的壁内穿支静脉,目的是保证部分门静脉血经胃冠状静脉→食管旁静脉→半奇静脉向体循环系统分流。这样既能阻断下段食管和上半胃的壁内反常血流防治消化道出血,又可维持门奇静脉间自然的代偿性分流而适当降低门静脉压力^[17],从而减少静脉曲张再发的风险。另外,门奇静脉间的自然分流是机体在病理过程中逐步形成的一种代偿机制,其分流量是适合患者病理生理发展状态的,既能维持必需的门静脉入肝血流,又适当降低了门静脉的压力,从而达到动态平衡,这不同于人为的脾-肾静脉分流术或门-腔静脉分流术^[18-21],故应予保留。

早年,由于受到传统理念及技术的限制,门体交通支尤其是食管旁静脉的保留率较低。目前,我们基本上能够完整保留各种形式的门体交通支,随着食管旁静脉保留率的提高,术后近期疗效十分满意^[22],远期疗效也明显提高。本组资料通过比较3个阶段手术前后FPP的变化显示,食管旁静脉的保留率提高后FPP降幅更为明显($P < 0.01$),这是机体自身代偿性分流效果的具体体现,同时术后近期少有医源性分流术后多见的肝性脑病等并发症发生,第2, 3阶段组术后近期并发症的总发生率明显低于早期($P < 0.05$),而且第2阶段患者5年生存率较第1阶段显著提高($P < 0.05$)。这些临床观察均显示了食管旁静脉自然代偿性分流的优越性。

总之,保留病理性扩张的食管旁静脉,利用病程中自然形成的代偿性分流途径缓解门静脉

系统的过高压状态,可以有效而合理地降低FPP,从而确切控制曲张静脉破裂出血,减少术后再出血及器官功能衰竭等近期并发症的发生,提高5年生存率。该术式疗效确切,是门静脉高压症患者的最佳疗法之一。

4 参考文献

- Sharma A, Vijayaraghavan P, Lal R, Behari A, Kumar A, Sikora SS, Saxena R, Kapoor VK. Salvage surgery in variceal bleeding due to portal hypertension. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 14-17
- Lu SC, Meng FK, Ding HG, Zhang JG, Ding L, Wang SZ. Effects of two different dosages of octreotide on portal pressure and hepatic hemodynamics in cirrhotic portal hypertensive patients after portal-azygous devascularization and splenectomy. *Zhonghua Neike Zazhi* 2007; 46: 290-293
- Hong DF, Zheng XY, Peng SY, Gao M, Wu JG, Cao Q. Laparoscopic splenectomy and pericardial devascularization for treatment of portal hypertension due to liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 820-822
- Xu XB, Cai JX, Leng XS, Dong JH, Zhu JY, He ZP, Wang FS, Peng JR, Han BL, Du RY. Clinical analysis of surgical treatment of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4552-4559
- 蔡景修. 门静脉高压症外科治疗的探讨. *消化外科* 2004; 3: 229-231
- 花荣, 吴志勇, 孙勇伟, 邱江锋, 罗蒙, 徐庆, 徐琳. 断流术中门静脉压力变化及术后再出血的临床研究. *中华普通外科杂志* 2007; 22: 194-196
- 谢敏, 黄晶, 潘一明, 许碧云. 断流术中保留门体交通支的临床意义. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 689-691
- 冷希圣. 肝移植时代如何看待门静脉高压症的断流手术. *中国现代普通外科进展* 2007; 10: 1-4
- Goyal N, Singhal D, Gupta S, Soin AS, Nundy S. Transabdominal gastroesophageal devascularization without transection for bleeding varices: results and indicators of prognosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 47-50
- 李建生, 刘文斌. 肝炎肝硬化门脉高压症的治疗现状. *实用肝脏病杂志* 2006 9: 375-377
- 梅斌, 陈孝平, 刘飞龙. 肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2452-2455
- Yamamoto J, Nagai M, Smith B, Tamaki S, Kubota T, Sasaki K, Ohmori T, Maeda K. Hand-assisted laparoscopic splenectomy and devascularization of the upper stomach in the management of gastric varices. *World J Surg* 2006; 30: 1520-1525
- Qazi SA, Khalid K, Hameed AM, Al-Wahabi K, Galul R, Al-Salamah SM. Transabdominal gastroesophageal devascularization and esophageal transection for bleeding esophageal varices after failed injection sclerotherapy: long-term follow-up report. *World J Surg* 2006; 30: 1329-1337
- Liu B, Lin N, Deng MH, Xu RY, Liu XY, Huang FZ, Li RZ. Effects of different treatment complex on esophageal vascular structures in patients with portal hypertension. *Zhonghua Waike Zazhi* 2006; 44: 450-453
- Wolff M, Hirner A. Surgical treatment of portal hypertension. *Zentralbl Chir* 2005; 130: 238-245
- Yoshida H, Mamada Y, Taniai N, Tajiri T. New methods for the management of gastric varices. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5926-5931
- 吴志勇, 罗蒙. 重视门静脉高压症术式的选择. *消化外科* 2006; 5: 156-158
- 杨镇. 选择性贲门周围血管离断术. *临床外科杂志* 2004; 12: 393-394
- de Cleve R, Herman P, D'albuquerque LA, Pugliese V, Santarem OL, Saad WA. Pre- and postoperative systemic hemodynamic evaluation in patients subjected to esophagogastric devascularization plus splenectomy and distal splenorenal shunt: a comparative study in schistosomal portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5471-5475
- Orozco H, Tielve M, Ramos G, Mercado MA. Hemodynamic study of the patient with hemorrhagic portal hypertension: importance of the left renal vein in patients with a distal splenorenal shunt (Warren). *Rev Gastroenterol Mex* 2006; 71: 257-261
- 杨镇. 选择性贲门周围血管离断术的解剖基础和操作要点. *外科理论与实践* 2006; 03: 188-189
- 曹亚娟, 谢敏, 包善华, 潘一明, 许碧云. 选择性断流术治疗门静脉高压症影响因素的回归分析. *中华外科杂志* 2008; 46: 18-20

■名词解释

选择性断流术: 断流术中离断胃左静脉进入胃壁和食管旁静脉进入食管壁的壁内穿支静脉, 保留胃左静脉主干和食管旁静脉的完整性, 起到保证部分门静脉血经胃冠状静脉→食管旁静脉→半奇静脉向体循环系统分流的作用。

■同行评价

本文内容新颖, 信息量充足, 符合伦理学要求, 结论科学, 讨论有系统的理论分析, 参考文献较新, 具有较好的学术价值。

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 2008-06-18)

评分法对门静脉高压症上消化道出血手术方式选择的指导

陈立波, 杨炼, 王国斌

■背景资料

门静脉高压并发上消化道出血的外科治疗有多种手术方式, 各有其优缺点. 而对于具体该选择何种手术方式还缺乏公认的依据. 因而建立一种简易公认的标准来指导手术方式选择将有助于提高对该病的治疗效果.

陈立波, 杨炼, 王国斌, 华中科技大学协和医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430022

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目

作者贡献分布: 此课题由陈立波、杨炼和王国斌共同设计, 论文写作由陈立波和杨炼完成, 陈立波负责病源提供, 病例分析和数据分析由陈立波和王国斌完成.

通讯作者: 杨炼, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学协和医院. libo_chen@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2008-01-22 修回日期: 2008-04-07

Operational options based on scoring system to treat upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension

Li-Bo Chen, Lian Yang, Guo-Bin Wang

Li-Bo Chen, Lian Yang, Guo-Bin Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the New Century Excellent Talent Program of Education Ministry of China

Correspondence to: Dr. Lian Yang, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com

Received: 2008-01-22 Revised: 2008-04-07

Abstract

AIM: To guide operation in treating upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension through building a scoring system.

METHODS: One hundred and seventy-eight patients with portal hypertension were admitted to our hospital from June 2004 to October 2007. The patients were scored according to the etiology, age, liver function, clinical characteristics, and operation history, and corresponding operations were selected based on the scores for the treatment of upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension.

RESULTS: Based on the scores, pericardial de-vascularisation was performed in 89 cases; lower esophageal transection plus reanastomosis was performed in 22 patients; trans-chest esophageal transection plus reanastomosis was performed in 2 patients; proximal splenorenal shunt was per-

formed in 39 cases; restricted SMV-cava shunt was performed in 21 cases; lateral-lateral portal-cava shunt was performed in 5 cases. Peri-operational complications included reversed ascites (41 cases), plural effusion (8 cases), esophageal leakage (1 case), and esophageal stricture (1 case). Ninety-nine cases were followed up, and 16 were found with occasional black stool. Re-hematemesis occurred in 1 case and he died finally. Reversible hepatic encephalopathy occurred in 2 cases, and incisional hernia occurred in 1 case.

CONCLUSION: Operational selection based on scoring system can improve the operation effect and decrease complications in treating upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension.

Key Words: Portal hypertension; Upper gastrointestinal bleeding; Operation; Scoring system

Chen LB, Yang L, Wang GB. Operational options based on scoring system to treat upper gastrointestinal bleeding due to portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1942-1945

摘要

目的: 建立评分系统指导门静脉高压并发上消化道出血的手术方式的选择.

方法: 2004-06/2007-10本组收治门静脉高压症患者178例, 将患者病因、年龄、肝功能状态、临床特征、手术史等进行评分, 根据评分值选择适宜手术方式治疗门静脉高压并发上消化道出血, 术后随访患者.

结果: 根据评分, 行贲门周围血管离断术89例, 加食管下段横断吻合术22例, 经胸食管横断吻合2例, 近端脾肾分流术39例, 肠腔限制分流术21例, 门腔侧侧分流术5例. 围手术期可逆性腹水41例, 中量胸水8例, 食管吻合口漏1例, 食管吻合口狭窄1例. 术后随访99例, 偶发黑便16例, 再发呕血并死亡1例, 1级肝性脑病2例. 切口疝1例.

结论: 针对门静脉高压并发上消化道出血的

■同行评议者

于则利, 教授, 首都医科大学附属北京同仁医院外科

不同病理生理特征建立评分系统, 根据评分选择合适的手术方式可改善该疾病的治疗效果.

关键词: 门静脉高压症; 上消化道出血; 手术; 评分系统

陈立波, 杨炼, 王国斌. 评分法对门静脉高压症上消化道出血手术方式选择的指导. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1942-1945

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1942.asp>

0 引言

外科手术是门静脉高压并发上消化道出血的主要治疗手段, 手术方式主要分为门奇断流和门腔分流两大类, 对于如何选择合适的手术方式尚缺乏简易的评价手段. 我们近来针对门静脉高压并发上消化道出血患者的临床特征建立简单的评分系统, 根据患者评分值选择相应的手术方式, 取得较好的近期效果, 现总结报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-06/2007-10, 本组收治门静脉高压症患者178例, 男性124例, 女性54例, 平均年龄 41.2 ± 11.3 岁, 其中肝炎后肝硬化92例, 血吸虫性肝硬化43例, 自身免疫性肝炎23例, 肝前性门静脉高压20例. Child-Pugh改良分级A级107例, B级71例. 上消化道出血138例, 胃镜提示食管静脉曲张、近期出血风险43例. 其中脾切除或脾切除+贲门周围血管离断术后再出血67例; 1例患者因门静脉海绵样变分别行5次手术后再出血. 平诊手术171例, 急诊手术7例.

1.2 方法

1.2.1 手术适应症与术式选择: 根据患者肝硬化病因、肝功能状态、门静脉高压特征、有无手术史等制定评分标准, 根据评分进行手术方式选择. 各项累计分数 ≤ 8 分选择分流手术; > 8 分, 选择门奇断流术; > 14 分, 肝移植或TIPS、内镜、内科保守治疗(表1). (1)肝炎后肝硬化, 肝炎病毒复制活跃或慢性活动性肝病, 或肝功能B级, 评分9-14分, 行选择性贲门周围血管离断+脾切除术(I a); 如术前胃镜示食管中、下段重度静脉曲张, 或术中发现食管壁曲张静脉丰富者, 加行食管下段吻合器切断吻合(I b). (2)肝前性门静脉高压者, 或血吸虫肝硬化、自身免疫性肝炎、肝炎后肝硬化肝功能A级, 年龄较轻, 以腹水、上消化道出血为主要特征, 或出血主要由门静脉高压性胃病引起者, 评分 < 8 分, 行门腔分流手术: 无手术史, 伴脾功能亢进者, 行脾切除+

脾肾分流+贲门周围血管离断(II a); 既往行脾切除+贲门周围血管离断术再发出血者, 行肠腔分流(II b)或H型肠腔人造血管搭桥分流(II c). 如肠系膜血管条件不佳, 行门腔侧侧限制性分流(II d). 既往行脾肾分流再出血者可选择断流术; 如该类患者在第一次手术时附加断流术, 则行肠腔或门腔限制或架桥分流术. (3)断流术后再出血, 肝功能B级, 或门静脉、肠系膜上静脉条件不佳者, 或分流术后再出血, 行经胸食管下段吻合器横断吻合术(III)或内镜、TIPS、药物治疗. (4)肝功能失代偿严重者, 评分 > 14 分者条件允许时行肝移植, 条件不允许时行TIPS、药物或内镜治疗.

2 结果

2.1 手术方式 行脾切除+贲门周围血管离断术(I a)89例, 附加食管横断吻合(I b)22例; 脾切除+近端脾肾分流+贲门周围血管离断(II a)39例; 肠腔分流(II b)或H型肠腔人造血管搭桥分流(II c)21例, 门腔侧侧限制性分流(II d)5例; 食管下段横断吻合术(III)2例. 分流术后常规口服阿司匹林预防吻合口栓塞.

2.2 围手术期并发症 无围手术期死亡病例, 可逆性腹水41例, 合并中量胸水8例, 食管吻合口漏1例, 食管吻合口狭窄1例. 均经保守治疗后治愈. 分流手术者I级肝性脑病4例, 饮食调整后缓解.

2.3 术后随访 术后随访99例, 随访时间6-40 mo. 偶发黑便16例, 随访期间1例患者断流术后半年因肝功能衰竭再次出血死亡. 无再发大量呕血、便血. 其中胃镜随访56例, 与术前相比曲张静脉基本消失. 分流术后彩超近期随访39例, 吻合口或搭桥血管均通畅; 可逆性I级肝性脑病2例, 经饮食调整后改善. 1例急诊断流患者术后并发切口疝.

3 讨论

门静脉高压仍然是严重影响我国人民健康的常见疾病. 尤其是近年来HBV、HCV感染流行, 血吸虫疫情反弹, 以及自身免疫性肝炎发病率上升等, 门静脉高压症发病率仍居高不下. 其中上消化道出血是门静脉高压症的最常见外科性并发症. 肝移植是门静脉高压的最彻底治疗手段, 但我国以HBV、HCV为主的病因, 经济局限、供体缺乏, 患者的接受程度低等都制约了肝移植的广泛开展. 包括药物、内镜等内科手段、介入治疗等对门静脉高压上消化道出血取得一

■创新盘点

将影响门静脉高压治疗结果的因素进行评分, 并以此选择相应的手术治疗方式, 有助于对该病的治疗方法进行统一规范, 并提高该病的治疗效果.

■应用要点

通过评分法选择不同的手术方式治疗门静脉高压上消化道出血,将规范该疾病的治疗,有助于科学评价不同手术方式的优缺点。

表 1 门静脉高压手术方式选择评分表

分数	1	2	3
病因	血吸虫肝硬化 自身免疫性肝硬化 肝前性门静脉高压	肝炎后 肝硬化	慢性活 动性肝病
年龄	<50岁	>50岁	
手术史	无手术史、断流 多次手术	分流	
TB($\mu\text{mol/L}$)	<17	<51	>51
PT(S)	<3	<6	>6
PreAlb(mg/L)	>80	<80	
症状	食管胃底静脉破 裂出血、腹水 门静脉高压性胃病	黄疸 凝血障碍	肝性脑病

定效果^[1-2],但仍然难以取代外科手术。

目前门静脉高压并发上消化道出血常用的为门奇断流和门腔分流两类术式。由于知识水平、地域、学派、个人偏好等的影响,在不同地域往往以一种手术方式为主流。但断流与分流手术各有优缺点。断流术具有技术简单、患者肝功能影响小、近期效果可靠等优势^[3-5],但断流术没有解决门静脉高压这一主要病理基础,术后再出血率和门静脉高压性胃病发生率仍居高不下。如果断流术后门静脉压力仍高于35 cm H₂O,术后再出血率明显增加^[6]。分流术可以有效降低门静脉高压,但对患者肝功能要求高,术后可能加重肝损害。断流、分流具有多种术式,每种方式原理和操作方式各异。而不同患者病因不同,病理生理与临床表现各异,决定了不同患者在手术方式选择和疗效的差异。而以往临床的手术方式的选择往往依赖于术者的经验喜好,没有客观的指标指导具体选择。因而有必要探索一套简单易行的手术适应症选择标准来指导具体手术方式的选择。

为进一步规范术式选择,结合不同手术方式的原理、优点,我们根据患者的个体特征制定了量化评分表,作为手术方式选择的依据,主要因素包括:(1)病因学:肝炎后肝硬化、血吸虫肝硬化、自身免疫性肝硬化、肝前性门静脉高压;由于乙肝、丙肝等肝炎后肝硬化肝实质毁损较重,肝功能代偿水平较低,因而往往难以耐受较复杂手术的打击。而血吸虫性肝硬变、肝前性门静脉高压以及自身免疫性肝硬化肝储备功能相对较好,因而可以更好地耐受分流手术。其中,如果患者为慢性活动性肝病,往往表示患

者肝功能处于失代偿状态,更难以耐受手术。(2)肝功能评价,根据CPS分级判断患者的耐受程度,其中胆红素水平、凝血功能更正确反映患者的肝脏功能,而前白蛋白较准确地反映肝脏的合成功能,因而我们也将血清前白蛋白水平作为重要的参考指标;(3)门静脉高压特征,如果患者以上消化道出血,腹水为主要表现,表明患者主要是门静脉高压高动力循环状态,门静脉压力较高,单纯断流术后往往有较高的再出血率^[6];国内研究表明,断流术后自由门静脉压高的患者再出血率显著高于FPP较低者,进一步证明有效降低门静脉压力对上消化道出血的预防作用^[6-7]。分流手术往往更能较彻底地降低门静脉高压水平和术后再出血和腹水的发生率。而以反复肝性脑病、黄疸、凝血功能障碍等肝功能损害为主的门静脉高压症,表明患者的肝功能处于较严重的失代偿状态,患者耐受性较低,分流术往往加重肝损害、诱导肝性脑病和肝功能衰竭的发生,因而选择断流手术更为适当。(4)出血原因,是食管胃底曲张静脉破裂出血还是门静脉高压性胃病出血;尤其是门静脉高压性胃病,断流术加重患者胃壁淤血缺氧,因而必须选择分流手术。其他如年龄等因素也决定患者肝功能的代偿能力。

关于不同分流术式的选择,我们往往首选脾肾分流。这是因为该手术具有以下优势:该术式和脾切除处于同一手术野;可以有效防止脾切除术后脾静脉血栓;有效分流脾胃区血流、而对肠系膜上区血流分流相对较少^[8]。如有脾切除史或脾静脉、肾静脉条件不佳,则选择肠腔限制或架桥分流。对于门腔分流,由于分流量过大往往谨慎应用。而对远端脾肾分流因分流效果难以保证、术后分流血管高栓塞率、短期内脾亢问题等顾虑而较少采用。需要强调的是,对近期出血患者,我们在分流基础上均附加责门周围血管离断,以充分发挥断流、分流的联合优势^[8-9]。

既往手术方式也是再手术方式选择的重要依据。以往断流手术,再手术时局部粘连往往极其严重,再次断流难以彻底,选择分流手术效果更可靠。以往分流手术史再手术时可考虑断流,也可以考虑其他分流方式。而多次手术史患者再手术时往往因为既往手术造成局部广泛粘连和大量侧枝循环在形成,无论是断流还是分流手术都极为困难且效果不佳,必须通过新的手术途径才能到达治疗目的。既往有选择经胸

再次断流. 但我们认为经胸断流手术创伤大, 患者耐受性低, 且该术式无法解决更常见的胃周曲张静脉出血, 术后门静脉高压状态未解除, 因而效果有限. 我们对该类患者通常在认真评估手术史基础上努力通过新的分流手术方式以达到更好的治疗目的. 我们有一例37岁门静脉海绵样变患者, 既往接受脾切除、断流、分流失败、再断流等5次手术史, 再发上消化道出血. 我们通过MRA显示患者门腔系统, 发现患者SMV缺乏主干, 因而第一次分流失败. 但发现胰颈部PV、SMV、SPV交汇处膨大. 术中通过翻转十二指肠和胰头, 经胰腺背面切开解剖分离出PV、SMV、SPV结合部, 行门-腔分流术, 近期随访未再出血. 而对于一般情况差、手术史复杂、或血管条件不佳者选择TIPS^[10-14]或内镜治疗, 条件许可时选择肝移植^[15].

由于门静脉高压术式复杂, 制定简易、科学的选择标准有助于指导外科治疗, 提高手术效果, 降低并发症的发生率. 与相关单一手术方式相比较, 我们通过将患者相关因素进行评分, 明确了患者的治疗方式选择, 统一了手术治疗模式, 取得了较好的临床效果. 尽管没有进行长期随访研究和对比研究, 我们认为通过评分法指导门静脉高压并发上消化道出血的术式选择具有可行性和合理性.

4 参考文献

- 1 冷希圣. 重视门静脉高压症外科治疗的选择. 临床外科杂志 2004; 12: 389-391
- 2 张同琳, 李国新, 王港. Child C级肝硬化门静脉高压

- 3 症食道胃底静脉曲张破裂的治疗. 中国微创外科杂志 2001; 1: 10-12
- 4 杨镇, 裘法祖. 脾切除贲门周围血管离断术治疗门静脉高压症的疗效. 中华外科杂志 2000; 38: 645-648
- 5 陈光, 任江, 王广义, 所剑, 谭毓铨. 断流术治疗门静脉高压症的疗效分析. 中华普通外科杂志 2006; 21: 315-317
- 6 杨镇. 选择性贲门周围血管离断术. 临床外科杂志 2004; 12: 393-394
- 7 王维民, 杨尹默, 万远廉, 黄蕊庭. 术中门静脉压力决定手术方式的评价(附112例病例分析). 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 811-813
- 8 花荣, 吴志勇, 孙勇伟, 邱江锋, 罗蒙, 徐庆, 徐琳. 断流术中门静脉压力变化及术后再出血的临床研究. 中华普通外科杂志 2007; 22: 194-196
- 9 吴志勇. 脾切除脾肾静脉分流加贲门周围离断术应成为门静脉高压症出血治疗的首选术式. 中国实用外科杂志 2002; 22: 60-62
- 10 张曙光, 阮长乐, 于振海, 李光新, 李兆亨. 断流和分流联合术治疗肝硬化门静脉高压症疗效观察. 中国实用外科杂志 2001; 21: 147-148
- 11 杨建勇. 经颈静脉肝内门体静脉分流术的回顾与展望. 中华放射学杂志 2000; 34: 799-801
- 12 Papatheodoridis GV, Goulis J, Leandro G, Patch D, Burroughs AK. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt compared with endoscopic treatment for prevention of variceal rebleeding: A meta-analysis. *Hepatology* 1999; 30: 612-622
- 13 Jenkins RL, Gedaly R, Pomposelli JJ, Pomfret EA, Gordon F, Lewis WD. Distal splenorenal shunt: role, indications, and utility in the era of liver transplantation. *Arch Surg* 1999; 134: 416-420
- 14 Henderson JM, Boyer TD, Kutner MH, Galloway JR, Rikkens LF, Jeffers LJ, Abu-Elmagd K, Connor J. Distal splenorenal shunt versus transjugular intrahepatic portal systematic shunt for variceal bleeding: a randomized trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1643-1651
- 15 廖凯兵, 冯敏生, 梁惠民, 郑传胜. 门静脉高压症介入断流术与外科断流术的临床对照研究. 临床放射学杂志 2007; 26: 712-716
- 16 Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371: 838-851

■同行评价

本文章思路新颖, 有一定创新性, 但评分系统中的各相关因素分析情况最好要进行说明, 评分系统的科学性和客观性等需要进一步临床验证, 建议分析已有资料, 进一步研究.

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: 张海宇 2008-06-18)

内镜治疗胃肠道Dieulafoy病出血77例

崔俊, 刘运祥, 吴承荣, 黄留业

■背景资料

Dieulafoy病系一种少见的先天性血管畸形, 由于本病缺乏特异性症状, 临床诊断困难。急诊内镜检查是诊断该病的重要手段。一般认为内科治疗Dieulafoy病无效, 主要是内镜治疗和手术治疗。本研究采用三种内镜止血方法治疗Dieulafoy病出血。

崔俊, 刘运祥, 吴承荣, 黄留业, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院消化内科 山东省烟台市 264000

作者贡献分布: 此课题由崔俊, 刘运祥, 吴承荣及黄留业设计; 研究过程由崔俊, 吴承荣及黄留业操作完成; 数据分析由崔俊及吴承荣完成; 本论文写作由崔俊及黄留业完成。

通讯作者: 崔俊, 264000, 山东省烟台市毓璜顶东路20号, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院消化内科。

cuijun89@hotmail.com

电话: 0535-7062606

收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-03-16

Endoscopic therapy for gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion: an analysis of 77 cases

Jun Cui, Yun-Xiang Liu, Cheng-Rong Wu, Liu-Ye Huang

Jun Cui, Yun-Xiang Liu, Cheng-Rong Wu, Liu-Ye Huang, Department of Gastroenterology, Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Yantai 264000, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Cui Jun, Department of Gastroenterology, Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, 20 Yuhuangding Eastern Road, Yantai 264000, Shandong Province, China
Received: 2008-01-24 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To assess endoscopic homeostasis method for gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion.

METHODS: Seventy-seven patients with gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion were treated with the following three kinds of endoscopic homeostasis methods: injecting therapy with aethoxysclerol (36 cases), endoscopic hemoclip homeostasis (21 cases), hemoclip homeostasis in combination with injecting therapy of aethoxysclerol (20 cases). The successful homeostasis rates and complication rates of the three approaches were assessed.

RESULTS: Successful homeostasis rates of the three approaches were 80.6% (29/36), 95.2% (20/21) and 100% (20/20), respectively and a significant difference was detected ($P < 0.05$). 7 cases who failed with injecting therapy of aethoxysclerol were treated with hemoclip hemo-

tasis. 5 cases succeeded and 2 cases failed and underwent further surgical operation. 1 case who failed with hemoclip homeostasis was later treated with injecting therapy of aethoxysclerol and bleeding was controlled. No serious complications including perforation occurred in patients using endoscopic hemostasis method and no re-bleeding occurred during half-year follow-up.

CONCLUSION: Hemoclip hemostasis in combination with injecting therapy of aethoxysclerol is the most effective method for gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion.

Key Words: Dieulafoy lesion; Gastrointestinal bleeding; Endoscopic therapy

Cui J, Liu YX, Wu CR, Huang LY. Endoscopic therapy for gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion: an analysis of 77 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1946-1950

摘要

目的: 探讨胃肠道Dieulafoy病出血的内镜止血治疗方法。

方法: 胃肠道Dieulafoy病出血患者77例, 分别采用以下3种内镜治疗方法: 乙氧硬化醇硬化治疗(36例)、金属夹钳夹止血治疗(21例)、金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗(20例)。比较这3种内镜治疗方法的止血成功率及并发症发生率。

结果: 3种方法内镜止血成功率分别为80.6%(29/36)、95.2%(20/21)、100%(20/20), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。乙氧硬化醇硬化治疗失败的7例患者行金属夹钳夹止血治疗, 5例成功, 2例失败者行外科手术。金属夹钳夹止血治疗失败的1例患者行乙氧硬化醇硬化治疗, 止血成功。内镜止血成功者未发生穿孔等严重并发症, 随访半年未发生再出血。

结论: 金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗是Dieulafoy病出血最有效的内镜治疗方法。

关键词: Dieulafoy病; 消化道出血; 内镜治疗

■同行评议者

李玉民, 教授, 兰州大学第一医院

崔俊, 刘运祥, 吴承荣, 黄留业. 内镜治疗胃肠道Dieulafoy病出血77例. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1946-1950
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1946.asp>

0 引言

Dieulafoy病由Gallad于1884年首先报道, 1903年Dieulafoy对其做了系统描述, 文献将本病称为Dieulafoy病, 亦称为Dieulafoy血管畸形^[1]. 本文收集我院自2004-01/2007-05经内镜确诊的胃肠道Dieulafoy病出血患者77例, 行内镜下止血治疗, 取得了良好的治疗效果, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 消化道出血患者77例, 行急诊内镜检查, 确诊为Dieulafoy病, 男52例, 女25例, 平均年龄53岁. 诊断标准: (1)溃疡底部为暴露的血管断端(多为扩张的小动脉); (2)溃疡浅小, 直径<0.5 cm; (3)活动期表现为喷射状出血, 如出血已止, 内镜下仔细观察可发现黑色血痂覆盖, 易漏诊; (4)本病好发于老年人, 可能与小血管畸形或动脉硬化有关; (5)内镜下所见病灶多发于胃体部或底、体交界处^[2-4]. 临床表现为反复发作性呕血、柏油样大便或解暗红色血便, 出血量约800-2000 mL, 伴有不同程度的休克, 血红蛋白46-80 g/L. 出血前无明显上腹部不适和疼痛, 无消化性溃疡史和家族遗传史. 内镜下表现: 所有患者均可见大量积血及血凝块, 经盐水冲洗清除积血, 可见新鲜血凝块覆于黏膜上32例(占41.6%), 小动脉喷射性出血25例(占32.5%), 破裂的血管残端20例(占26.0%), 周围黏膜未见明显充血水肿. 内镜下病灶位于胃体上部29例(占37.7%), 贲门周围22例(占28.6%), 胃底部10例(占13.0%), 胃体中部3例(占3.9%), 胃体下部2例(占2.6%), 胃窦部1例(占1.3%), 十二指肠球部1例(占1.3%), 十二指肠降段2例(占2.6%), 结肠4例(5.2%), 食管3例(3.9%).

1.2 方法 本组病例采用三种内镜下治疗方法. (1)乙氧硬化醇硬化治疗组, 本组有36例采用该治疗方法, 用10 mL/L乙氧硬化醇围绕血管周围黏膜下注射, 每点0.5 mL, 一般注射3-6点, 注射总量3-5 mL, 最后在血管断端注射. (2)金属夹钳夹止血治疗组, 本组有21例患者采用该治疗方法, 金属夹持器为Olympus HX-5LR-1, 金属夹为Olympus clip HX-600-135, 对出血动脉给予金属夹钳夹止血, 直至无小动脉喷血、活动性出血消失或血管残端闭合. (3)金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗组, 本组有20例患者采用

该治疗方法, 先对出血动脉给予金属夹钳夹止血, 直至出血停止, 再用1%乙氧硬化醇于血管周围行黏膜下注射, 每点注射0.5 mL, 一般注射3-6点, 注射总量3-5 mL.

统计学处理 采用卡方检验比较三种内镜治疗方法的止血成功率及并发症发生率有无差异(应用SPSS10.0统计软件), 以 $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 内镜止血成功率 卡方检验比较三种内镜止血方法治疗Dieulafoy病出血的止血成功率.

2.1.1 乙氧硬化醇硬化治疗组的止血成功率: 36例行乙氧硬化醇硬化治疗者有29例内镜止血成功, 7例于短期(48 h内)发生再出血, 再出血的患者行内镜下金属夹钳夹止血治疗, 5例止血成功, 2例金属夹钳夹止血不成功的患者转外科行手术治疗, 本组的止血成功率为80.6%(29/36)(图1, 表1).

2.1.2 金属夹钳夹止血治疗组的止血成功率: 21例行金属夹钳夹止血治疗者有20例止血成功, 1例于短期(48 h内)发生再出血, 再出血的患者行乙氧硬化醇硬化治疗联合金属止血夹钳夹止血治疗, 止血成功, 本组的止血成功率为95.2%(20/21)(图2, 表1).

2.1.3 金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗组的止血成功率: 本组20例患者全部止血成功, 无再出血病例, 本组的止血成功率为100%(20/20)(图3, 表1).

2.2 并发症及随访 本组行内镜下止血治疗的77例患者, 有2例内镜止血不成功者转外科行手术治疗, 经内镜止血成功的75例患者无穿孔等严重并发症发生. 对内镜止血成功者随访半年, 未再发生消化道出血.

3 讨论

Dieulafoy病系一种少见的先天性血管畸形, 又称“Dieulafoy溃疡”或“恒径动脉出血”, 自1898年法国外科医师Dieulafoy描述的3例致命性胃出血至今已100多年, 该病可发生于消化道的任何部位, 如食管、结肠、小肠, 好发于胃小弯距贲门食管连接部6 cm以内^[5-8]. 由于本病缺乏特异性症状, 给临床诊断造成困难, 急诊内镜检查是诊断该病的重要手段. Dieulafoy病的内镜下表现有下列几种: (1)胃黏膜浅表凹陷, 中间有血管走行, 表面有凝血块或血痂; (2)胃小弯黏膜局灶性缺损伴喷射状出血; (3)偶尔可见小动脉孤立突出于黏膜表面, 时而可见搏动性出血; (4)

■ 相关报道

应用垂体后叶素或生长抑素及其衍生物, 能使内脏血管收缩减少血流量, 为治疗Dieulafoy病做准备. 上世纪80年代以前一直以外科手术治疗为主, 自Boron *et al*于1987年首创内镜治疗后, 开始用内镜治疗本病, 具有易操作、可重复、创伤小、安全有效等优点.

■创新盘点

本研究采用三种内镜止血方法治疗Dieulafoy病出血,其一为乙氧硬化醇硬化治疗;其二为金属夹钳夹止血;其三为金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗。结果表明,金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗是治疗Dieulafoy病出血最有效的方法,可有效降低再出血率。

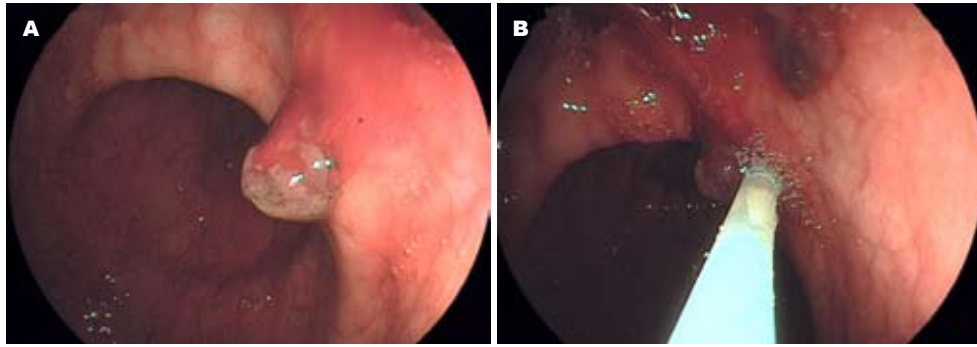


图 1 胃窦后壁Dieulafoy病. A: 治疗前见血管断端渗血; B: 乙氧硬化醇硬化治疗, 渗血停止.

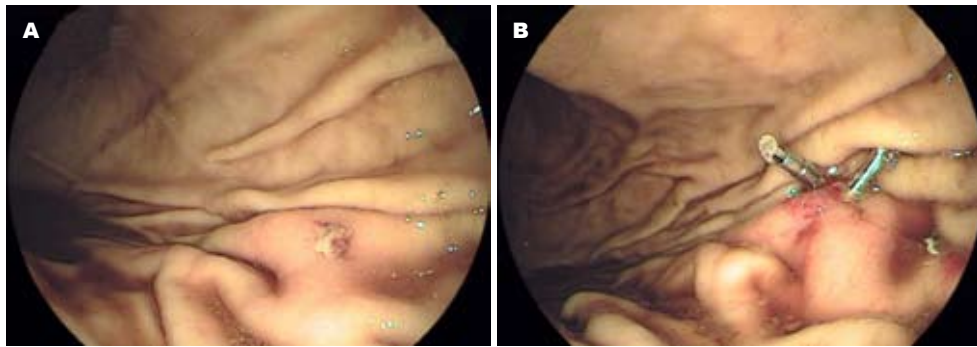


图 2 胃体大弯侧Dieulafoy病. A: 治疗前见血管残端; B: 金属夹钳夹止血治疗.

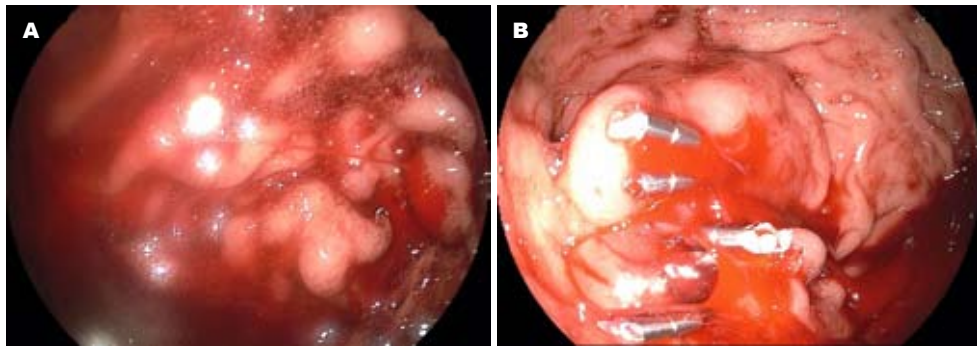


图 3 胃底Dieulafoy病. A: 治疗前见血管呈水柱样喷血; B: 先用金属夹钳夹止血, 出血停止, 再用1%乙氧硬化醇于血管周围行黏膜下注射.

表 1 三种内镜止血方法治疗Dieulafoy病出血的止血成功率

止血效果	乙氧硬化醇硬化治疗组 (n = 36)	金属夹钳夹止血治疗组 (n = 21)	金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗组 (n = 20)	P值
成功	29	20	20	0.045
失败	7	1	0	
合计	36	21	20	
成功率	80.6%	95.2%	100%	

更少见的是黏膜表面呈出汗样渗血,常在出血时被发现^[9-12]。

本病起病突然,发病前常无明显诱因,既往

也多无溃疡病和肝硬化等出血病史,由于是恒径动脉破裂出血,出血量大,多以呕血或呕血伴黑便为首发表现^[13-16]。Dieulafoy病的发病机制多数人认为是先天性血管畸形。正常胃肠壁动脉随着分支而逐渐变细为0.12-0.2 mm,最后形成黏膜下毛细血管网。本病的小动脉进入浆膜和肌层后不但不变细反而异常扩张,其管径可达0.4-4 mm,此恒定的血管口径是该病的病理基础。如此异常扩张的小动脉迂曲地走行在黏膜下,导致覆盖其上的黏膜受顶压,使其缺血、萎缩、变薄,在消化液腐蚀、食糜摩擦下形成小溃疡,使小动脉裸露、破裂、出血。其病原动脉多数来自胃左动脉分支,故出血灶多位于距贲

门6 cm内的小弯侧胃壁^[17-19]. 小动脉出血后血压下降, 血管收缩, 血栓形成, 出血可暂时停止, 原来裸露的血管可潜入黏膜下, 导致内镜检查甚至手术也未能发现出血部位, 若血压回升或血痂脱落又可再次大出血.

一般认为内科治疗Dieulafoy病无效, 主要是内镜治疗和手术治疗. 应用垂体后叶素或生长抑素及其衍生物, 能使内脏血管收缩减少血流量, 为镜下治疗和手术治疗做准备. 上世纪80年代以前对Dieulafoy病的治疗一直以外科手术为主, 自Boron *et al*^[20]于1987年首创经内镜治疗3例患者获得成功, 国内外越来越多学者开始用内镜治疗本病, 死亡率也由原来的60%-70%降低至20%, 内镜止血具有易操作、可重复、创伤小、安全有效等优点, 而且在检查过程中即可实施, 所用方法有黏膜下注射治疗、电凝、激光、热探头、微波、套扎和钛夹止血等, 各家报告有效率均在80%以上^[21-28].

本研究采用三种内镜止血方法治疗Dieulafoy病出血, 其一为乙氧硬化醇硬化治疗, 该方法可使血管硬化闭塞防止再出血. 乙氧硬化醇注射可使局部组织水肿, 出血灶周围压力增高, 压迫血管, 血管内血栓形成. 静脉旁注射能迅速引起水肿、炎症, 大量成纤维母细胞增生, 是硬化剂中最早发生纤维变性的药物, 本研究有36例患者采用该方法, 内镜止血成功率为80.6%(29/36). 其二为金属夹钳夹止血, 金属夹钳夹止血的机制与外科血管缝合或结扎相同, 是一种物理性机械方法, 其有效的止血作用要求准确钳夹出血血管断端或出血血管的来源, 本研究有21例患者采用该方法, 内镜止血成功率为95.2%(20/21). 其三为金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗, 本研究有20例患者采用该方法, 内镜止血成功率为100%(20/20). 本研究结果表明, 金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗是治疗Dieulafoy病出血最有效的方法, 可有效降低再出血率.

金属夹钳夹止血术广泛地适应于非静脉曲张活动性出血(立即止血)及可见血管残端(预防再出血), Dieulafoy病是其主要适应证之一^[29-30]. 治疗前由助手先在持放推送器上安装金属夹, 发现病灶后经内镜钳道将推送管送出内镜前端, 伸出金属夹, 向后移动手柄部将金属夹张开度达到最大(1.2 cm), 通过推送器上的旋转装置调整方向, 使张开的钳叉对准病灶, 然后将推送器上的滑动柄向后移动, 套锁金属夹, 当听到“咔

哒”声说明金属夹完全合拢, 最后将持放器脱离金属夹, 并退出持放器, 一般病灶使用1枚金属夹, 较大病灶可对称性使用2枚或2枚以上金属夹. 我们体会成功的关键: (1)尽量正面直视病灶; (2)充分暴露病灶及毗邻关系, 尽量使夹子与出血区域呈45-90度角; (3)应注意夹子的深度, 最理想的深度是暴露血管与深层组织一并钳夹, 不能钳夹过浅, 如果过浅, 短时间内夹子脱落而引起再出血. 夹子通常在1-3 wk后自行脱落, 与食物残渣及粪便相混, 通过粪便排除体外, 该方法损伤小, 易于及时施行, 一次不成功者, 可重复数次, 即使治疗失败, 还可作为病变位置标记, 为手术发现病灶提供方便, 避免盲目切除. 此项技术作为治疗Dieulafoy病的一种积极有效的方法正逐渐被广大内镜医师所接受, 在此基础上辅以乙氧硬化醇硬化治疗, 可有效降低Dieulafoy病内镜治疗后的再出血率.

4 参考文献

- Sai Prasad TR, Lim KH, Lim KH, Yap TL. Bleeding jejunal Dieulafoy pseudopolyp: capsule endoscopic detection and laparoscopic-assisted resection. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2007; 17: 509-512
- Penner RM, Owen RJ, Williams CN. Diagnosis of a bleeding Dieulafoy lesion on computed tomography and its subsequent embolization. *Can J Gastroenterol* 2004; 18: 525-527
- Garg R. Bleeding from a gastric Dieulafoy lesion. *Emerg Med J* 2007; 24: 520
- Apiratpracha W, Ho JK, Powell JJ, Yoshida EM. Acute lower gastrointestinal bleeding from a dieulafoy lesion proximal to the anorectal junction post-orthotopic liver transplant. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7547-7548
- Nga ME, Buhari SA, Iau PT, Raju GC. Jejunal Dieulafoy lesion with massive lower intestinal bleeding. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 1417-1418
- Alshumrani G, Almuaikel M. Angiographic findings and endovascular embolization in Dieulafoy disease: a case report and literature review. *Diagn Interv Radiol* 2006; 12: 151-154
- Casella G, Bonforte G, Corso R, Buda CA, Corti G, Cambareri AR, Magri F, Baldini V. Rectal bleeding by Dieulafoy-like lesion: successful endoscopic treatment. *G Chir* 2005; 26: 415-418
- Pathan NF, El-Fanek H. A 70-year-old man with episodes of upper gastrointestinal bleeding. Dieulafoy lesion/malformation. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: e27-e29
- Scudiere JR, Cimbalk D, Jakate S. A 74-year-old man with fatal gastrointestinal bleeding. Ruptured Dieulafoy lesion or caliber-persistent artery. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 223-224
- Badwal S, Jain M, Rastogi A, Rawat A, Agrawal T. Dieulafoy disease of the stomach presenting as mass lesion—a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48: 211-213
- Hokama A, Takeshima Y, Toyoda A, Yonamine Y, Tomiyama R, Kinjo F, Nishimaki T, Saito A. Images

■应用要点

金属夹钳夹止血联合乙氧硬化醇硬化治疗是治疗Dieulafoy病出血最有效的方法, 可有效降低再出血率.

■同行评价

本文是一篇临床经验的总结性文章,有一定的学术价值。图片较为清晰,数据较为准确合理,具有较好的学术价值。

- of interest. *Gastrointestinal: rectal Dieulafoy lesion. J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1303
- 12 Sone Y, Kumada T, Toyoda H, Hisanaga Y, Kiriyaama S, Tanikawa M. Endoscopic management and follow up of Dieulafoy lesion in the upper gastrointestinal tract. *Endoscopy* 2005; 37: 449-453
 - 13 Tan FL, Tan YM, Chung YF. Images of interest. *Gastrointestinal: colonic Dieulafoy lesion. J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 483
 - 14 Abraham P, Mukerji SS, Desai DC, Joshi AG. Dieulafoy lesion in mid-esophagus with esophageal varices. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 220-221
 - 15 Levy MJ, Wong Kee Song LM, Farnell MB, Misra S, Sarr MG, Gostout CJ. Endoscopic ultrasound (EUS)-guided angiotherapy of refractory gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 352-359
 - 16 Katsinelos P, Pilpilidis I, Paroutoglou G, Galanis I, Tsolkas P, Fotiadis G, Kapelidis P, Georgiadou E, Baltagiannis S, Dimiropoulos S, Kamperis E, Koutras C. Dieulafoy-like lesion of the colon presenting with massive lower gastrointestinal bleeding. *Surg Endosc* 2004; 18: 346
 - 17 Katsinelos P, Paroutoglou G, Pilpilidis I, Tsolkas P, Papagiannis A, Kapelidis P, Trakateli C, Iliadis A, Georgiadou E, Kamperis E, Dimiropoulos S, Vasiliadis I. Double Dieulafoy-like lesion in the stomach. *Surg Endosc* 2003; 17: 1324
 - 18 Pishori T, Khurshaidi N, Khan SM, Hussainy AS. Massive lower gastrointestinal bleeding due to Dieulafoy lesion of colon. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22: 66-67
 - 19 Vats HS, Wengert TJ, Torbey CF. Gastrointestinal stromal tumor with Dieulafoy lesion: a novel association. *Clin Med Res* 2006; 4: 228-229
 - 20 Boron B, Mobarhan S. Endoscopic treatment of Dieulafoy hemorrhage. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9: 518-520
 - 21 Yilmaz M, Ozutemiz O, Karasu Z, Ersoz G, Gunsar F, Batur Y, Aydin A, Tekesin O, Yonecti N, Ilter T. Endoscopic injection therapy of bleeding Dieulafoy lesion of the stomach. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1622-1625
 - 22 Kim HK, Kim JS, Son HS, Park YW, Chae HS, Cho YS. Endoscopic band ligation for the treatment of rectal Dieulafoy lesions: risks and disadvantages. *Endoscopy* 2007; 39: 924-925
 - 23 Yen HH, Chen YY. Endoscopic band ligation for Dieulafoy lesions: disadvantages and risks. *Endoscopy* 2006; 38: 651
 - 24 Linhares MM, Filho BH, Schraibman V, Goitia-Duran MB, Grande JC, Sato NY, Lourenco LG, Lopes-Filho GD. Dieulafoy lesion: endoscopic and surgical management. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2006; 16: 1-3
 - 25 Valera JM, Pino RQ, Poniachik J, Gil LC, O'Brien M, Saenz R, Quigley EM. Endoscopic band ligation of bleeding dieulafoy lesions: the best therapeutic strategy. *Endoscopy* 2006; 38: 193-194
 - 26 Xavier S. Band ligation of Dieulafoy lesions. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 114-115
 - 27 Cheng CL, Liu NJ, Lee CS, Chen PC, Ho YP, Tang JH, Yang C, Sung KF, Lin CH, Chiu CT. Endoscopic management of Dieulafoy lesions in acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1139-1144
 - 28 Freeman ML. New and old methods for endoscopic control of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Rev Gastroenterol Mex* 2003; 68 Suppl 3: 62-65
 - 29 Lee BI, Kim BW, Choi H, Cho SH, Chae HS, Choi MG, Kim JK, Han SW, Choi KY, Chung IS, Cha SB, Sun HS. Hemoclip placement through a forward-viewing endoscope for a Dieulafoy-like lesion in a duodenal diverticulum. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 813-814
 - 30 Park CH, Sohn YH, Lee WS, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. The usefulness of endoscopic hemoclippping for bleeding Dieulafoy lesions. *Endoscopy* 2003; 35: 388-392

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 2008-06-18)

溃疡性结肠炎的临床及内镜特点分析120例

施斌斌, 黄重发, 朱清

施斌斌, 黄重发, 朱清, 中国人民解放军第四五四医院消化科 江苏省南京市 210002
作者贡献分布: 结肠镜操作由施斌斌、黄重发及朱清操作完成; 临床资料由朱清收集整理; 数据分析及论文写作由施斌斌完成。
通讯作者: 施斌斌, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军第四五四医院消化科. shibinbin1974@sina.com
收稿日期: 2008-01-18 修回日期: 2008-03-20

Clinical analysis and colonoscopic manifestations in 120 patients with ulcerative colitis

Bin-Bin Shi, Chong-Fa Huang, Qing Zhu

Bin-Bin Shi, Chong-Fa Huang, Qing Zhu, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Bin-Bin Shi, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. shibinbin1974@sina.com
Received: 2008-01-18 Revised: 2008-03-20

Abstract

AIM: To evaluate clinical features, colonoscopic manifestations, PLT levels, ESR levels and C-reactive protein (CRP) of ulcerative colitis.

METHODS: The clinical data obtained from 120 patients with ulcerative colitis admitted to our hospital from Jan. 2003 to Dec. 2006 were retrospectively analyzed concerning its colonoscopic manifestations, PLT levels, ESR levels and CRP concentrations.

RESULTS: Of 120 cases, the onset age of UC mainly fell within the range of 31-40. Mucopurulent Bloody stool and abdominal pain were major clinical manifestations present in 72.3% and 60.8% of the patients, respectively. Congested and swollen mucosa (91.7%), obscure vascular net (84.2%) and superficial ulcers (68.3%) were commonly seen under colonoscopy. Proctosigmoiditis and left-sided colitis were found in 62 patients (51.7%). Chronic mucosal inflammation (97.7%), inflammatory cells infiltration (50.0%) and crypt abscess (41.7%) were found upon pathological examination. The levels of PLT, ESR and CRP were significantly higher than that in healthy controls.

CONCLUSION: The lesions of UC are commonly confined to the left sided colon. Colonoscopy plays an important role in UC diagnosis. The levels of PLT, ESR and CRP can be used as indicators for severity degree of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Colonoscopy; Clinical feature

Shi BB, Huang CF, Zhu Q. Clinical analysis and colonoscopic manifestations in 120 patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1951-1953

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(UC)的临床特点、结肠镜表现、血小板(PLT)、血沉(ESR)和C-反应蛋白(CRP)水平。

方法: 收集2003-01/2006-12我院诊治的UC患者120例, 对其临床资料、内镜特点及实验室检查结果进行回顾性分析。

结果: 120例患者中, 发病年龄以31-40岁为主, 临床表现以黏液脓血便(72.3%)和腹痛(60.8%)为主; 结肠镜镜下表现以黏膜充血水肿(91.7%)、血管网模糊(84.2%)、浅表溃疡(68.3%)最为常见, 病变多发生于直肠、乙状结肠及左半结肠(51.7%); 病理检查以黏膜慢性炎(97.7%), 炎性细胞浸润(50.0%)及隐窝脓肿(41.7%)为常见; PLT、ESR及CRP水平较正常对照组明显升高。

结论: UC病变大多局限于左半结肠, 结肠镜对UC有较大的诊断意义, PLT、ESR及CRP用来评价UC病情严重性的指标。

关键词: 溃疡性结肠炎; 结肠镜检查; 临床表现

施斌斌, 黄重发, 朱清. 溃疡性结肠炎的临床及内镜特点分析120例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(17): 1951-1953
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1951.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因

■背景资料

溃疡性结肠炎是目前消化系统疾病研究热点之一, 发病率呈上升趋势, 发病机制尚不十分明确. 临床对疾病的准确评估并给出合理的治疗方案是防止复发的一个关键因素.

■同行评议者

崔立红, 副教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科

■研发前沿

目前用于诊断溃疡性结肠炎活动性或预后的方法很多,血小板、血沉、C-反应蛋白对于溃疡性结肠炎严重程度评估的作用受到越来越多的关注。

表 1 UC病变部位分布

病变部位	<i>n</i>	百分比(%)
直肠	18	15.0
直肠+乙状结肠	30	25.0
左半结肠	14	11.7
全结肠	17	14.1
次全结肠	15	12.5
跳跃式病变	9	7.5
右半结肠	2	1.7
区域性病变	15	12.5

表 2 UC内镜下表现

内镜下表现	<i>n</i>	百分比(%)
黏膜充血水肿	110	91.7
糜烂	82	68.3
浅表溃疡	65	54.2
纵行溃疡	5	4.2
颗粒结节样改变	15	12.5
溃疡融合	16	13.3
血管网模糊	101	84.2
出血	46	38.3
脓性渗出	90	75.0
假性息肉	26	21.7
肠腔狭窄	7	5.8
结肠袋消失	10	8.3

不明的非特异性的慢性结肠炎,主要表现为肠道的炎症和溃疡,病变主要局限于大肠黏膜与黏膜下层,近年来本病的发病率呈上升趋势。我们收集了2003-01/2006-12我院诊治的UC患者120例,对其临床资料、内镜特点及实验室检查结果进行回顾性分析,以探讨UC的内镜及临床特点。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2006-12我院诊治的UC患者120例,其结肠所见、活检及临床表现,均符合2000年成都会议制定的UC诊断标准^[1]。临床资料记录包括:一般情况:性别、年龄、大便性状;临床症状;内镜检查结果、病理结果;血小板计数(PLT)、血沉(ESR)、C反应蛋白(CRP)。

1.2 方法 应用奥林巴斯CF-140 I型电子结肠镜进行全结肠镜检查。全部送达回盲部,在退镜时,位于结肠或直肠炎症最明显处,取活检3-5块,以10%甲醛液固定,送病理室检验。所有患者均静脉采血,用肝素抗凝。常规检测血常规、血沉,采用速率散射比浊法检测CRP。

■相关报道

国内外研究显示,血小板计数可作为病情活动的指标,C-反应蛋白适合于反映中、重度溃疡性结肠炎的活动性,并可反映药物治疗的有效性。

表 3 UC病理特点

病理表现	<i>n</i>	百分比(%)
黏膜慢性炎	116	97.7
炎性细胞浸润	60	50.0
隐窝脓肿	50	41.7
淋巴组织增生	33	27.5
急性活动	41	34.2
肉芽组织	24	20.0
淋巴滤泡形成	30	25.0
炎性渗出	18	15.0

表 4 UC病例及正常对照组血小板、血沉、C反应蛋白

分组(<i>n</i>)	血小板($\times 10^9/L$)	血沉(mm/h)	C反应蛋白(mg/L)
UC组(65)	269.12 \pm 77.01 ^a	34.17 \pm 8.23 ^a	15.87 \pm 3.74 ^b
正常对照组(24)	155.34 \pm 46.21	15.86 \pm 7.55	3.82 \pm 1.25

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组。

2 结果

2.1 临床资料 本组120例病例中,男75例,女45例,男女之比为1.67:1;年龄在11-78(平均年龄42.14)岁,发病高峰为31-40岁,为34例(28.3%)。发病季节四季度间无明显差别。病程7 d-16年(表1)。

2.2 临床表现 黏液和/或脓血便共87例,占72.3%;腹痛、排便后疼痛减轻,共73例,占60.8%;里急后重共42例,占35%;发热乏力共36例,占30%;体质量减轻共25例,占20.8%;贫血共23例,占19.1%;肠外病变共13例,占10.8%。发病诱因以情绪、饮食、劳累、受凉为常见。

2.3 镜下表现和病理特点 病变部位多发生于直肠、乙状结肠及左半结肠(51.7%)(表1);镜下表现以黏膜充血水肿(91.7%)、血管网模糊(84.2%)、浅表溃疡(68.3%)为最常见(表2)。病理主要表现为黏膜慢性炎,多见炎性细胞浸润、隐窝脓肿、急性活动等(表3)。

2.4 UC病例PLT、ESR、CRP水平 UC患者PLT较正常对照组明显升高($P < 0.05$),ESR明显增快($P < 0.05$),CRP水平显著高于正常对照组($P < 0.01$,表4)。

3 讨论

UC是一种慢性反复发作性疾病,近年来,溃疡性结肠炎的发病率呈上升趋势,可能与人们生活习惯、生活方式的变化、城市环境改变等有关^[2-3]。

UC的发病机制至今尚未完全阐明, 目前有自身免疫、感染、遗传、精神心理因素以及氧自由基等多种病因学说, 近几年来, 新的分子生物学机制的研究使本病在病因的研究方面取得了很大进步^[4-5]. 其疾病的特点为反复发作性, 临床对疾病的准确评估并给予合理的治疗方案是防止复发的一个关键因素.

本研究发现, 溃疡性结肠炎临床表现主要为解黏液脓血, 可伴有腹痛, 多以左下腹痛为主. 结肠镜检查对于UC的确诊十分重要, UC病变多自直肠或从远端结肠开始向上扩展, 因此UC病变部位以直肠、乙状结肠及左半结肠最常见, 本组病例占51.7%, 低于国内学者报道^[6]. 本组患者发病年龄高峰段为31-40岁(28.3%), 男女发病率之比为1.67:1, 病理检查结果以黏膜慢性炎、炎性细胞浸润、隐窝脓肿为多见, 与国内外研究报道相似^[7].

近年来研究表明, UC患者体内存在着血液高凝状态, 血小板增多是炎症性肠病活动期的一种标志, 并且血小板增多可能是发生全身性血栓栓塞诱发因素, 血小板在这一病理变化过程中不仅参与了血栓的形成, 活化的血小板还可释放多种炎症介质, 如血小板活化因子、血栓素、血小板生长因子衍生物等, 还能产生氧自由基, 导致组织损伤. 血栓发生的危险性增加, 提示微血栓的形成可能是UC的重要发病机制之一. 现有的研究^[8-10]表明, 溃疡性结肠炎存在肠黏膜血管内皮损伤, 继而暴露基底膜胶原即可诱发血小板激活, 血小板表面纤维蛋白原受体、血小板 α -颗粒膜糖蛋白显著升高, 内皮细胞暴露内毒素或白介素-1表达组织因子, 造成促凝血状态, 触发血小板活化的聚集, 这是活动期溃疡性结肠炎患者存在血小板激活的病理生理基础. 国外也有用血小板计数和血小板平均体积作为病情活动的指标^[11-12]. 国内学者研究发现, 活动期溃疡性结肠炎患者P选择素和血栓素B2显著高于肠易激综合征患者和正常对照组, 这些发现提示血小板激活可能直接参与溃疡性结肠炎急性发病过程^[13]. 与本次研究发现溃疡性结肠炎患者血小板计数显著高于正常对照组相一致. 国内外报道应用肝素、中药活血化瘀等治疗溃疡性结肠炎, 有效地起到了抑制血小板活化, 降低血小板聚集, 改善血液循环, 减轻血管内皮细胞损伤作用, 从而不仅能预防血栓形成, 还能抑制肠道炎症. CRP、ESR可反映炎症的活动程度, 国内外学者研究表明, 活动期溃疡性结肠炎患者CRP可升高, CRP适合于反映

中、重度UC的活动性, 并能够迅速反映药物治疗的有效性^[14-15]. 本次研究也进一步证实了此观点. 血小板、血沉、C-反应蛋白对于溃疡性结肠炎的诊断无特异性, 但可作为溃疡性结肠炎严重程度评估的较好的指标, 并可作为疗效判断的参考^[16].

溃疡性结肠炎临床表现缺乏特异性, 目前主要根据临床表现、内镜检查和病理检查结果来确诊, 实验室诊断对于UC分级分期有重要帮助, 并有助于对疗效的判断.

4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 胃肠病学 2001; 6: 56
- Winawer SJ. Screening of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2005; 14: 699-722
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004; 53: 1479-1484
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- Kirsner JB. Inflammatory bowel diseases at the University of Chicago—early experiences: a personal historical account. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 407-416
- 张素娟, 刘思德, 张亚历, 白杨. 454例溃疡性结肠炎的临床及内镜检查分析. 现代消化及介入诊疗 2006; 11: 136-139
- Jewell DP. Ulcerative colitis and Crohn's disease—susceptibility genes and clinical patterns. *J Gastroenterol* 1998; 33: 458-462
- 刘英超, 倪群, 虞超辉, 厉有名. 溃疡性结肠炎血小板数量变化观察. 浙江预防医学 2006; 18: 65
- 施嫣红, 黄培新, 郭传勇. 溃疡性结肠炎患者血小板功能的临床研究. 同济大学学报(医学版) 2006; 27: 48-50
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 359-367
- Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfiridaki A, Potamianos SP, Kosmadaki MG, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 776-781
- 黄智勇, 曾国琼, 谭旭东, 林源泉. 血小板激活与活动期发生溃疡性结肠炎的关系. 中国基层医药 2006; 13: 386-387
- Dunker MS, Ten Hove T, Bemelman WA, Slors JF, Gouma DJ, Van Deventer SJ. Interleukin-6, C-reactive protein, and expression of human leukocyte antigen-DR on peripheral blood mononuclear cells in patients after laparoscopic vs. conventional bowel resection: a randomized study. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1238-1244
- 杨川华, 陈晓宇, 冉志华, 戴军, 张林, 刘文忠, 萧树东. C反应蛋白反映炎症性肠病的活动性. 胃肠病学 2006; 11: 350-352
- 陈凡, 张志坚. 67例溃疡性结肠炎的临床分析. 胃肠病学和肝脏病学杂志 2006; 15: 430

■应用要点

本研究显示, 结肠镜及组织检查结合相关生化检查可用于对溃疡性结肠炎患者病情及预后的判断, 对治疗有指导意义.

■同行评价

本研究提供了一些有意义的信息, 如UC的临床表现, 病变部位, 病理改变, 实验室检查等, 但新颖及特异性不够.

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!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化病研究所

蔡三军 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

丁义涛 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院

杜雅菊 主任医师

哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

龚建平 教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李国威 教授

西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李胜 研究员

山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

马大烈 教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院病理科

秦成勇 教授

山东省立医院消化内科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

沈柏用 副教授

上海市交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

王健生 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王晓艳 副教授

湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

熊斌 教授

武汉大学中南医院肿瘤科

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

郁宝铭 教授

上海市第八人民医院结直肠中心

张吉翔 教授

南昌大学第二附属医院消化内科

张锦生 教授

复旦大学上海医学院病理学系

张志坚 教授

福州总医院消化内科

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心