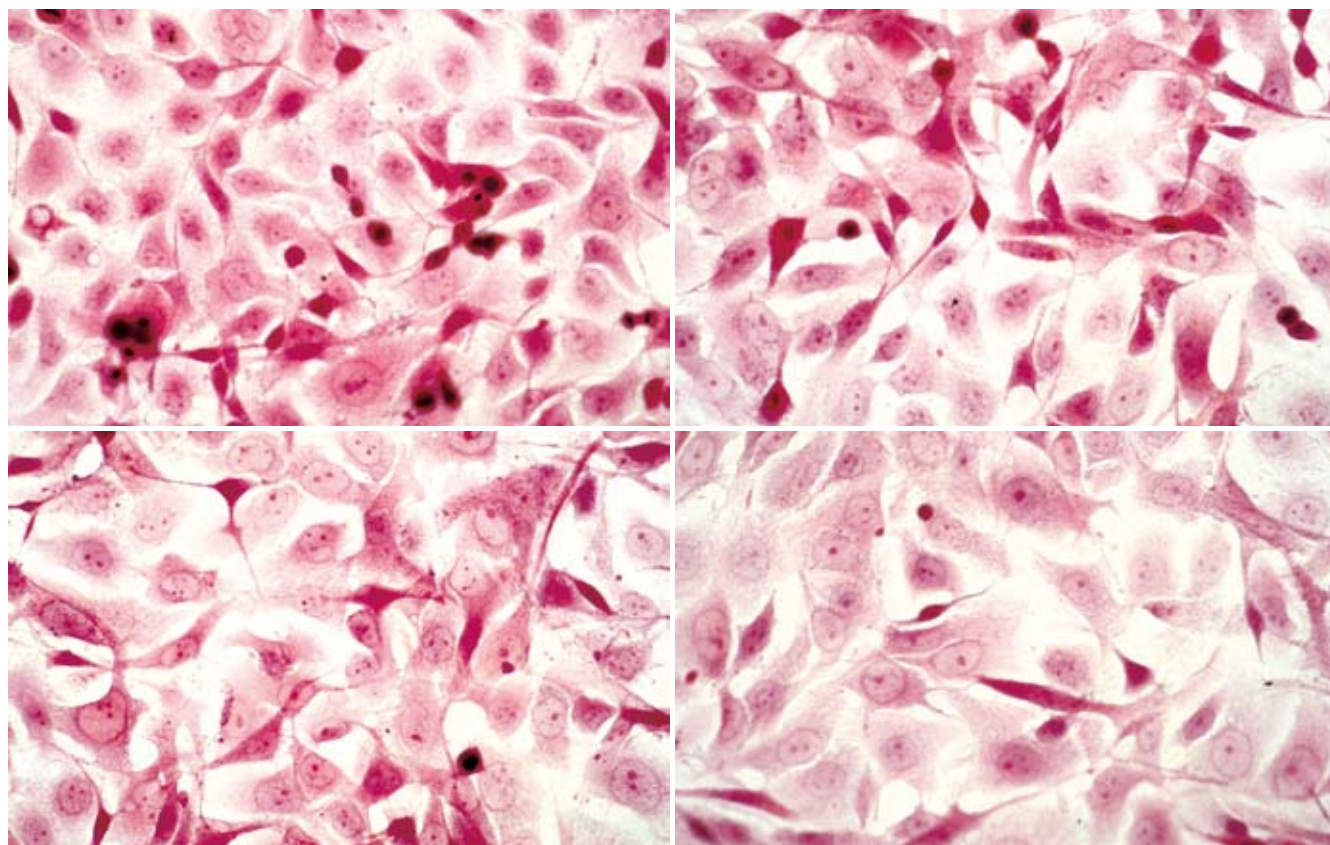


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 7 月 28 日 第 16 卷 第 21 期 (Volume 16 Number 21)



21 / 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
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师

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

张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
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
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
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

裴正军教授
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
吴泰瑞教授
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
郝宝铭教授
郝正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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
阴赧宏研究员
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 7 月 28 日

第 16 卷

第 21 期

(总第245期)

述 评

- 2321 宿主的代谢综合征对慢性丙型肝炎抗病毒治疗的影响及可能机制
李蕴铀, 范小玲

基础 研究

- 2325 神经型钙黏附蛋白的表达对食管鳞癌侵袭和转移的影响
李克, 王鑫, 何炜, 林娜, 樊青霞
- 2333 抗胃癌单链抗体可变区序列分析及空间结构模拟
杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波, 苏成芝
- 2337 mtTFA、NRF-1对冷保存-再灌注肝移植大鼠线粒体DNA ATPase6基因表达的调节
张莹, 别平, 石承先, 任娟娟
- 2343 人肝癌细胞系HepG2与HepG2.2.15差异HLA结合肽的分离与鉴定
陈黎, 谢兴旺, 张恒辉, 费然, 丛旭, 魏来, 陈红松
- 2349 整合素 $\alpha 6$ 在肝细胞癌黏附过程中诱导PI3K及MAPK双信号传导通路
乔世峰, 朱理玮
- 2354 姜黄素对缺氧HepG2细胞中HIF-1 α 表达的影响及可能机制
侯伟, 覃华, 刘爽, 王颖, 刘南植, 赵秋, 田德安
- 2359 Genistein对TGF- $\beta 1$ 诱导人胰腺癌细胞上皮-间质转化的作用
韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛

临 床 研 究

- 2364 COX-2基因多态性及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的相关性
朱克祥, 李玉民, 李汛, 石斌, 周文策, 单勇, 刘涛, 何雯婷, 俸铁兰
- 2371 结肠癌组织中CASP9的表达及其多态性
何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 娄毅, 李建华
- 2376 黄芩苷对错配修复基因缺失LoVo细胞的抑制作用及其机制
杨柏霖, 刘飞, 谷云飞, 金黑鹰, 刘秀芳

文 献 综 述

- 2381 低氧微环境与胃癌
郭花, 朱金水
- 2385 Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和问题
王石林, 顾国利
- 2390 炎症性肠病与肿瘤坏死因子基因多态性的研究进展
周国胜, 吴正祥

研 究 快 报

- 2395 人BRAF野生型及V600E突变型真核表达载体的构建及表达
程张军, 石欣, 汤永辉, 高乃荣

临 床 经 验

- 2399 食管鳞状细胞癌中PTTG和bFGF的表达与临床病理因素的关系
林称意, 郭家龙, 左顺庆, 张军, 谢斌生
- 2404 胃癌淋巴结转移灶与原发灶P-糖蛋白的表达及意义
李勇莉, 李红军, 张敏, 高建凯, 高福莲
- 2408 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的动态变化及其与预后的关系
时红波, 陈煜, 韩大康, 赵军, 武志明, 段钟平
- 2412 基于常规实验室检查的肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者住院期间死亡预测模型的建立
方念, 张焜和, 张慧卿, 谭新颖, 朱莹, 吕农华
- 2417 GADD45 β 在肝癌中的异常表达
杨娟, 杨玉秀, 韩双印, 白阳秋, 张立达
- 2423 肝癌射频消融后针道出血防治21例
翟博, 徐爱民, 盛月红, 刘晟, 李晓燕, 陈夷
- 2428 胰蛋白酶原基因新突变胰腺炎患者的临床分子生物学特征

	郇峰, 肖肖, 庄则豪, 刘奇才 2431 胶囊内镜在健康人群中的应用价值 陈孝, 张子其, 张钰 2435 直肠癌经直肠彩色及能量多普勒超声参数与TNM分期的相关性 于英蛟, 李雁平, 杨志伟, 王学梅 2439 Dixon术中肠腔封闭式加压灌注检测吻合口的临床意义 戴东, 宫爱民, 颜文贞, 李明意, 谭小宇	
致 谢	2442 致谢世界华人消化杂志编委	
消 息	2332 世界华人消化杂志英文摘要要求 2336 世界华人消化杂志标点符号用法 2342 世界华人消化杂志参考文献要求 2348 世界华人消化杂志名词术语标准 2353 世界华人消化杂志计量单位标准 2358 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策 2370 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 2375 世界华人消化杂志正文要求 2380 世界华人消化杂外文字符标准 2389 世界华人消化杂志修回稿须知 2394 世界华人消化杂志作者署名要求 2403 世界华人消化杂志中文摘要要求 2407 世界华人消化杂志投稿方式 2416 世界华人消化杂志被收录情况 2430 世界华人消化杂志网络版的发表前链接 2434 世界华人消化杂志数字用法标准 2438 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标	
封面故事	韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛. Genistein对TGF-β1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质样转化的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2359-2363 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2359.asp	
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生	
世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-07-28 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心 编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录. 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换. 2008年版权归世界华人消化杂志所有		
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050 www.wjgnet.com		

World Chinese Journal of Digestology

July 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 21

EDITORIAL	2321 Influence of metabolic syndrome on the response of chronic hepatitis C to anti-viral therapy and its possible mechanism <i>Li YR, Fan XL</i>
BASIC RESEARCH	2325 Effects of N-cadherin expression on the invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma <i>Li K, Wang X, He W, Lin N, Fan QX</i> 2333 Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of single-chain variable region of antibody against human gastric cancer <i>Yang LJ, Hou YC, Bai YJ, Yao LB, Su CZ</i> 2337 Effects of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 on the expression of mitochondrial DNA ATPase6 genes during cold preservation and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation <i>Zhang Y, Bie P, Shi CX, Ren JJ</i> 2343 Identification of differential HLA-binding peptide between two hepatoma cell lines HepG2 and HepG2.2.15 <i>Chen L, Xie XW, Zhang HH, Fei R, Cong X, Wei L, Chen HS</i> 2349 Integrin $\alpha 6$ induces PI3K and MAPK signal pathway in the adhesion of hepatocellular carcinoma <i>Qiao SF, Zhu LW</i> 2354 Effect of curcumin on hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in hepatocellular carcinoma cells HepG2 under hypoxia and its possible mechanism <i>Hou W, Qin H, Liu S, Wang Y, Liu NZ, Zhao Q, Tian DA</i> 2359 Effect of Genistein on epithelial-mesenchymal transdifferentiation induced by transforming growth factor-$\beta 1$ in human pancreatic cancer cell line Panc-1 <i>Han L, Guo KJ, Zhou WP, Chen XT</i>
CLINICAL RESEARCH	2364 Association of COX-2 genetic polymorphisms and <i>H pylori</i> infection with gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu Province in China <i>Zhu KX, Li YM, Li X, Shi B, Zhou WC, Shan Y, Liu T, He WT, Feng TL</i> 2371 Expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in colon cancer <i>He XM, Wang LL, Fang CQ, Liu SL, Lou Y, Li JH</i> 2376 Inhibitory effect of baicalein on colonic LoVo cell line with deficiency of mismatch repair gene <i>in vitro</i> <i>Yang BL, Liu F, Gu YF, Jin HY, Liu XF</i>
REVIEW	2381 Hypoxia environment and gastric cancer <i>Guo H, Zhu JS</i> 2385 Present status and related problems in diagnoses and treatments for Peutz-Jeghers syndrome <i>Wang SL, Gu GL</i> 2390 Advance in the relationship between inflammatory bowel disease and tumor necrosis factor polymorphisms <i>Zhou GS, Wu ZX</i>
RAPID COMMUNICATION	2395 Construction and expression of eukaryotic expression vector for human wild-type and V600E mutant BRAF gene <i>Cheng ZJ, Shi X, Tang YH, Gao NR</i>
CLINICAL PRACTICE	2399 Correlation of pituitary tumor transforming gene and basic fibroblast growth factor expression with clinicopathologic factors in esophageal squamous cell carcinoma <i>Lin CY, Guo JL, Zuo SQ, Zhang J, Xie BS</i> 2404 Expression of P-glycoprotein and its significance in metastatic lymph nodes and primary lesions of gastric carcinoma <i>Li YL, Li HJ, Zhang M, Gao JK, Gao FL</i>

	2408 Dynamic changes of serum fibrosis indices and alpha fetoprotein and their relations with prognosis of patients with severe hepatitis <i>Shi HB, Chen Y, Han DK, Zhao J, Wu ZM, Duan ZP</i> 2412 Predictive model of death for hospitalized patients with esophageal varices bleeding due to liver cirrhosis based on routine laboratory results <i>Fang N, Zhang KH, Zhang HQ, Tan XY, Zhu X, Lv NH</i> 2417 Abnormal expression of growth arrest and DNA-damage inducible gene β in hepatocellular carcinoma <i>Yang J, Yang YX, Han SY, Bai YQ, Zhang LD</i> 2423 Prevention and treatment of needle-tract bleeding after percutaneous radiofrequency ablation for liver cancer: an analysis of 21 cases <i>Zhai B, Xu AM, Sheng YH, Liu S, Li XY, Chen Y</i> 2428 Clinical and molecular characteristics of pancreatitis patients with novel mutation of protease serine 1 gene <i>Gao F, Xiao X, Zhuang ZH, Liu QC</i> 2431 Initial experience of capsule endoscopy among healthy individuals <i>Chen X, Zhang ZQ, Zhang Y</i> 2435 Relationship between Transrectal color and power Doppler ultrasonography quantification and TNM staging in rectal cancer <i>Yu YJ, Li YP, Yang ZW, Wang XM</i> 2439 Clinical significance of closed lumen pressurized perfusion in Dixon operation in detecting anastomotic leakage <i>Dai D, Gong AM, Yan WZ, Li MY, Tan XY</i>
ACKNOWLEDGMENT	2442 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Han L, Guo KJ, Zhou WP, Chen XT.</i> Effect of Genistein on epithelial-mesenchymal transdifferentiation induced by transforming growth factor-β1 in human pancreatic cancer cell line Panc-1. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(21): 2359-2363 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2359.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</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 July 28, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 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*

宿主的代谢综合征对慢性丙型肝炎抗病毒治疗的影响及可能机制

李蕴铷, 范小玲

李蕴铷, 范小玲, 北京地坛医院 北京市 100011
范小玲, 主任医师, 教授, 主要从事病毒性肝炎合并糖尿病的临床研究.
作者贡献分布: 范小玲负责本文的构思立意及文章审核; 李蕴铷负责收集参考文献, 整理书写.
通讯作者: 范小玲, 100011, 北京市, 北京地坛医院.
fanxl2001@yahoo.com
电话: 010-64211031-2457
收稿日期: 2008-05-20 修回日期: 2008-07-03
接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-07-28

Influence of metabolic syndrome on the response of chronic hepatitis C to anti-viral therapy and its possible mechanism

Yun-Ru Li, Xiao-Ling Fan

Yun-Ru Li, Xiao-Ling Fan, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Correspondence to: Xiao-Ling Fan, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. fanxl2001@yahoo.com
Received: 2008-05-20 Revised: 2008-07-03
Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-07-28

Abstract

Genotype and viral load have been found as the most important viral factors influencing anti-viral response. Host factors include metabolic syndrome such as diabetes type 2, hepatocyte steatosis, and insulin resistance. Diabetes type 2 decreases the sustained response to interferon α , and hepatocyte steatosis impairs the sustained response rate in patients with HCV genotype 1, but not in genotype 3. Insulin resistance emerges as the most important host factors in the prediction of response in chronic hepatitis C patients with interferon plus ribavirin. Most studies showed that insulin resistance may induce interferon resistance by blocking intracellular signal pathway of interferon.

Key Words: Chronic hepatitis C; Type 2 diabetes; Hepatocyte steatosis; Insulin resistance; Interferon α

Li YR, Fan XL. Influence of metabolic syndrome on the response of chronic hepatitis C to anti-viral therapy and

its possible mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(21): 2321-2324

摘要

病毒性肝炎宿主的因素是影响抗病毒疗效重要的一方面, 近年来随着代谢因素与病毒性肝炎关系研究日益深入, 其对抗病毒应答影响受到重视, 大多研究认为2型糖尿病会削弱丙型肝炎 α 干扰素的疗效; 而肝脂肪变因丙型肝炎病毒的基因型不同对干扰素疗效影响不一, 肝脂肪变会降低基因1型丙型肝炎的干扰素的应答率, 但对基因3型无影响; 胰岛素抵抗可能是预测丙型肝炎干扰素疗效最重要的代谢因素, 大多认为会降低干扰素应答率, 其影响机制可能与胰岛素信号传导蛋白影响干扰素信号传导通路有关.

关键词: 慢性丙型肝炎; 2型糖尿病; 肝脂肪变; 胰岛素抵抗; α 干扰素

李蕴铷, 范小玲. 宿主的代谢综合征对慢性丙型肝炎抗病毒治疗的影响及可能机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2321-2324

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2321.asp>

0 引言

抗病毒治疗是病毒性肝炎治疗中最重要的一环, 影响药物疗效的因素包括病毒和宿主, 病毒因素包括病毒载量和基因型, 而宿主因素研究最多的是宿主的免疫功能和肝纤维化程度等, 近年来宿主的代谢因素, 特别是代谢综合征对抗病毒疗效的影响越来越受到人们的关注, 特别是随着慢性病毒性肝炎与代谢综合征的关系的深入研究, 某些代谢异常可能与抗病毒药物, 特别是 α 干扰素的病毒学应答有关, 了解这些因素之间的相关性对预测和提高抗病毒疗效有积极的临床意义.

1 2型糖尿病对抗病毒疗效的影响

临床流行病学资料研究提示慢性HCV、HBV感

■背景资料

聚乙二醇干扰素联合利巴韦林是目前国际上标准的抗丙肝病毒治疗方案, 但仍有一部分患者不能获得持续应答, 既往对丙型肝炎抗病毒的预测多集中于病毒本身, 如病毒基因型、病毒载量等, 近年来对宿主的因素也越来越受到关注, 特别是宿主的代谢因素, 包括糖尿病、脂肪肝、肥胖症等, 都对丙型肝炎的抗病毒疗效产生影响, 但究竟产生什么影响, 产生这些影响的机制如何尚需进一步探讨.

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院消化科

■研发前沿

目前国内外对丙型肝炎对代谢综合征发生和发展的影响研究较为明确,但代谢综合征对丙型肝炎的抗病毒影响的诸多研究还存在矛盾。

染者较普通人群糖尿病发病率更高,国外学者调查慢性丙型肝炎合并糖尿病发病率为12.6%,明显高于对照人群的7.6%;国内报道慢性丙型肝炎合并糖尿病的发病率更是高达32%。Imazeki *et al*^[1]对952门诊肝炎患者进行了研究,其中包括544慢性乙型肝炎,286例慢性丙型肝炎和122例抗病毒治疗后病毒清除的慢性丙型肝炎,结果显示三组糖尿病的发生率分别为6.3%、13.6%和9.0%;胰岛素抵抗的发生率分别为36.3%、54.3%和35.7%,显示慢性丙型肝炎组明显高于其他两组。目前大多数学者认为糖代谢异常者对于干扰素的抗病毒疗效不利, Romero-Gómez *et al*^[2]总结1059例应用干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者,其中血糖正常者734例,空腹血糖受损者218例,2型糖尿病患者107例,结果在空腹血糖受损和2型糖尿病患者中获得持续应答者明显低于血糖正常者(分别为44%、58.8%);在对血糖正常患者跟踪随访中发现获得持续应答者11.4%发生血糖升高,而在无应答患者中血糖升高者达24.3%。另一项研究对178例未治疗的慢性丙型肝炎应用干扰素联合利巴韦林治疗,结果显示获得持续应答和无应答的患者血糖升高分别未24.24%和44.14%,多元回归分析显示基因型、 γ -GT和异常血糖是获得持续应答的独立因素^[3]。

至于糖尿病患者合并慢性丙型肝炎的抗病毒疗效受到影响的机制不明,考虑可能是糖尿病患者合并胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗也可影响干扰素的疗效,所以可能糖尿病影响疗效机制与胰岛素抵抗对干扰素的影响机制一致。但也有学者认为糖尿病患者的免疫机制受到损害,从而影响干扰素的作用机制, Summers *et al*^[4]报道糖尿病患者的树突状细胞产生干扰素的能力下降,这种干扰素的水平降低会影响T细胞介导的免疫反应,从而影响病毒的清除。

2 肝脂肪变对抗病毒疗效的影响

肝脂肪变作为脂代谢异常的一部分在临床中越来越常见,一方面由于生活方式的原因,脂肪肝发病率也逐年升高,另一方面慢性乙、丙型肝炎本身也可以诱发肝脂肪变。特别是丙型肝炎与脂代谢的关系目前研究较多,从慢性丙型肝炎患者的肝脏活检病理特点来看,肝脏脂肪变是其一个重要的病理学特征。Castéra^[5]对于558例慢性丙肝患者进行分析,发现54%慢性丙肝合并脂肪肝,是肝纤维化的独立相关因素。Jármay *et al*^[6]对于114例慢性丙肝患者进行分析,约74%

慢性丙肝合并脂肪肝,合并脂肪肝的患者血清总胆固醇、甘油三酯水平显著升高。

既然肝脂肪变与病毒性肝炎关系如此密切,推测其对病毒性肝炎的抗病毒疗效也可能会产生一定的影响, Cindoruk *et al*^[7]对140例慢性乙型肝炎(42例HBeAg阳性和98例HBeAg阴性)应用聚乙二醇干扰素单独或联合拉米夫定治疗,结果显示获得持续应答者中合并脂肪肝和无脂肪变者的比例相似,提示肝脏的脂肪变对于慢性乙型肝炎的抗病毒治疗没有影响。

但对于慢性丙型肝炎则有争议,一项对儿童慢性丙肝合并脂肪肝的研究发现,合并脂肪肝的患儿肝纤维化更重,且对干扰素的应答率较低。合并脂肪肝的持续应答率为23%,而无脂肪变的患者的持续应答率可达53%^[8]。Soresi *et al*^[9]报道112例慢性丙型肝炎患者(其中64.3%合并肝脂肪变)应用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗,获得SVR为41.1%,其中对于72例合并脂肪变的患者SVR仅33.3%,明显低于无肝脂肪变者(55%),提示肝脂肪变会削弱干扰素的长期疗效。但也有研究认为肝脂肪变对干扰素疗效影响不大, Hu *et al*^[10]对美国退伍军人的多中心临床研究发现:357例慢性丙型肝炎中51.5%合并脂肪肝,33.3%存在III-IV的肝纤维化,经过校正,统计学分析显示只有脂肪变程度与肝纤维化程度成正相关,影响病毒学应答的独立因素只有HCV的基因型,而与肝脂肪变、肝纤维化无关。Hung *et al*^[11]临床研究也显示肝脂肪变的发生和严重程度与干扰素的持续应答无关,脂肪肝的指标与体重指数和肝纤维化相关,而与肝脏的HAI指数无关。

进一步研究显示肝脂肪变对不同基因型丙型肝炎抗病毒治疗影响不一,由于HCV基因3型会引发与体质量指数无关的脂肪变性,其与肝脏脂肪变性相关较为密切,也可以说肝脏的脂肪变性主要是HCV基因3型病毒引发的,而非基因3型丙型肝炎并发的肝脂肪变与宿主的胰岛素抵抗有关^[12]。因此理论上讲,对于基因3型的慢性丙型肝炎患者,成功的抗病毒治疗可伴以肝脂肪变的消失或显著改善。Westin *et al*^[13]对231例应用聚乙二醇干扰素和利巴韦林联合治疗的慢性丙型肝炎患者进行了研究,结果发现:肝脂肪变对于基因3型以及非基因3型患者的早期病毒载量降低均有不利影响,但只对非基因3型患者的持续病毒应答有不利影响。所以,对于

■相关报道

Romero-Gómez于2006年详细的阐述了胰岛素抵抗与丙型肝炎的关系,并对抗病毒治疗的影响进行回顾。

非基因3型合并肝脂肪变的慢性丙型肝炎患者, 在抗病毒治疗前可给予减轻肝脂肪变的措施可能会提高抗病毒治疗的持续应答率, Romano *et al*^[14]应用卡尼丁(具有降脂作用)联合干扰素和利巴韦林治疗70慢性丙型肝炎患者, 显示治疗结束时生化指标(ALT、AST、GGT)和代谢指标(TG、CHO)都明显改善, 且抗病毒结束时应答率和持续应答率都高于干扰素联合利巴韦林治疗组, 提示在抗病毒治疗的同时合并应用降血脂药物可能会提高抗病毒的应答率. 而对于基因3型患者则应尽早直接给予抗病毒治疗, Castéra *et al*^[15]研究结果表明基因3型慢性丙型肝炎患者获得持续病毒学应答者肝脂肪变显著改善, 基因3型患者发生持续病毒学应答者肝脂肪变的改善率显著高于无应答者, 而非基因3型患者发生持续病毒学应答者和无应答者比较, 肝脂肪变的改善率差异无显著性. 因此, 对于基因3型的慢性丙型肝炎患者, 成功的抗病毒治疗可伴以肝脂肪变的消失或显著改善, 而理论上讲非基因3型慢性丙肝可在抗病毒前或同时应用降血脂药物治疗以提高持续应答率, 但临床实际疗效尚需进一步验证.

3 胰岛素抵抗和抗病毒关系

既往研究发现在注射 α 干扰素第一针就可以看到胰岛素抵抗的发生, 在第2周达到最高峰, 研究者认为可能是因为 α 干扰素可诱导促炎症因子, 影响了肝细胞的葡萄糖吸收, 但这种状态是短暂的, 因为在注射 α 干扰素的第12、24周时情况发现, 对于 α 干扰素治疗没有应答的患者, 胰岛素抵抗仍然存在, 而对于获得应答者, 胰岛素抵抗大多消失, 对于治疗结束的患者, 如果再次出现HCV RNA复发, 则胰岛素抵抗也多半随之发生, 这更有力的证明了HCV与胰岛素抵抗的密切关系.

影响 α 干扰素抗病毒的疗效的因素很多, 对于病毒而言, 基因型和病毒的负荷是影响疗效最重要的因素; 而对于宿主而言, 则因素较多, 包括HLA、体质量指数、肝脂肪变、人种、肝纤维化和代谢综合征. 如前所述, 基因1型的慢性丙型肝炎的肝脂肪变影响 α 干扰素疗效, 但基因3型肝脂肪变对 α 干扰素疗效无明显影响. 对于基因1型, 获得持续疗效者中的32%患者的HOMA指数小于2, 而无应答者中60%的患者HOMA指数大于2, 提示胰岛素抵抗和干扰素应答密切相关^[16], 但对331例无糖尿病的基因1型

慢性丙型肝炎应用 α 干扰素治疗, 结果发现是肝脂肪变而非胰岛素抵抗是影响干扰素的独立因素^[17]. 究竟是肝脂肪变还是胰岛素抵抗是预测疗效的独立因素尚不清楚, 同时也说明二者的密切程度, 有学者认为由于HOMA指数的计算更为简便, 而肝脂肪变则需要进行肝活检, 具有一定风险, 所以对于基因1型慢性丙型肝炎是否可以用HOMA指数而非脂肪肝来作为预测干扰素疗效尚待进一步临床研究.

另外Persico *et al*也从宿主代谢因素的角度解释为何基因1型HCV比2型对干扰素应答差, 对198例HCV感染者应用干扰素治疗, 结果发现在无应答者中代谢综合征者、基因1型患者和SOCS3的表达密切相关, 单变量分析显示基因型、年龄、代谢综合征和SOCS3表达量与治疗应答相关, 但多因素分析显示只有SOCS3表达量是独立因素, 因此研究者认为, 基因1型之所以疗效差是因为基因型1诱发了SOCS3表达, 而SOCS3降低了应答率, 因此认为SOCS3从本质上影响干扰素疗效^[18]. Walsh *et al*^[19]也报道了145例慢性丙型肝炎应用干扰素治疗, 基因1型无应答者与SOCS3表达有关.

胰岛素抵抗降低 α 干扰素应答的机制还不明了. α 干扰素和细胞表面受体结合后, 激活了Jak1和Tyk2, 进而激活STAT, 激活的STAT转运到核内, 在那里结合干扰素 α 2刺激因子. 最近研究发现, 在利用Hu7细胞制备HCV复制子中, 加入 α 干扰素可阻断HCV的复制, 但同时加入胰岛素后, 干扰素的这种抗病毒作用消失, 进一步研究发现胰岛素是通过PI3K和SOCS3来干扰干扰素的作用.

关于慢性丙型肝炎患者应用 α 干扰素抗病毒治疗对胰岛素抵抗的影响报道不一, Kawaguchi *et al*^[20]报道认为通过抗病毒治疗后, 无应答者慢性丙型肝炎患者的HOMA指数无变化, 而对于取得持续疗效的患者, 患者的HOMA指数明显下降, 胰岛素受体1、2表达也明显恢复. 但Mello *et al*^[21]对30例HCV感染合并2型糖尿病患者应用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗6 mo, 无论患者有无应答, HOMA指数差异均无显著性. 而法国跟踪报道1例2000年诊断为糖尿病的40岁患者, 2002年开始应用胰岛素治疗, 2003年诊断为慢性丙型肝炎, 应用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗, 治疗前HbA1c为7.7%, 治疗20 wk时, 因反复出现低血糖停用胰岛素治疗, 24 wk时检测HCV RNA仍阳性, 治疗为无应答, 随

■创新盘点

本文就干扰素抗丙型肝炎病毒的疗效与代谢综合征的各个指标, 如糖尿病、肝脂肪变、胰岛素抵抗等关系进行了详细的评述, 特别对胰岛素抵抗对干扰素疗效的影响及其影响的机制进行了深入的阐述, 为人们在应用干扰素抗丙肝病毒的预测时提供有价值的临床依据.

■同行评价

本文综述宿主的代谢综合征对慢性丙型肝炎抗病毒治疗的影响及可能的机制,选题新颖,学术价值较高,对指导临床医生抗病毒治疗有一定的意义。

停止治疗,但患者HbA1c转为正常4.7%,空腹血糖正常。研究者认为,即便 α 干扰素未获得持续疗效,也有患者的胰岛素抵抗状态好转,具体机制不明^[22]。

目前,宿主的代谢因素,特别是代谢综合征与病毒性肝炎的抗病毒疗效的关系研究才刚刚开始,有些研究结果之间存在矛盾,提示还需要更深入的研究来揭示二者的关系,包括等级更高的循证医学和更有说服力的分子生物学的支持。进一步阐明二者的关系,将为慢性肝炎患者制定抗病毒方案提供相关的理论和临床实践依据,从而有助于临床上对病毒性肝炎进行更合理有效的治疗。

4 参考文献

- 1 Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. *Liver Int* 2008; 28: 355-362
- 2 Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, Planas R, Solá R, Pons JA, Salmerón J, Barcena R, Perez R, Carmona I, Durán S. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 48: 721-727
- 3 Lecube A, Hernández C, Simó R, Esteban JI, Genesca J. Glucose abnormalities are an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2189-2195
- 4 Summers KL, Marleau AM, Mahon JL, McManus R, Hramiak I, Singh B. Reduced IFN- α secretion by blood dendritic cells in human diabetes. *Clin Immunol* 2006; 121: 81-89
- 5 Castéra L. Steatosis, insulin resistance and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006; 52: 125-134
- 6 Jármy K, Karácsony G, Nagy A, Schaff Z. Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6422-6428
- 7 Cindoruk M, Karakan T, Unal S. Hepatic steatosis has no impact on the outcome of treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 513-517
- 8 Giannattasio A, Spagnuolo MI, Sepe A, Valerio G, Vecchione R, Vegnente A, Iorio R. Is HCV infection associated with liver steatosis also in children? *J Hepatol* 2006; 45: 350-354
- 9 Soresi M, Tripi S, Franco V, Giannitrapani L, Alessandri A, Rappa F, Vuturo O, Montalto G. Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1119-1125
- 10 Hu KQ, Currie SL, Shen H, Cheung RC, Ho SB, Bini EJ, McCracken JD, Morgan T, Bräu N, Schmidt WN, Jeffers L, Wright TL. VA HCV-001 Study Group. Clinical implications of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C: a multicenter study of U.S. veterans. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 570-578
- 11 Hung CH, Kuo FY, Wang JH, Lu SN, Hu TH, Chen CH, Lee CM, Eng HL. Impact of steatosis on long-term histological outcome in chronic hepatitis C after antiviral therapy. *Antivir Ther* 2006; 11: 483-489
- 12 Cortez-Pinto H. Concluding remarks: metabolic syndrome, liver and HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 83-85
- 13 Westin J, Lagging M, Dhillon AP, Norkrans G, Romero AI, Pawlowsky JM, Zeuzem S, Schalm SW, Verheij-Hart E, Negro F, Missale G, Neumann AU, Hellstrand K. Impact of hepatic steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 29-35
- 14 Romano M, Vacante M, Cristaldi E, Colonna V, Gargante MP, Cammalleri L, Malaguarnera M. L-carnitine treatment reduces steatosis in patients with chronic hepatitis C treated with alpha-interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1114-1121
- 15 Castéra L, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Zafrani ES, Pawlowsky JM, Dhumeaux D. Effect of antiviral treatment on evolution of liver steatosis in patients with chronic hepatitis C: indirect evidence of a role of hepatitis C virus genotype 3 in steatosis. *Gut* 2004; 53: 420-424
- 16 Romero-Gomez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernandez-Rodriguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vazquez L, Munoz-De-Rueda P, Lopez-Serrano P, Gila A, Gutierrez ML, Perez C, Ruiz-Extremera A, Suarez E, Castillo J. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-641
- 17 D'Souza R, Sabin CA, Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1509-1515
- 18 Persico M, Capasso M, Persico E, Svelto M, Russo R, Spano D, Crocè L, La Mura V, Moschella F, Masutti F, Torella R, Tiribelli C, Iolascon A. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression and hepatitis C virus-related chronic hepatitis: Insulin resistance and response to antiviral therapy. *Hepatology* 2007; 46: 1009-1015
- 19 Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, Lipka GM, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut* 2006; 55: 529-535
- 20 Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 570-576
- 21 Mello V, Cruz T, Nuñez G, Simões MT, Ney-Oliveira F, Braga H, Araújo C, Cunha S, Schinoni MI, Cruz M, Parana R. Peripheral insulin resistance during treatment of chronic hepatitis C with pegylated interferon plus ribavirin. *J Med Virol* 2006; 78: 1406-1410
- 22 Tahrani A, Bowler L, Singh P, Coates P. Resolution of diabetes in type 2 diabetic patient treated with IFN- α and ribavirin for hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 291-293

神经型钙黏附蛋白的表达对食管鳞癌侵袭和转移的影响

李克, 王鑫, 何伟, 林娜, 樊青霞

李克, 王鑫, 何伟, 林娜, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

李克, 郑州大学第一附属医院在读博士, 讲师, 主要从事恶性肿瘤的综合治疗研究。

河南省科技厅科技攻关资助项目, No. 072102310054

作者贡献分布: 李克与樊青霞对此文所作贡献均等; 此课题由樊青霞与李克设计; 研究过程由李克, 王鑫, 何伟, 林娜及樊青霞操作完成; 数据分析由李克, 王鑫及何伟完成; 本论文写作由李克与樊青霞完成。

通讯作者: 樊青霞, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. fqx2243@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-20 修回日期: 2008-05-22

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-28

Effects of N-cadherin expression on the invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma

Ke Li, Xin Wang, Wei He, Na Lin, Qing-Xia Fan

Ke Li, Xin Wang, Wei He, Na Lin, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of Science and Technology Committee of Henan Province, No. 072102310054

Correspondence to: Professor Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2008-04-20 Revised: 2008-05-22

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between N-cadherin expression and clinicopathological significance in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to investigate the invasive ability change of EC9706 cells after N-cadherin gene was silenced by RNA interference (RNAi) technique.

METHODS: PV immunohistochemical method and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of N-cadherin in 62 cases of normal esophageal epithelia, 31 cases of adjacent atypical hyperplasia and 62 cases of ESCC at protein and mRNA level, respectively. N-cadherin siRNA was transfected into EC9706 cells to inhibit

the expression of N-cadherin. The effect of RNAi was detected by RT-PCR and Western blot. The invasive ability of EC9706 cells was determined by Transwell assay.

RESULTS: The expression of N-cadherin protein increased by turns in normal esophageal epithelia, adjacent atypical hyperplasia and carcinoma specimens, which was 29.0% (18/62), 61.3% (19/31), and 75.8% (47/62), respectively. There was a significant difference among the groups ($P < 0.05$). N-cadherin protein expression was related with the invasion, differentiation, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of N-cadherin mRNA in ESCC was significantly higher than that in atypical hyperplasia and normal esophageal mucosa (0.6631 ± 0.0162 vs 0.4613 ± 0.0239 , 0.1538 ± 0.0192 ; $\chi^2 = 819.242$, $P < 0.01$). N-cadherin mRNA expression was related with the differentiation, infiltration depth, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). After RNAi, the expression of N-cadherin was significantly decreased in EC9706 cells, and the cell invasive ability was also markedly decreased.

CONCLUSION: High-level expression of N-cadherin has a close relationship with the invasion and metastasis of ESCC. RNAi-induced down-regulation of N-cadherin may impair the invasive ability of EC9706 cells.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; RNA interference; N-cadherin; EC9706 cell

Li K, Wang X, He W, Lin N, Fan QX. Effects of N-cadherin expression on the invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2325-2332

摘要

目的: 探讨神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)在食管鳞癌组织中的表达及其临床病理意义, 以及RNA干扰(RNAi)沉默N-cadherin基因表达对人食管癌细胞系EC9706体外侵袭能力的影响。

方法: 采用免疫组织化学PV法和RT-PCR检测62例食管鳞癌组织、31例癌旁不典型增生

■背景资料

钙黏附分子家族(cadherin family)和肿瘤的侵袭转移密切相关, 其中以上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)和神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)分布最广泛。国内外已有许多研究表明食管鳞癌的浸润转移与E-cadherin的低表达或不表达有关。最近研究表明, 在前列腺癌、乳腺癌中N-cadherin表达增多, 并且在引起肿瘤浸润转移方面有着比E-cadherin减少更为重要的作用。

■同行评议者

李璇, 教授, 广西肿瘤研究所; 陈公琰, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内一科

■ 研发前沿

关于N-cadherin介导的肿瘤细胞浸润、转移的具体机制已成为研究的热点。

组织及62例正常食管黏膜组织中N-cadherin蛋白和mRNA的表达。将N-cadherin基因的RNA干扰载体稳定转染至EC9706,通过RT-PCR和Western blotting检测RNAi的效果;运用Transwell体外侵袭实验检测RNAi后细胞侵袭能力的改变。

结果: 正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中N-cadherin的阳性表达率依次升高,分别为29.0%(18/62)、61.3%(19/31)、75.8%(47/62),组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); N-cadherin蛋白的阳性表达率与食管鳞癌的浸润深度、分化程度及淋巴结转移密切相关($\chi^2 = 6.916, 6.924, 4.486, P < 0.05$)。食管鳞状细胞癌组织中N-cadherin mRNA的相对含量高于癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织(0.6631 ± 0.0162 vs $0.4613 \pm 0.0239, 0.1538 \pm 0.0192$),组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 819.242, P < 0.01$)。RNAi后EC9706中N-cadherin的表达显著下降;Transwell小室体外侵袭实验显示,EC9706的体外侵袭能力也降低。

结论: 食管鳞癌组织中N-cadherin的高表达与食管鳞癌的浸润、恶化有密切的关系。RNAi沉默N-cadherin基因表达能够使EC9706体外侵袭能力降低。

关键词: 食管鳞癌; RNA干扰; 神经性钙黏附蛋白; EC9706细胞

李克, 王鑫, 何炜, 林娜, 樊青霞. 神经型钙黏附蛋白的表达对食管鳞癌侵袭和转移的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2325-2332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2325.asp>

0 引言

恶性肿瘤的侵袭和转移严重威胁着患者的生命。钙黏附分子家族(cadherin family)和肿瘤的侵袭和转移密切相关,其中以上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)和神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)分布最广泛。国内外已有许多研究表明食管鳞癌的浸润转移与E-cadherin的低表达或不表达有关^[1-2]。最近研究表明,在前列腺癌、乳腺癌中N-cadherin表达增多,并且在引起肿瘤浸润转移方面有着比E-cadherin减少更为重要的作用^[3-4]。N-cadherin对于肿瘤上皮细胞及表达N-cadherin的血管平滑肌细胞和外皮细胞之间的黏附起着重要的作用。在肿瘤形成的过程中, N-cadherin的表达有助于血管形成及上皮细胞-间质细胞的

迁移,从而使肿瘤细胞更加富于侵袭性,易于转移^[5]。

鉴于上述,本研究首先对食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中N-cadherin蛋白和mRNA的表达进行检测,分析其与食管鳞癌临床诸病理因素的关系,然后运用RNA干扰技术,从RNA水平降低N-cadherin基因在人食管癌细胞系EC9706中的表达,以观察N-cadherin基因表达下调对食管癌细胞系EC9706侵袭能力的影响,从而为食管癌侵袭机制的研究提供新的思路,并为其临床治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 pEGFP-MSCVneo质粒和pMSCVneo/N-cadherin质粒(由协和医科大学马杰博士馈赠)。pEGFP-MSCVneo质粒大小7.2 kb,内含增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因序列和多克隆位点,在细胞内表达后可发出绿色荧光。原核细胞中的筛选标记为氨苄青霉素,真核细胞中为新霉素。pMSCVneo/N-cadherin质粒大小为7.5 kb,内含EGFP基因序列、U6启动子序列和多克隆位点等。人食管癌细胞株EC9706由中科院提供。DH5 α 菌株(由郑州大学医学院重点分子医学实验室侯卫红博士馈赠)。RNA提取试剂盒(美国Qiagen公司); RevertTM First Stand cDNA Synthesis Kit(加拿大MBI Fermentas公司); PCR试剂盒(上海生物工程公司); N-cadherin一抗(鼠抗人mAb, 美国Abcam公司); Matrigel matrix(美国BD公司); 脂质体Lipofectamine2000(美国Invitrogen公司); 新霉素G418(美国Gibco-BRL公司); 标准核酸分子量参照物: 100 bp DNA Ladder Marker(大连TaKaRa公司); 内对照 β -actin引物、N-cadherin引物、MMP-9引物(上海生物工程公司); Transwell小室(美国Costar公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测N-cadherin蛋白在食管鳞癌组织中的表达: (1)标本及处理, 62例食管鳞癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自安阳市肿瘤医院。其中男36例,女26例,年龄38-75岁,所有病例均病理学诊断明确,且术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。(2)免疫组织化学染色, 62例标本分别取无坏死癌灶、癌旁组织(距癌灶3 cm以内)及远端(距癌灶5 cm以上)正常黏膜组织(经HE染色证实,癌旁组织中31例有不典型增

生), 经40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm . 62例均经组织学证实为鳞状细胞癌. 其中组织学分级 I 级15例, II级25例, III级22例; 伴淋巴结转移者20例, 无淋巴结转移者42例. 浸润黏膜下层或浅肌层者7例, 浸润深肌层或外膜层者55例. 浓缩型鼠抗人神经型钙黏附蛋白mAb, 工作浓度1:110; 第二步法免疫组化检测试剂(PV-9000); DAB显色增强剂. 染色方法严格参照免疫组化PV-9000试剂盒说明书进行操作, 以PBS液代替一抗作为阴性对照. (3)结果判断标准, 胞膜/胞质棕黄色染色为阳性, N-cadherin以胞质染色为主, 按着色强度和阳性细胞比例进行综合评分, 阳性比例30%以下为1分, 30%-60%为2分, 60%以上为3分, 着色程度: 无着色为0分(阴性), 浅黄色为1分(弱阳性), 棕黄色为2分(阳性), 棕褐色为3分(强阳性), 然后根据两者乘积的积分进行统计分析, 0-1分为阴性(-), 2-3分为弱阳性(+), ≥ 4 分为阳性(++)^[6]. (4)食管鳞癌组织中N-cadherin mRNA的RT-PCR检测, 取冰冻新鲜组织, 按试剂盒说明进行RT-PCR. 内对照 β -actin上游引物: 5'-CATCCTGCGTCTGGACCT-3'; 下游引物5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'; PCR产物480 bp, N-cadherin上游引物: 5'-CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG-3'; 下游引物5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'; PCR产物204 bp. 反应条件为: 94℃预变性5 min, 进入PCR循环: 95℃ 30 s, 62℃ 50 s, 72℃ 60 s, 35个循环后72℃延伸7 min. PCR产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察照相. 采用德国Kontron公司IBAS2.0真彩图像分析仪对条带灰度值进行扫描分析.

1.2.2 RNA干扰沉默N-cadherin基因在人食管癌细胞系EC9706中的表达及其对细胞体外侵袭能力的影响: (1)阳离子脂质体转染及抗性克隆的筛选和扩增. 将EC9706接种至6孔培养板中, 待其融合达90%-95%时, 用脂质体法对其进行转染(具体方法参照Lipofectamine™ 2000说明书). 转染共分4组: 正常对照组、脂质体组、pEGFP-MSCVneo质粒组(空载体组)、pMSCVneo/N-cadherin质粒组(干扰载体组). 选用G418进行抗性克隆的筛选和扩增, 初选浓度为600 mg/L(由预实验得出), 10-15 d后降为300 mg/L, 继续维持10-15 d. 转染后的细胞每隔3-4 d在荧光显微镜下488 nm波长处观察荧光. (2)RT-PCR检测EC9706转染前后N-cadherin mRNA的表达, 选用正常对照组、空载体组、干

扰载体组、乳腺癌细胞系435(阳性对照组)4组细胞, 按试剂盒说明进行RT-PCR. 内对照 β -actin上游引物: 5'-CATCCTGCGTCTGGACCT-3'; 下游引物5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'; PCR产物480 bp, N-cadherin上游引物: 5'-CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG-3'; 下游引物5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'; PCR产物204 bp. 反应条件为: 94℃预变性5 min, 进入PCR循环: 95℃ 30 s, 62℃ 50 s, 72℃ 60 s, 35个循环后72℃延伸7 min. PCR产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察照相. 采用德国Kontron公司IBAS2.0真彩图像分析仪对条带灰度值进行扫描分析. (3)Western blotting检测转染前后N-cadherin的蛋白表达, 分别取正常对照组、空载体组、干扰载体组、阳性对照组4组细胞消化、PBS洗涤后, 用如下裂解液提取细胞总蛋白: 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCL(pH值为7.6), 0.001mol/L EDTA(pH值为8.0), 1 mg/L Aprotinin, 100 mg/L苯甲基磺酰胺(PMSF), PMSF不稳定, 用前现加. PMSF通常配制成10或100 mmol/L浓度的储存液(1.74 g或者17.4 g/L溶于异丙醇中)保存于-20℃. 离心取上清, 用BCA试剂盒进行蛋白定量. 取等量蛋白60 μg 上样于120 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 再转移至硝酸纤维素膜, 膜于含5%脱脂奶粉的TBST中室温下封闭1 h, 加以封闭液稀释的N-cadherin兔抗人mAb(1:2000), 4℃过夜. 次日用TBST洗膜3 $\times$ 15 min, 加封闭液稀释的HRP标记的兔抗鼠IgG(1:500), 室温摇床温育1 h, TBST洗膜3 $\times$ 15 min, 加ECL试剂, 胶片(Kodak)曝光, 洗片. 采用德国Kontron公司IBAS2.0真彩图像分析仪对条带灰度值进行扫描分析. (4)RT-PCR检测EC9706转染前后MMP-9 mRNA的表达, 选用正常对照组、空载体组及干扰载体组3组细胞, 按试剂盒说明进行RT-PCR. 内对照 β -actin同上, MMP-9上游引物: 5'-TGGAGTCACTGTACACCCTC-3'; 下游引物5'-CGGACATCCGCTAAACAGGT-3'; PCR产物400 bp. 反应条件为: 94℃预变性5 min, 进入PCR循环: 95℃ 30 s, 58℃ 50 s, 72℃ 60 s, 35个循环后72℃延伸7 min. PCR产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察照相. 采用德国Kontron公司IBAS2.0真彩图像分析仪对条带灰度值进行扫描分析. (5)Transwell小室体外侵袭试验, 将冻存于-80℃冰箱的基质胶(matrigel)4℃过夜(24 h), 变成液态; 取300 μL 无血清培养基, 加入60 μL (或50 μg /室)Matrigel, 混匀, (4℃操作,

■相关报道

国内外研究表明, 前列腺癌、直肠癌、乳腺癌等N-cadherin基因表达量与肿瘤的侵袭力成正相关, N-cadherin基因可能通过MAPK-ERK等信号转导途径促进肿瘤细胞的浸润转移.

■创新亮点

本研究首次采用免疫组织化学PV法和RT-PCR检测了N-cadherin在食管鳞癌组织中的表达;在研究N-cadherin的作用机制时,首次采用了RNA干扰技术,通过降低N-cadherin在EC9706细胞中的表达来分析其对细胞侵袭力的影响。

表 1 食管鳞癌组织、非典型增生组织及正常食管黏膜组织中N-cadherin mRNA和蛋白表达

病理学参数	n	N-cadherin mRNA表达		χ^2	P	N-cadherin蛋白表达		χ^2	P
		+	相对含量			+	阳性率(%)		
正常黏膜上皮	62	21	0.1538 ± 0.0192	819.242	0.000	18	29.0	29.091	0.000
非典型增生	31	25	0.4613 ± 0.0239			19	61.3		
鳞癌	62	52	0.6631 ± 0.0162			47	75.8		

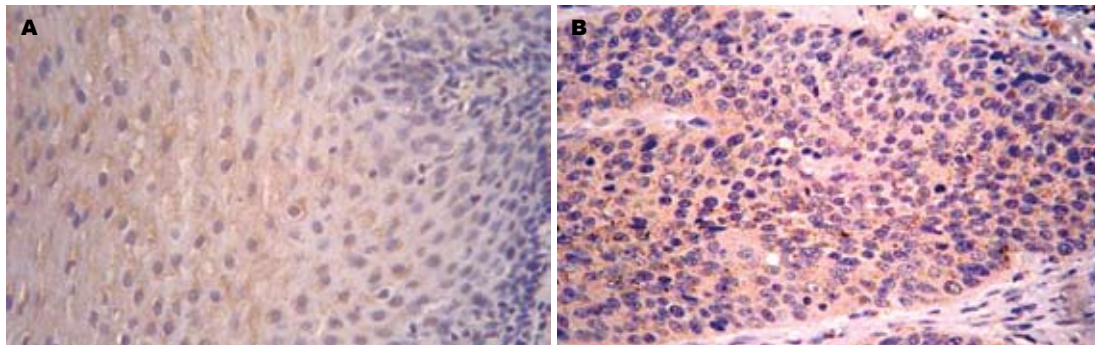


图 1 N-cadherin的表达(PV × 200). A: 正常食管黏膜组织; B: 食管鳞癌组织。

最好在冰浴上), 加入上室各100 μ L(3个室); 放入37℃培养箱中, 孵育4-5 h(>5 h); 此间经常观察, 当出现“白色层”时, 说明已经变为固态; 收获正常对照组、空载体组及干扰载体组三组细胞, 分别用不含胎牛血清的DMEM悬浮, 制备单细胞悬液, 将细胞密度调至 5×10^8 /L; 用无血清培养基洗Matrigel 1次; 每孔加入100 μ L细胞悬液; 下腔室中加入500 μ L含有200 mL/L FBS条件培养基; 37℃培养箱中, 孵育20-24 h; 弃去上室液体, 小心取出上室, 用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞, 用70%甲醇固定45 min, 未结合型苏木素染色5 min, 流水冲洗终止。光学显微镜下观察迁徙至膜上的细胞, 每孔计数5个高倍镜视野($\times 100$)中的细胞数总和, 求其平均值。穿膜的细胞数目多少作为评价肿瘤细胞浸润能力强弱的指标。

统计学处理 所获实验数据均采用SPSS11.0版软件包进行统计学处理。所有数据采用mean $\pm$ SD表示, 多组均数间比较采用单因素方差进行分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 N-cadherin蛋白表达及其与临床生物学行为的关系 N-cadherin阳性信号定位于细胞质, 呈黄色或棕黄色, 其在正常食管黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达依次升高29.0%(18/62)、61.3%(19/31)、75.8%(47/62), 组

间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1, 表1)。与食管鳞癌分化程度、浸润转移的关系见表2。

2.2 食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中N-cadherin mRNA的表达 N-cadherin mRNA RT-PCR扩增产物与预计一致, 其片段大小为204 bp, 内参 β -actin片段大小为480 bp(图2)。扩增结果经凝胶灰度扫描而对N-cadherin mRNA表达进行定量, 在食管鳞癌癌变过程中N-cadherin在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中mRNA的含量依次增高, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。不同临床病理特征患者食管组织中N-cadherin mRNA相对含量见表2。

2.3 阳离子脂质体转染及阳性克隆的筛选与扩增 转染24 h后在荧光显微镜下488 nm波长处观察, 空载体组及干扰载体组均可见明亮的绿色荧光, 胞质和胞核都有, 并可维持1 mo以上(图3)。正常对照组、脂质体组未见绿色荧光。当G418以600 mg/L的初选浓度作用10-15 d后, 正常对照组、脂质体组细胞绝大部分死亡, 然后将G418浓度降为300 mg/L维持, 10-15 d后正常对照组、脂质体组细胞全部死亡, 从而得到稳定表达EGFP的EC9706, 后续培养中仍用300 mg/L的G418维持。

2.4 RT-PCR检测转染前后EC9706 N-cadherin的mRNA表达 4种细胞均扩出480 bp的 β -actin内参带, 阳性对照组、正常对照组和空载体组细胞

表 2 食管鳞癌组织中N-cadherin mRNA和蛋白表达与临床病理学参数的关系

病理特征	n	N-cadherin mRNA表达			N-cadherin蛋白表达		
		相对含量	F/t	P	阳性(n, %)	χ^2	P
组织分级							
I	10	0.5664 ± 0.0123			8(53.3)		
II	21	0.6408 ± 0.0078	555.231	0.000	19(76.0)	6.924	0.031
III	21	0.7417 ± 0.0064			20(90.9)		
浸润深度							
浅层	3	0.5814 ± 0.0346	75.866	0.000	2(28.6)	6.916	0.009
深层	49	0.7470 ± 0.0140			45(81.8)		
淋巴结转移							
无	30	0.6857 ± 0.0907	7.269	0.012	28(66.7)	4.486	0.034
有	22	0.7835 ± 0.1072			19(95.0)		

■应用要点

本研究为食管癌侵袭机制的研究提供新的思路, 并为其临床治疗提供新的靶点。

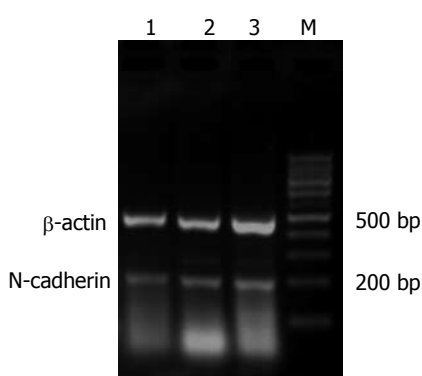


图 2 食管鳞癌、癌旁及相应正常食管黏膜中N-cadherin的mRNA表达。1: 正常食管黏膜; 2: 癌旁组织; 3: 食管鳞癌组织; M: marker.

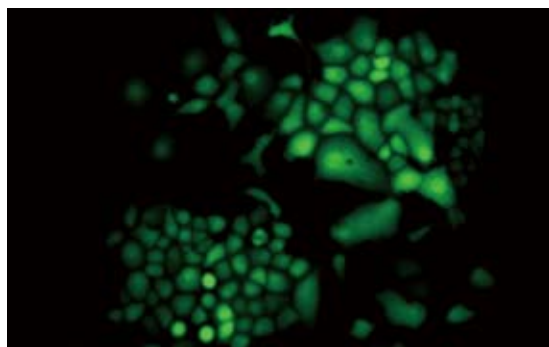
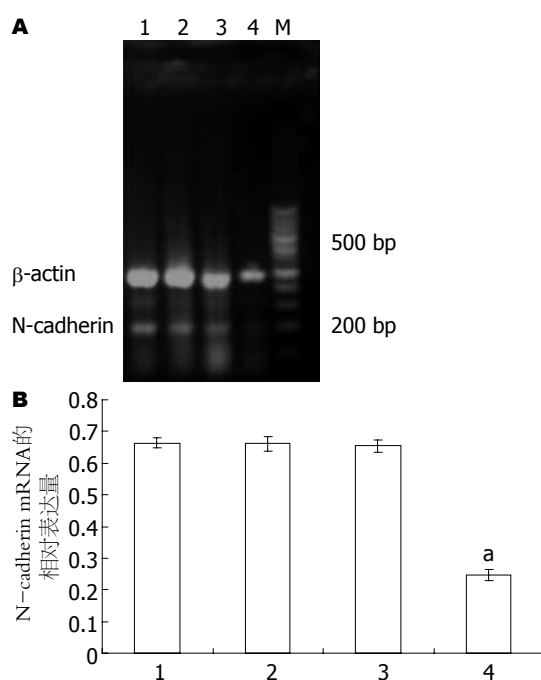


图 3 转染30 d后倒置荧光显微镜下干扰载体组EC9706细胞观(×400).

均可见清晰的约204 bp的N-cadherin目的条带, 而干扰载体组细胞的目的条带亮度明显减弱, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4).

2.5 Western blotting检测EC9706转染前后N-cadherin的蛋白表达 空载体组中N-cadherin的蛋白表达与正常对照组相比无明显变化, 而干扰载体组中N-cadherin的蛋白表达与正常对照组相比则明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图5).

2.6 RT-PCR检测EC9706转染前后MMP-9的

图 4 EC9706细胞转染前后N-cadherin mRNA的相对表达量。1: 阳性对照组; 2: 正常对照组; 3: 空载体组; 4: 干扰载体组; M: 100 bp Marker. ^a $P<0.05$ vs 正常对照组和空载体组。

mRNA表达 3组细胞均扩出480 bp的 β -actin内参带, 正常对照组和空载体组细胞均可见清晰的约400 bp的MMP-9目的条带, 而干扰载体组细胞的目的条带亮度减弱, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图6).

2.7 转染前后EC9706各组细胞的体外侵袭能力分析 正常对照组、空载体组及干扰载体组之间比较, 干扰载体组穿膜的细胞数显著减少, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图7-8).

3 讨论

N-cadherin在食管鳞癌组织中的表达及其临床病理意义, 目前已知的与肿瘤转移有关的黏附

■名词解释

Transwell小室体外侵袭试验: 将Transwell小室放入培养板中, 小室内称上室, 培养板内称下室, 上室内盛装上层培养液, 下室内盛装下层培养液, 上下层培养液以聚碳酸酯膜相隔。先在膜上涂一层基质胶, 模拟细胞外基质, 然后将细胞种在上室内, 由于聚碳酸酯膜有通透性, 下层培养液中的成分可以影响到上室内的细胞, 从而可以研究下层培养液中的成分对细胞生长、运动等的影响。

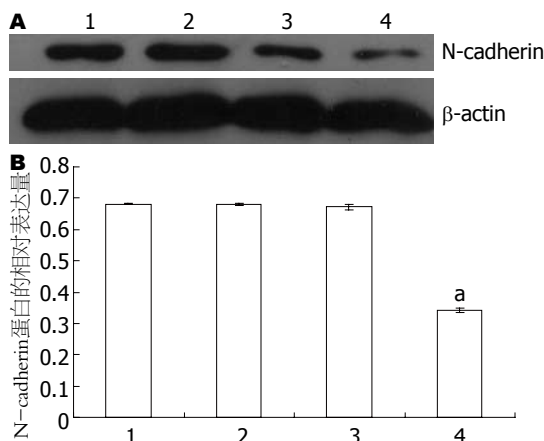


图5 EC9706细胞转染前后N-cadherin蛋白表达。1: 阳性对照组; 2: 正常对照组; 3: 空载体组; 4: 干扰载体组。* $P < 0.05$ vs 正常对照组和空载体组。

分子可分为5类: 整合素家族、选择素家族、免疫球蛋白超家族、钙黏附蛋白家族和未归类的黏附分子。钙黏附分子家族由一系列结构和功能相似的单链跨膜糖蛋白组成。经典的钙黏附蛋白按其最初来源分为: E-cadherin(上皮型)、N-cadherin(神经型)、P-cadherin(胎盘型)3种, 分子质量均约为120 kDa, 主要参与介导钙离子依赖的同型细胞间的黏附。该家族的特点是既可以作为受体, 又可以作配体按啮同类结合方式而相互结合, 对细胞识别、迁徙、归类行为及在维持正常组织结构方面起着重要作用, 参与调节组织发生和形态分化^[7]。

最近研究表明^[3-4], N-cadherin在乳腺癌、前列腺癌的表达增多, 并且在引起肿瘤的浸润和转移方面有比E-cadherin的减少更为重要的作用。Utsuki *et al*^[8]发现在脑胶质母细胞瘤和星形细胞瘤中N-cadherin的表达增加, 并且和肿瘤的病理分级相关, 而E-cadherin的表达减少。Makagiansar *et al*^[9]发现N-cadherin可以增加恶性T细胞瘤对上皮细胞的黏附力, 使其更容易发生转移。

本研究结果显示, 随着食管鳞癌浸润深度增加、分化程度降低及发生转移N-cadherin蛋白的阳性表达率增加, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。RT-PCR结果亦证实: 在正常食管黏膜、癌旁不典型增生及食管鳞状细胞癌组织中均发现N-cadherin mRNA的表达, 但3组间N-cadherin mRNA相对含量比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 819.242$, $P < 0.01$)。不同分化程度、不同浸润深度及有无淋巴结转移的食管鳞状细胞癌组织之间N-cadherin mRNA相对含量差异均

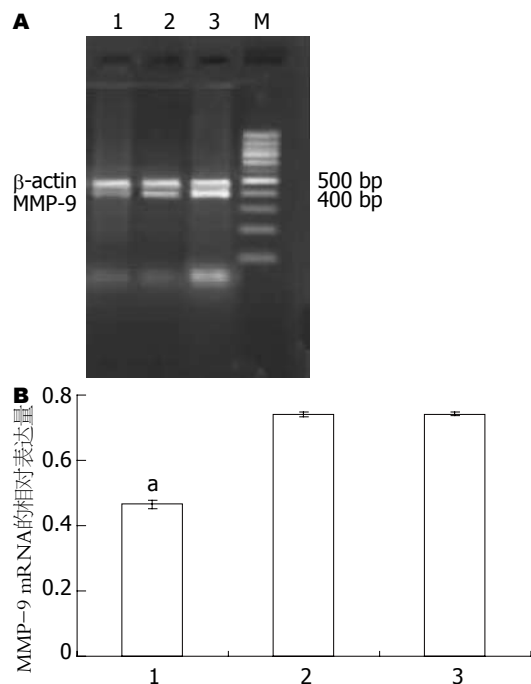


图6 EC9706细胞转染前后MMP-9 mRNA表达。1: 干扰载体组; 2: 空载体组; 3: 正常对照组; M: 100 bp Marker。* $P < 0.05$ vs 正常对照组和空载体组。

有统计学意义($P < 0.05$), 从而提示N-cadherin可以作为食管鳞癌浸润转移的预测指标。

RNA干扰沉默N-cadherin基因在人食管癌细胞系EC9706中的表达及其对细胞体外侵袭能力的影响。为了进一步验证N-cadherin基因表达与食管癌浸润、转移的关系, 本研究将N-cadherin基因的RNA干扰载体pMSCVneo/N-cadherin质粒稳定转染至人食管癌细胞系EC9706, RT-PCR和Western blotting结果显示: 稳定转染干扰载体的EC9706中N-cadherin的mRNA和蛋白表达水平均明显下降, 同时通过Transwell小室体外侵袭实验证明, 伴随着N-cadherin的mRNA和蛋白表达水平的下降, EC9706的体外侵袭能力也随之下降。

肿瘤细胞的浸润和转移包括肿瘤细胞通过黏附作用脱离原发灶, 移动到基底膜, 降解细胞外基质, 突破组织屏障结构, 局部浸润或远距离及全身组织扩散, 而N-cadherin对于肿瘤上皮细胞及表达N-cadherin的血管平滑肌细胞和外皮细胞之间的黏附起着重要的作用。在肿瘤形成的过程中, N-cadherin的表达有助于血管形成及上皮细胞-间质细胞的迁移, 从而使肿瘤细胞更加富于侵袭性, 易于转移^[5]。Nieman *et al*^[10]将外源性N-cadherin基因转入E-cadherin表达阳性的乳腺癌细胞, 尽管转染后的细胞E-cadherin表达仍

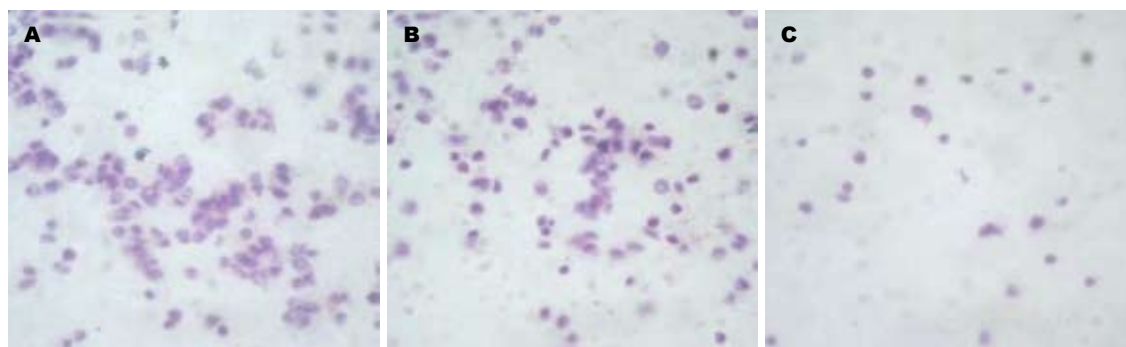


图 7 Transwell小室体外侵袭实验穿膜细胞(HE × 200). A: 正常对照组; B: 空载体组; C: 干扰载体组.

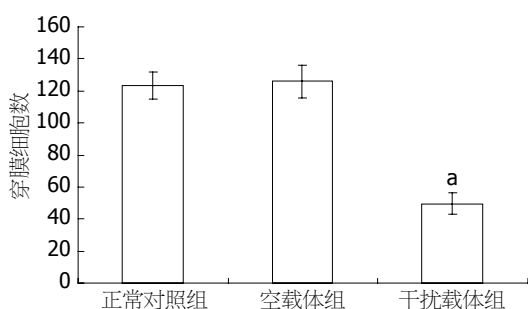


图 8 Transwell小室体外侵袭实验穿膜细胞数的比较.
* $P < 0.05$ vs 正常对照组和空载体组.

为阳性,但细胞的迁移和侵袭能力却得以加强.

对于N-cadherin表达下调导致人食管癌细胞EC9706的体外侵袭能力下降的可能机制本研究也进行了初步探讨. Suyama *et al*^[5]的研究发现N-cadherin的增加可以通过FGF激活MAPK-ERK信号转导途径,诱导MMP-9基因表达,有利于肿瘤血管的形成,使肿瘤易于生长和转移.基质金属蛋白酶(matrix metal loproteinases, MMPs)是一组结构中含 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的蛋白水解酶家族, MMP-9的主要底物均为IV/V型胶原,故也称为IV型胶原酶(明胶酶). IV型胶原为基底膜中结构蛋白,对维持基底膜的完整性至关重要.由于IV型胶原独特的螺旋结构,因此大部分蛋白酶对其无降解作用,但MMP-9可以降解IV型胶原和层粘连蛋白等成分,破坏基底膜的完整性^[11-14],这是肿瘤浸润和转移的先决条件.为此,本研究通过RT-PCR检测了转染前后EC9706中MMP-9的mRNA表达水平的变化,结果表明,伴随着N-cadherin的mRNA和蛋白表达水平的下降, EC9706中MMP-9 mRNA表达水平也随之下降,从而提示, N-cadherin的表达下调可能通过下调MMP-9的表达,降低细胞对细胞外基质的降解能力,进而降低细胞的体外侵袭能力.至于N-cadherin是如何通过MMP-9发挥作用,尚需进

一步的研究.

总之,本研究首先从mRNA和蛋白水平证实N-cadherin与食管鳞状细胞癌的发生、侵袭及转移有关;然后又通过RNA干扰技术,使得人食管癌细胞系EC9706中N-cadherin mRNA和蛋白表达水平下调,同时MMP-9 mRNA表达水平也随之下调,伴随着两者表达的下调,人食管癌细胞系EC9706的体外侵袭能力也随之下降,从而提示,食管癌的侵袭、转移可能是N-cadherin和MMP-9共同作用的结果,为食管癌侵袭机制的研究提供新的思路,并为其临床治疗提供新的靶点.

4 参考文献

- 1 Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1174-1180
- 2 Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Microsatellite analysis of the APC gene and immunoexpression of E-cadherin, catenin, and tubulin in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2006; 37: 125-134
- 3 Jaggi M, Nazemi T, Abrahams NA, Baker JJ, Galich A, Smith LM, Balaji KC. N-cadherin switching occurs in high Gleason grade prostate cancer. *Prostate* 2006; 66: 193-199
- 4 Nagi C, Guttman M, Jaffer S, Qiao R, Keren R, Triana A, Li M, Godbold J, Bleiweiss IJ, Hazan RB. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: 225-235
- 5 Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2002; 2: 301-314
- 6 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996; 6: 229
- 7 Pettitt J. The cadherin superfamily. *WormBook* 2005: 1-9
- 8 Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in

■同行评价

本研究的内容是肿瘤治疗领域较为重要的一个方面,有较好的前沿性、新颖性,也符合伦理学要求,具有一定的学术价值.

- astrocytomas. *J Neurooncol* 2002; 57: 187-192
- 9 Makagiansar IT, Yusuf-Makagiansar H, Ikesue A, Calcagno AM, Murray JS, Siahaan TJ. N-cadherin involvement in the heterotypic adherence of malignant T-cells to epithelia. *Mol Cell Biochem* 2002; 233: 1-8
- 10 Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999; 147: 631-644
- 11 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-308
- 12 Rajapakse N, Kim MM, Mendis E, Huang R, Kim SK. Carboxylated chitooligosaccharides (CCOS) inhibit MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells via down-regulation of AP-1. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1780-1788
- 13 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174
- 14 Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Hsu SM. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 6537-6542

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 2008-07-28)

抗胃癌单链抗体可变区序列分析及空间结构模拟

杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波, 苏成芝

杨丽娟, 中国人民解放军总医院内分泌科 北京市 100853
侯颖春, 陕西师范大学生命科学学院 陕西省西安市 710062
白玉杰, 浙江大学迪诺遗传与基因组医学研究中心 浙江省
杭州市 310058
药立波, 苏成芝, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与
分子生物学教研室 陕西省西安市 710032
杨丽娟, 1997年中国人民解放军第四军医大学博士, 副主任医
师, 副教授, 主要从事内科的基础和临床工作。
作者贡献分布: 此课题由杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波及
苏成芝设计; 研究过程由杨丽娟, 侯颖春及白玉杰操作完成; 数
据分析由杨丽娟与侯颖春完成; 本论文由杨丽娟写作完成。
通讯作者: 杨丽娟, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军
总医院内分泌科。ljyang2828@163.com
电话: 010-66936234 传真: 010-68168917
收稿日期: 2008-04-28 修回日期: 2008-05-21
接受日期: 2008-06-02 在线出版日期: 2008-07-28

Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of single-chain variable region of antibody against human gastric cancer

Li-Juan Yang, Ying-Chun Hou, Yu-Jie Bai, Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su

Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Ying-Chun Hou, School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi Province, China
Yu-Jie Bai, Adinovo Center for Genetic and Genomic Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China
Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su, Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. ljyang2828@163.com
Received: 2008-04-28 Revised: 2008-05-21
Accepted: 2008-06-02 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To analyze the sequence of heavy and light chain of the variable region (V_H and V_L) in the anti-human gastric cancer antibody, select a suitable linker peptide to construct single chain antibody, model the 3-D structure and predict the relationship between its structure and function.

METHODS: Using the sequences of V_H and V_L , which derived from the phage display library

of antibodies against human gastric cancer, a suitable linker peptide was chosen to obtain the primary structure of the single-chain antibody with considering the C-terminal and N-terminal structural character. Furthermore, the 3-D theoretical structure was modeled with computer-guided homology modeling method. The stable spatial conformation of the single-chain variable region was determined with mechanism optimization and molecular dynamic simulation. The structural property and physical-chemical characters were analyzed using the distance geometry, surface electrostatic distribution and solvent accessible surface calculation.

RESULTS: The conformation of the successfully constructed single-chain antibody was stable. Except one amino acid conformation of connecting peptide, others' were reasonable. V_L CDR1, CDR2 and V_H CDR3 solution accessibility surface area distributed strongly, but V_L CDR3, V_H CDR1, and CDR2 were comparatively weak. V_H CDR3 region had strong electronegativity.

CONCLUSION: The 3-D structure of the created single chain antibody is proved reasonable and reliable.

Key Words: Gastric cancer; Single-chain antibody; Mechanism optimization; Molecular dynamic simulation; Solvent accessible surface; Surface electrostatic distribution

Yang LJ, Hou YC, Bai YJ, Yao LB, Su CZ. Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of single-chain variable region of antibody against human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2333-2336

摘要

目的: 考察抗人胃癌抗体可变区轻、重链序列, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 并模拟其三级结构, 预测单链抗体结构与功能关系。

方法: 利用获得的源自抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出的抗体可变区轻、重链序列, 通过分析抗体轻重链可变区C-端、N-端结构特征, 选择合适的连接肽, 进而利用分子模拟原理构

■背景资料

在肿瘤的诊断治疗中, 抗体占有重要的作用。本研究利用噬菌体抗体库技术, 绕过杂交瘤技术, 获得了鼠抗人胃癌重链及轻链可变区片段, 并通过分析其N-端、C-端序列及结构特征, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 经计算机辅助分子模拟方法构建其空间构象。为今后胃癌的显像和导向治疗奠定了一定的基础。

■同行评议者

李奇林, 教授, 南方医科大学附属珠江医院急诊部

■研发前沿

目前所获得的抗体大部分为鼠源性, 在应用过程中会引发HAMA反应而限制了其应用. 必须先进行人源化改造, 才能更好地应用于临床. 如何进行人源化改造是亟待研究的问题.

建单链抗体可变区的空间构象; 经过力学优化、动力学模拟确定其稳定的三维结构; 借助距离几何学、表观静电分布、溶液可及性表面积分析, 对单链抗体的结构特征及理化性质进行理论分析.

结果: 成功获得的单链抗体稳定构象, 除连接肽位置的1个氨基酸构象不合理之外, 其他位置构象合适. 轻链CDR1、CDR2以及重链CDR3溶液可及性表面积分布较强, 而轻链CDR3、重链CDR1、CDR2分布较弱. 重链CDR3区带有较强的负电性.

结论: 所构建的单链抗体三维空间结构具有较高的合理性和可靠性.

关键词: 胃癌; 单链抗体; 力学优化; 动力学模拟; 溶液可及性表面积; 表观静电分布

杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波, 苏成芝. 抗胃癌单链抗体可变区序列分析及空间结构模拟. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2333-2336
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2333.asp

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及病死率均为恶性肿瘤的第1位^[1], 因此, 胃癌的早期诊断和有效治疗就显得极为重要. 单链抗体作为抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段, 在肿瘤的早期诊断和治疗中越来越受到人们的广泛关注. 本研究利用源自噬菌体抗体库技术获得的鼠抗人胃癌轻、重链可变区片段, 通过分析其N-端、C-端序列及结构特征, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 经计算机辅助分子模拟方法构建其空间构象. 利用相关理论方法对其结构进行分析, 预测了结构功能关系, 为进一步抗体的合理改造奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 细菌菌株*E.coli* TG1, 克隆及表达载体pCANTAB5E, 分别扩增轻链可变区片段(VL)和重链可变区片段(VH), 引物及RS Primer Mix均为Pharmacia公司产品. 其他有关分子生物学试剂系华美公司和Promega公司产品. Insight II (2005)软件包为MSI公司产品.

1.2 方法 抗人胃癌抗体轻、重链序列参见文献[2]. 分析人胃癌抗体轻、重链可变区序列, 借助其空间构象分析其N-、C-端结构特征, 选择合适的连接肽(GGGGS)₃, 利用分子模拟方法

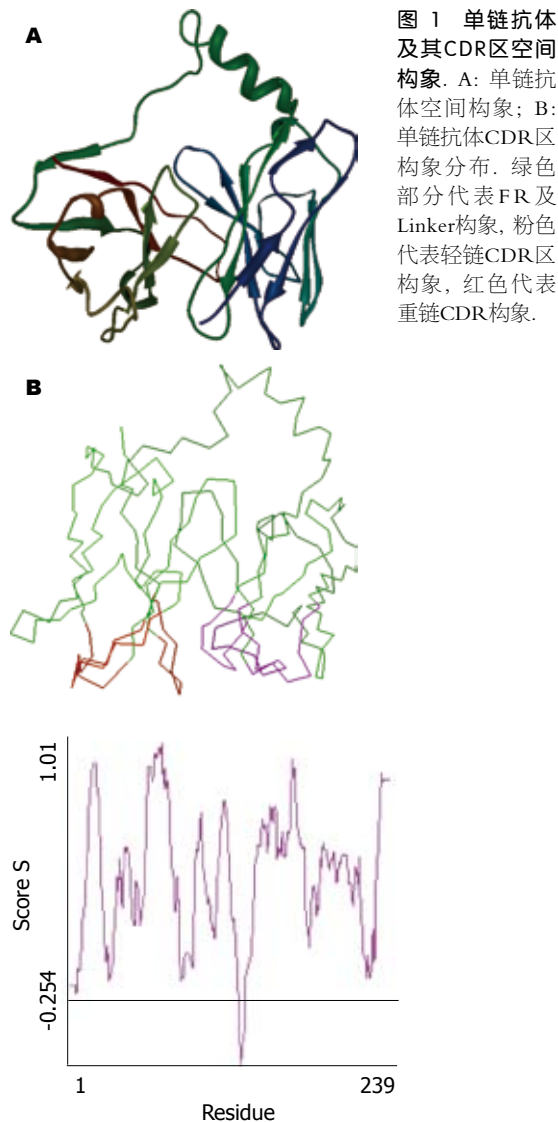


图1 单链抗体及其CDR区空间构象. A: 单链抗体空间构象; B: 单链抗体CDR区构象分布. 绿色部分代表FR及Linker构象, 粉色代表轻链CDR区构象, 红色代表重链CDR构象.

图2 Profile_3D对于模拟的单链抗体构象结构评估.

搭建单链抗体空间构象. 依次选择CVFF力场、Gromos96力场, 利用Discover、Discover_3程序包, 经最陡下降、共轭梯度算法进行分子力学优化; 通过常温动力学模拟, 收集100个稳定构象进行分析, 最终确定单链抗体的稳定构象. 利用Profile_3D对单链抗体的结构进行可信性分析; 进而通过Access_Surf模块对单链抗体的表面溶液可及程度进行分析; 利用Delphi程序, 考虑溶剂效应进行表观静电分布分析.

2 结果

2.1 抗人胃癌单链抗体结构模拟 考察抗体重链、轻链可变区N、C端氨基酸理化特征, 选择合适的连接肽(GGGGS)₃, 构建单链抗体可变区序列. 通过http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BlastP, 检索PDB数据库, 得到模板蛋白, 其PDB注册号为1h8s. 利用同源模建方法搭建其三维结构, 通过分子力学、

■相关报道

人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守. 氨基酸残基序列有50%相同的蛋白质, 约有90%的Ca原子偏差不超过0.3 nm, 均方根偏差约0.1 nm. 氨基酸的残基替换通常发生在蛋白质表面回折区域. 蛋白质主链结构, 特别是疏水中心的结构受序列变异的影响很小. 因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的.

■创新盘点

本文先从噬菌体抗体库着手, 得到抗体重链及轻链可变区片段后, 选择合适的连接肽, 利用三维重建得到空间结构, 为人源化改造奠定基础。

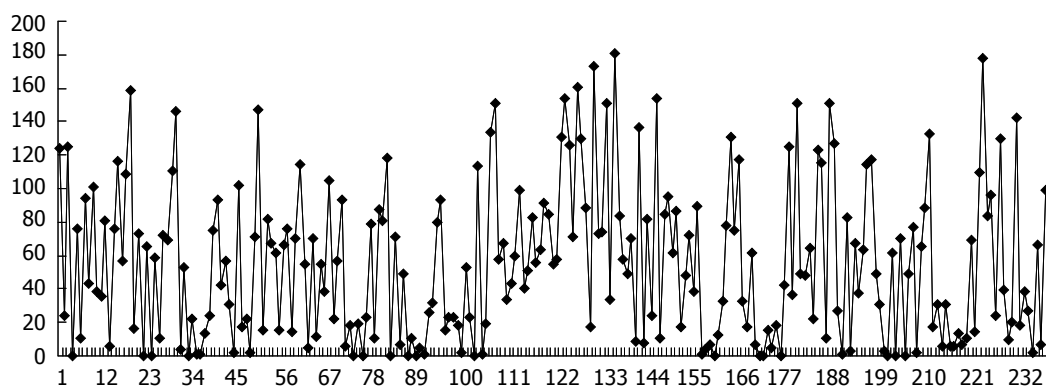


图 3 单链抗体可及性表面积分布情况。

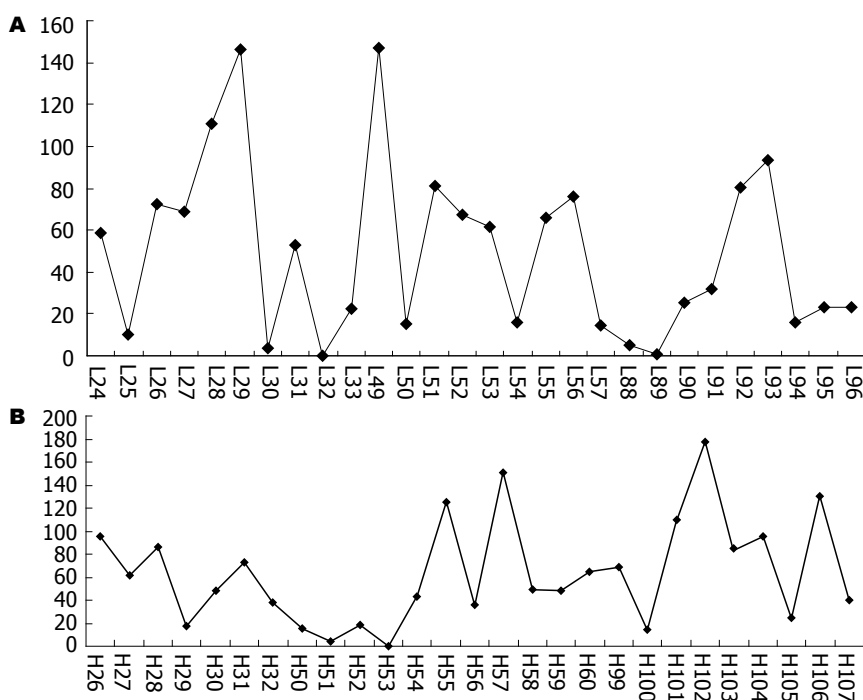


图 4 单链抗体质量、轻链CDR可及性表面积分布情况. A: 轻链; B: 重链。

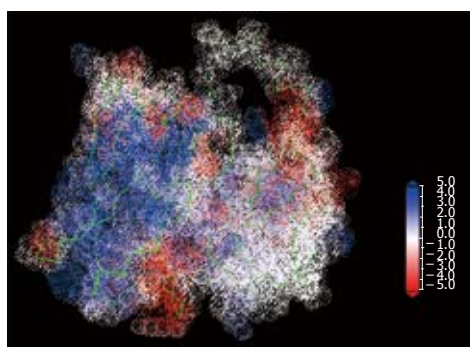


图 5 单链抗体表面静电分布. 利用Delphi程序对于单链抗体表面静电分布的理论分析, 其中红色部分代表负电区, 蓝色部分代表正电区, 白色部分代表中性区。

动力学模拟获得其稳定构象(图1A-B)。

2.2 抗人胃癌单链抗体结构评估 为评判模拟构象结构的可靠性, 我们对优化获得的单链抗体空间结构进行了理论评估, 结果模拟的构象除连接肽位置的1个氨基酸构象不合理之外, 其他

位置构象合适(图2)。

2.3 抗人胃癌单链抗体性质 轻链CDR1、CDR2以及重链CDR3溶液可及性表面积分布较强, 而轻链CDR3、重链CDR1、CDR2分布较弱, 提示在发挥作用的过程中, 重链CDR3区参与跟抗原的结合(图3-4)。重链CDR3区带有较强的负电性, 提示在与相应抗原作用过程中, 通过与正电的抗原表位发生静电作用(图5)。

3 讨论

人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守。因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的^[6]。据此原理, 人们已成功预测了许多目标蛋白, 在抗体的结构预测中尤为突出^[4-10], 这对抗体工程的发展具有十分重要的意义, 能够使人们在了解抗体空间结构及其与生物学功

■同行评价

本文在查阅了大量文献资料的基础上进行设计,对胃癌的研究有较大的指导性,为防治消化系肿瘤提供了较好的基础研究理论.

能关系之基础上,对已有的抗体分子加以改造,使其更符合临床诊断和治疗的需要.

小分子抗体具有分子小,免疫原性弱,穿透力强易于进入实体瘤周围的微循环,血清和全身廓清快,无肾脏蓄积作用,肿瘤显像时清晰度高,可作载体与药物、同位素、毒素等结合之优点^[1],在肿瘤的诊断和治疗方面有极高的理论和应用价值.单链抗体是小分子抗体的一种,其由VH和VL和连接肽构成,是抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段.本研究利用计算机辅助分子设计与蛋白空间结构模拟技术,利用获得的源自抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出的VH、VL序列,通过分析抗体轻重链可变区C-端、N-端结构特征,选择合适的连接肽,进而利用分子模拟原理构建单链抗体可变区的空间构象;经过力学优化、动力学模拟确定其稳定的三维结构;借助距离几何学、表观静电分布、溶液可及性表面积分析,对单链抗体的结构特征及理化性质进行了理论分析.获得的单链抗体构象表明,其CDR区形成合理的口袋结构,易于结合抗原表位而发挥功能.这为该抗体的进一步合理化改造提供了理论依据.

4 参考文献

- 1 华积德. 肿瘤外科学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1995: 1180-1182
- 2 杨丽娟, 苏成芝. 抗人胃癌全套单链抗体基因噬菌体表面呈现文库的构建、初步筛选及鉴定. 第四军医大学学报 1998; 19: 22-24
- 3 Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJ, Thornton JM. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 1987; 326: 347-352
- 4 Fontayne A, Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Van Rompaey I, Meiring M, Lamprecht S, Roodt J, Desmet J, Deckmyn H. Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb/IIIa antibody: 6B4. *Thromb Haemost* 2006; 96: 671-684
- 5 Paula S, Monson N, Ball WJ Jr. Molecular modeling of cardiac glycoside binding by the human sequence monoclonal antibody 1B3. *Proteins* 2005; 60: 382-391
- 6 Thompson AJ, Price KL, Reeves DC, Chan SL, Chau PL, Lummis SC. Locating an antagonist in the 5-HT₃ receptor binding site using modeling and radioligand binding. *J Biol Chem* 2005; 280: 20476-20482
- 7 Mendez R, Leplae R, Lensink MF, Wodak SJ. Assessment of CAPRI predictions in rounds 3-5 shows progress in docking procedures. *Proteins* 2005; 60: 150-169
- 8 Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem* 2004; 279: 49172-49176
- 9 Arndt MA, Krauss J, Schwarzenbacher R, Vu BK, Greene S, Rybak SM. Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 822-889
- 10 Mohan S, Sinha N, Smith-Gill SJ. Modeling the binding sites of anti-hen egg white lysozyme antibodies HyHEL-8 and HyHEL-26: an insight into the molecular basis of antibody cross-reactivity and specificity. *Biophys J* 2003; 85: 3221-3236
- 11 Colcher D, Bird R, Roselli M, Hardman KD, Johnson S, Pope S, Dodd SW, Pantoliano MW, Milenic DE, Schlom J. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1191-1197

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 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末.标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体.(常务副总编辑:张海宁 2008-07-28)

mtTFA、NRF-1对冷保存-再灌注肝移植大鼠线粒体DNA ATPase6基因表达的调节

张莹, 别平, 石承先, 任娟娟

张莹, 石承先, 任娟娟, 贵州省人民医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550002
别平, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科 重庆市 400038
张莹, 2003年中国人民解放军第三军医大学肝胆外科博士, 副主任医师, 主要从事肝脏移植和胰腺疾病的基础与临床研究。
贵州省优秀科技教育人才省长基金资助项目, No. 2005-229
作者贡献分布: 张莹与别平负责课题设计, 张莹负责实验操作及文章撰写; 石承先负责实验指导; 任娟娟负责数据统计。
通讯作者: 张莹, 550002, 贵州省贵阳市中山东路83号, 贵州省人民医院肝胆外科。 zhangyingdoc@163.com
电话: 0851-5937612
收稿日期: 2008-02-21 修回日期: 2008-06-17
接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-07-28

Effects of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 on the expression of mitochondrial DNA ATPase6 genes during cold preservation and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation

Ying Zhang, Ping Bie, Cheng-Xian Shi, Juan-Juan Ren

Ying Zhang, Cheng-Xian Shi, Juan-Juan Ren, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China
Ping Bie, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China
Supported by: the Nomarch Funds for Excellent Sci & Tech Teachers of Guizhou Province, No. 2005-229
Correspondence to: Ying Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China. zhangyingdoc@163.com
Received: 2008-02-21 Revised: 2008-06-17
Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To observe the effects of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) on the expression of mitochondrial ATP6 genes during cold preservation and reperfusion injury in rats receiving orthotopic liver transplantation.

METHODS: Orthotopic liver transplantation

was performed in Wistar rats using the cuff technique as described by Kamada with modifications. A total of 186 rats were randomly divided into 4 groups, named as group A (30 min of cold preservation), group B (6 h of cold preservation), group C (12 h of cold preservation) and group D (sham operation). Hepatic samples were collected at 12 h, 24 h and on the 3rd, 5th, 7th day after operation. The ATP levels were observed in each group. The expression levels of NRF-1, mtTFA and mtDNA encoding ATPase6 mRNA were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The expression of mtTFA decreased in groups A, B and C 12 h after operation, and it was lower in group C and groups A and B (0.57 ± 0.05 vs 0.87 ± 0.11 , 0.69 ± 0.10 , $P < 0.05$). The expression change of NRF-1 mRNA was consistent with that of mtTFA. After 24 h, the expression levels of mtTFA and NRF-1 mRNA started to increase, and the expression of ATPase6 mRNA and ATP in hepatic tissues were in accordance with mtTFA and NRF-1 mRNA.

CONCLUSION: mtTFA and NRF-1 increase the expression of ATPase6 mRNA, suggesting mtTFA and NRF-1 may be important factors in controlling ATPase6 mRNA transcription.

Key Words: Liver transplantation; Cold preservation; Energy metabolism; Gene expression; Mitochondria DNA

Zhang Y, Bie P, Shi CX, Ren JJ. Effects of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 on the expression of mitochondrial DNA ATPase6 genes during cold preservation and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2337-2342

摘要

目的: 研究线粒体DNA上游调节基因mtTFA和NRF-1对冷保存肝移植大鼠肝细胞线粒体DNA ATPase6基因表达的影响, 探讨mtTFA和NRF-1对冷保存肝移植大鼠肝细胞线粒体

■背景资料

肝脏移植在冷保存-再灌注过程中不可避免造成供肝的损伤。线粒体DNA(mtDNA)是最易受损的细胞成分之一, 他的损伤直接影响细胞的能量代谢过程, 导致ATP生成减少, 进而加剧细胞损伤。由核基因组编码的线粒体呼吸链蛋白的转录翻译等过程受核呼吸因子NRF-1和mtTFA调节, 目前已证实了细胞色素C还原酶和氧化酶、抗氧化物反应元件(ARE)及ATPase亚基的基因启动子中均具有NRF-1的功能性结合位点。

■同行评议者

宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

■研究前沿

如何保护和减少并修复冷保存-再灌注造成的mtDNA损伤是该领域研究热点。

DNA调节作用及其机制。

方法: Wistar大鼠186只, 采用改良“二袖套法”制作大鼠肝移植模型, 动物随机分为A组: 冷保存30 min; B组: 冷保存6 h; C组: 冷保存12 h; 和D组(假手术对照组), 分别于制模后于12 h、24 h、3 d、5 d、7 d采集标本, 保证每时相点存活大鼠6只。观察各组大鼠肝脏ATP含量。采用RT-PCR方法检测mtDNA ATPase6 mRNA、mtTFA和NRF-1 mRNA的表达变化。

结果: 冷保存再灌注后早期(12 h), A、B、C三组mtTFA mRNA表达降低, 与A、B组相比, C组最为显著(0.57 ± 0.05 vs 0.87 ± 0.11 , 0.69 ± 0.10 , $P < 0.05$), NRF-1 mRNA表达变化与mtTFA mRNA相一致。24 h后各组mtTFA及NRF-1 mRNA表达开始升高, ATPase6表达和肝组织ATP含量也升高, 并且升高趋势与mtTFA及NRF-1 mRNA表达增高基本一致。

结论: mtTFA和NRF-1可能通过基因转录调节ATPase6基因表达, 改变线粒体呼吸链转运电子、合成ATP的能力。

关键词: 肝移植; 冷保存; 能量代谢; 基因表达; 线粒体DNA

张莹, 别平, 石承先, 任娟娟. mtTFA、NRF-1对冷保存-再灌注肝移植大鼠线粒体DNA ATPase6基因表达的调节. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2337-2342

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2337.asp>

■相关报道

Gibelin *et al* 对大鼠肝脏冷保存12 h, 再灌注90 min, 检测组织学改变, 证实存在线粒体损伤, 并且认为细胞内部的损伤对预后更为重要。李伟文发现缺血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体DNA ATPase6 mRNA下调和能量代谢障碍形成恶性循环, 最终使细胞功能失常。Suliman *et al* 研究发现mtTFA通过调节mtDNA的转录与复制, 从而调控mtDNA编码呼吸链蛋白亚基, 保护和修复受损的mtDNA, 恢复mtDNA的完整性和线粒体的功能。

0 引言

线粒体呼吸链蛋白亚基是由核基因组和线粒体基因组编码合成^[1]。线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)在mtDNA的表达调控中处于中心位置, 通过调控线粒体呼吸链上蛋白质亚基表达, 调控线粒体能量代谢。核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor-1, NRF-1)是核基因编码的影响mtDNA的另一重要因子, 他控制着线粒体电子传递链的一些蛋白质的合成。mtDNA ATPase6基因是调控ATP合成的关键基因。目前, 有关冷保存-再灌注过程中移植肝线粒体编码基因的变化研究较少。本研究建立大鼠肝移植模型, 从转录调控水平初步探讨移植肝冷保存-再灌注过程中核基因mtTFA、NRF-1对冷保存-再灌注损伤肝移植大鼠mtDNA ATPase6基因表达的调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级Wistar($n = 186$)大鼠, 雌雄各半, 体质量200-250 g, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院动物所提供。♀供体术前自由饮食, ♂受体术前12 h禁食, 自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 取180只大鼠随机分为3组。A组(冷保存30 min组): 供肝切取后冷保存30 min后植入受体。供肝植入后12 h、24 h、3 d、5 d、7 d共5个时相点分别处死实验动物采集标本。每个时相点6只。全组动物供、受体各30只。B组: 冷保存6 h组。即切取供肝, 4℃ UW液保存6 h后行肝移植术。模型建立、标本采集时相点及每一时相点大鼠数量同A组。C组: 冷保存12 h组。即切取供肝, 4℃ UW液保存12 h后行肝移植术。模型建立、标本采集时相点及每一时相点大鼠数量同A组。剩余6只作为假手术对照组(D组), 大鼠麻醉后开腹采集血液及组织标本。采用改良“二袖套法”建立大鼠肝移植模型^[2]。

1.2.2 PCR反应引物设计及合成: 根据各反应产物cDNA序列, 设计并合成引物。mtTFA引物: 上游引物: 5'-CGC CTA AAG AAG AAA GCA CAA AG-3'; 下游引物: 5'-CTT AAG CAA ACG GCA GAA CTC G-3'; 扩增片段长度540 bp。β-actin引物: 上游引物(1A): 5'-CCT AGC ACC ATG AAG ATC AA-3'下游引物(1B): 5'-AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT-3'; 扩增片段长度242 bp。NRF-1引物: 上游引物: 5'-CCA CAT TAC AGG GCG GTG AA-3'; 下游引物: 5'-AGT GGC TCC CTG TTG CAT CT-3'; 扩增片段长度120 bp。β-actin引物: 上游引物(2A): 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3'; 下游引物(2B): 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'; 扩增片段长度318 bp。ATPase6引物: 上游引物: 5'-AAA CGA ATA ACC CTT GAG AAT -3'; 下游引物: 5'-TGG TGG GTC ATT ATG TGT TAT-3'; 扩增片段长度715 bp。β-actin引物: 上游引物(1A): 5'-CCT AGC ACC ATG AAG ATC AA-3'; 下游引物(1B): 5'-AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT-3'; 片段长度242 bp。

1.2.3 肝组织标本采集: 在处死动物后快速取肝中叶、肝右叶置于液氮保存。取肝左外叶切成1 cm×0.5 cm×0.5 cm大小, 于40 g/L多聚甲醛溶液固定后石蜡包埋。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): 逆转录反应试剂盒购于大连宝生物公司。取肝组织总

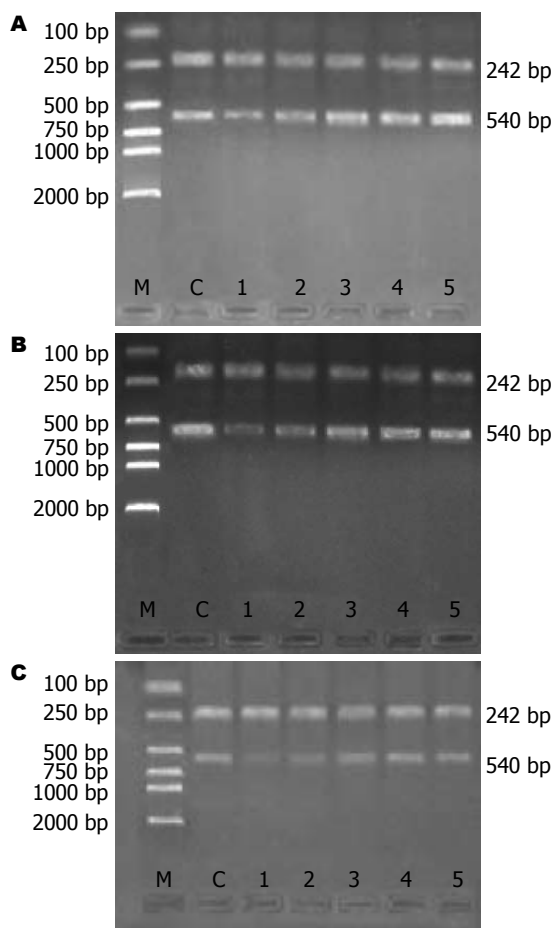


图1 mtTFA mRNA表达. A: A组; B: B组; C: C组; M: Marker; C: 对照组; 1-5: 12 h、24 h、3 d、5 d、7 d时点.

RNA按试剂盒说明合成cDNA. 取2.5 μ L cDNA进行PCR反应. mtTFA扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性200 s, 95 $^{\circ}$ C变性60 s, 53 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 反应35个循环. 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. β -actin扩增条件同上. NRF-1扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性6 min, 94 $^{\circ}$ C变性60 s, 55 $^{\circ}$ C退火2 min, 72 $^{\circ}$ C延伸3 min, 反应32个循环. 72 $^{\circ}$ C延伸7 min. β -actin扩增条件同上. ATPase6扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性200 s, 95 $^{\circ}$ C变性40 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸70 s, 反应30个循环. 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. β -actin同上.

1.2.5 肝组织ATP含量测定: 标准ATP购于Sigma公司. 从液氮中取出组织样品, 精确称取细小组织块200 mg左右, 立即加入HClO₄试管中, 机械匀浆6000 r/min, 30 s; 4 $^{\circ}$ C离心, 3000 r/min, 10 min; 另取试管, 取上清1 mL, 按说明书操作.

1.2.6 PCR产物鉴定: 用DYY-III2型电泳仪, 15 g/L琼脂糖凝胶, 取10 μ L溶液与3 μ L上样液混和后点样, mtTFA、ATPase6选用DL 2000 Marker, NRF-1选用100-600 bp Marker用量5 μ L, 120 V,

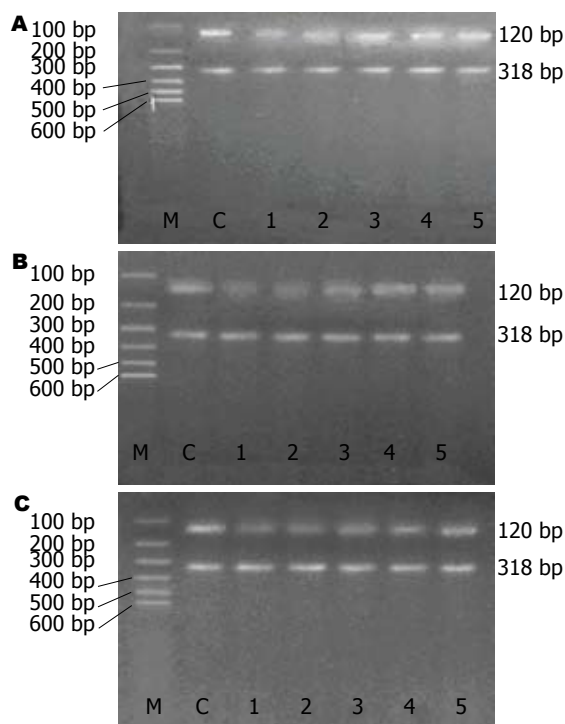


图2 NRF-1 mRNA表达. A: A组; B: B组; C: C组; M: Marker; C: 对照组; 1-5: 12 h、24 h、3 d、5 d、7 d时点.

30 min后紫外灯下观察并拍照.

1.2.7 mtTFA mRNA、NRF-1 mRNA和ATPase6/ β -actin面积光强度比值: 用Quantity one 4.4生物图像分析软件测定各电泳条带面积光强度值, 计算与其相应 β -actin面积光强度比值.

统计学处理 数据均以mean $\pm$ SD表示, 统计学处理采用SPSS10.0软件进行方差分析及 t 检验, $P<0.05$ 为差别显著, $P<0.01$ 为差别非常显著.

2 结果

2.1 mtTFA mRNA、NRF-1 mRNA和ATPase6 PCR产物电泳图谱及mtTFA mRNA、NRF-1 mRNA和ATPase6/ β -actin面积光强度比值 各组RNA提取以及PCR扩增产物电泳加样量都是相同的, 这样就排除了因加样量不同而造成假阳性和假阴性. mtTFA、NRF-1和ATPase6 PCR产物分别为540 bp(图1)、120 bp(图2)和715 bp(图3). 各组 β -actin PCR产物均为一条带, 电泳距离分别在242、318和242 bp处. mtTFA、NRF-1和ATPase6/ β -actin经Quantity one 4.4生物图像分析软件分析得出各条带面积光强度值, 取各组大鼠与其相应 β -actin面积光强度比值做统计学分析.

2.2 肝组织mtTFA mRNA表达量变化 A、B、C 3组肝组织mtTFA mRNA表达量早期降低(12 h), C组降低显著($P<0.01$), 24 h以后逐渐升高. A

■创新点

本研究通过大鼠同种异体原位肝移植模型, 探讨移植肝冷保存-再灌注中调控ATP合成的mt DNA ATPase6基因的改变以及其上游调节因子mt TFA和NRF-1的变化, 从基因水平探讨线粒体损伤在能量代谢障碍中的作用, 从能量代谢角度揭示移植肝冷保存-再灌注损伤的机制, 为改善冷保存条件、提高移植肝质量提供理论依据.

■应用要点

本研究结果提示, 氧自由基等造成 mtDNA ATPase6 基因表达异常, 同时机体又有自身保护性反馈机制, 诱导核基因 mtTFA及NRF-1 的表达, mtTFA 和NRF-1可能通过基因转录调节 ATPase6 mRNA表达, 改变线粒体呼吸链转运电子、合成ATP的能力。因此, 寻找阻止线粒体DNA损伤及促进其上游调节因子表达的策略和方法, 对改善移植肝线粒体功能, 促进移植肝尽早发挥正常功能具有重要意义。

表 1 冷保存肝移植大鼠肝细胞线粒体mtTFA表达的变化 (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

分组	术后时间				
	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	0.87 $\pm$ 0.11 ^e	1.14 $\pm$ 0.04 ^{be}	1.24 $\pm$ 0.04 ^{be}	1.31 $\pm$ 0.05 ^{ae}	1.31 $\pm$ 0.04
B	0.69 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.11 ^b	1.11 $\pm$ 0.06 ^a	1.25 $\pm$ 0.05 ^b	1.31 $\pm$ 0.05 ^a
C	0.57 $\pm$ 0.05 ^{de}	0.61 $\pm$ 0.04 ^{df}	1.03 $\pm$ 0.05 ^{bde}	1.17 $\pm$ 0.07 ^{bde}	1.24 $\pm$ 0.08 ^{ace}
D			1.32 $\pm$ 0.06		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组内前一时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs B组。

表 2 冷保存肝移植大鼠肝细胞线粒体NRF-1表达的变化 (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

分组	术后时间				
	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	0.74 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.13 ^{be}	1.16 $\pm$ 0.06 ^{be}	1.27 $\pm$ 0.04 ^{be}	1.26 $\pm$ 0.05
B	0.66 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.04 ^b	1.05 $\pm$ 0.07 ^b	1.22 $\pm$ 0.04 ^b	1.24 $\pm$ 0.05
C	0.51 $\pm$ 0.05 ^{df}	0.58 $\pm$ 0.09 ^{df}	0.95 $\pm$ 0.10 ^{bd}	1.13 $\pm$ 0.06 ^{bde}	1.23 $\pm$ 0.06 ^a
D			1.28 $\pm$ 0.05		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组内前一时间点; ^c $P < 0.01$ vs A组; ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$ vs B组。

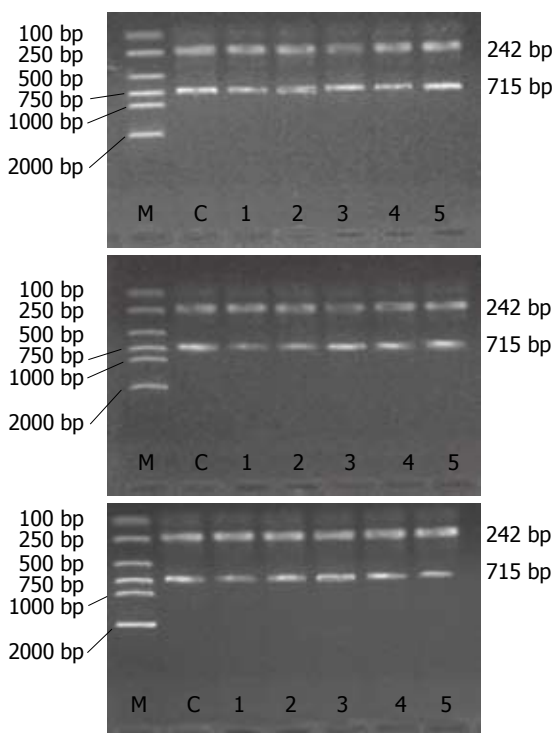


图 3 ATPase6 mRNA表达。A: A组; B: B组; C: C组; M: Marker; C: 对照组; 1-5: 12 h、24 h、3 d、5 d、7 d时间点。

组、B组、C组在12 h、24 h、3 d、5 d组间两两比较均具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3组组内比较可见, 各组mtTFA mRNA表达量均逐渐升高, 与同组前一时间点比较, A组、B组术后

24 h、3 d、5 d升高明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。C组术后12、24 h比较无差异, 3、5、7 d升高明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表1)。

2.3 肝组织NRF-1 mRNA表达量变化 A、B、C 3组肝组织NRF-1 mRNA表达量早期降低(12 h), 与A组、B组比较, C组降低显著($P < 0.01$), 24 h以后逐渐升高。A组与B组在12 h无差异, 在24 h、3 d、5 d均具有显著性差异($P < 0.05$)。C组与A组在24 h、3 d、5 d具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。C组与B组比较24 h、5 d具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3组组内比较可见, 各组NRF-1 mRNA表达量均逐渐升高, 与同组前一时间点比较, A组、B组术后24 h、3 d、5 d升高明显($P < 0.01$)。C组术后3、5、7 d升高明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表2)。

2.4 肝组织ATPase6 mRNA表达量变化 A、B、C 3组肝组织ATPase6 mRNA表达量早期降低(12 h), 并且C组降低显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 24 h以后逐渐升高。A、B、C三组组内比较可见, 各组ATPase6 mRNA表达量均逐渐升高, 与同组前一时间点比较, A组、B组术后24 h、3 d、5 d升高明显($P < 0.05$)。C组术后12、24 h比较无差异, 3、5、7 d升高明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图3, 表3)。

2.5 肝组织ATP变化 A、B、C 3组肝组织ATP早期降低(12 h), 并且冷保存时间越长ATP水平降低显著(A组 vs B组 $P < 0.05$ 或A组 vs C组 $P < 0.01$),

表 3 冷保存肝移植大鼠肝细胞线粒体mtDNA ATPase6表达的变化 (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

分组	术后时间				
	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	1.11 $\pm$ 0.040 ^e	1.22 $\pm$ 0.08 ^{ae}	1.34 $\pm$ 0.050 ^{af}	1.41 $\pm$ 0.055 ^{ae}	1.38 $\pm$ 0.058
B	1.02 $\pm$ 0.067	1.13 $\pm$ 0.05 ^a	1.24 $\pm$ 0.056 ^b	1.33 $\pm$ 0.055 ^a	1.41 $\pm$ 0.055
C	0.81 $\pm$ 0.080 ^{df}	0.88 $\pm$ 0.10 ^{df}	1.16 $\pm$ 0.043 ^{bde}	1.27 $\pm$ 0.040 ^{bce}	1.34 $\pm$ 0.046 ^a
D			1.41 $\pm$ 0.030		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组内前一时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs B组。

表 4 各组大鼠术后ATP水平 (mean $\pm$ SD, $n = 6$, IU/L)

分组	术后时间				
	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	0.70 $\pm$ 0.11	1.19 $\pm$ 0.17 ^a	1.59 $\pm$ 0.21 ^b	1.90 $\pm$ 0.16 ^a	2.05 $\pm$ 0.22
B	0.55 $\pm$ 0.08 ^c	0.70 $\pm$ 0.10 ^{ad}	1.33 $\pm$ 0.18 ^{bc}	1.67 $\pm$ 0.13 ^{bc}	1.95 $\pm$ 0.17 ^b
C	0.44 $\pm$ 0.05 ^d	0.53 $\pm$ 0.08 ^d	1.23 $\pm$ 0.19 ^{bc}	1.48 $\pm$ 0.15 ^{ad}	1.85 $\pm$ 0.15 ^b
D			2.27 $\pm$ 0.19		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组内前一时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A组。

以后逐渐升高. A、B、C 3组组内比较可见, 各组ATP均逐渐升高, 与同组前一时间点比较, A、B组术后24 h、3 d、5 d升高明显, 具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). C组术后12、24 h升高但无统计学差异, 3、5、7 d升高明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表4).

3 讨论

线粒体呼吸链存在上百种蛋白质, 线粒体基因编码13种蛋白质. 线粒体呼吸链的成分大部分均由核基因编码, 细胞核通过核转录因子如mtTFA及NRF等调控线粒体基因组的表达^[3-4]. 目前已证实细胞色素C还原酶和氧化酶、抗氧化物反应元件(antioxidant response element, ARE)及ATPase亚基的基因启动子中均具有NRF-1的功能性结合位点: 由于mtTFA含有NRF-1的结合位点^[5-7], 因此mtTFA也受到NRF-1的调节. mtTFA通过调节mtDNA的转录与复制, 从而调控mtDNA编码呼吸链蛋白亚基^[7-8].

mtDNA ATPase6亚基基因是编码ATP合酶复合体(FoF1-ATPase)疏水部分Fo的基因. FoF1-ATPase复合体位于线粒体内膜的基质侧, 主要由疏水部分Fo和亲水部分F1组成. 在电子传递过程中所释放的能量被用来将基质内的质子泵出到线粒体内膜外, 从而在线粒体内膜两侧产生电学梯度, 形成线粒体膜电位. 内膜外的质

子可通过复合体VF0亚基上的质子通道流回到基质内, 质子回流所释放的势能被用来使ADP磷酸化形成ATP^[9-10]. ATPase6基因是编码ATP合成的FoF1-ATPase复合体的一部分, 直接影响ATP的生成, 其基因的改变, 使其编码的呼吸链蛋白也将发生变化, 这必将影响ADP磷酸化形成ATP.

本实验观察到C组NRF-1、mtTFA mRNA在再灌注早期(12 h)表达明显降低, 相应的ATPase6 mRNA、ATP含量降低, 说明此时肝脏能量合成明显损伤, 并且冷保存时间越长, 这种损伤越重; 24 h后NRF-1、mtTFA mRNA表达升高, ATPase6 mRNA也随之升高, 同时ATP含量显著增高. 实验结果说明, 移植肝冷保存-再灌注后肝细胞损伤, 核编码的NRF-1、mtTFA mRNA表达和线粒体编码基因ATPase6 mRNA表达均降低, 线粒体酶活性下降, 从而损伤线粒体能量合成, 致使ATP生成减少. 随着NRF-1、mtTFA mRNA表达的升高, ATPase6 mRNA也随之增高, ATP含量也增高, 这与文献报道在缺氧复氧过程中线粒体ATPase活性明显下降, 导致线粒体能量代谢显著降低的结果一致^[10-11].

本试验也观察到冷保存时间越长, 再灌注后NRF-1、mtTFA mRNA表达回复正常的时间也相对较长, 表明线粒体DNA修复的时间也越长. 随着ATP含量的增高, NRF-1、mtTFA mRNA表达升高的趋势也逐渐降低, 说明ATP合成减少可

同行评价

本文结构清楚, 结论可靠, 学术价值较好, 但描述需要改进.

诱导NRF-1、mtTFA mRNA的表达,同时ATP生成又对NRF-1、mtTFA mRNA的表达起反馈调节作用,从而使能量合成经济、有效的进行,利于肝脏功能的恢复和发挥正常的功能。

本研究结果提示,随着冷保存时间的延长,ATPase6 mRNA表达下调,能量代谢障碍加重。推测氧自由基等造成mtDNA ATPase6基因表达异常,同时机体又有自身保护性反馈机制,氧自由基和ATP可能又作为第二信号诱导核基因mtTFA及NRF-1的表达,mtTFA和NRF-1可能通过基因转录调节ATPase6 mRNA表达,改变线粒体呼吸链转运电子、合成ATP的能力。因此,寻找阻止线粒体DNA损伤及促进其上游调节因子表达的策略和方法,对改善移植肝线粒体功能,促进移植肝尽早发挥正常功能具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, Lisowsky T, Azzarone A, Ierardi E, Frassanito MA, Francavilla R, Francavilla A. Molecular mechanisms of augments of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 217-225
- 2 张莹, 别平, 石承先, 张玉君, 吴乔, 李昆. “二袖套法”制备大鼠原位肝移植模型的方法改进. *消化外科* 2005; 4: 444-446
- 3 Yoshida Y, Izumi H, Ise T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Murakami T, Tanabe M, Nakayama Y, Itoh H, Kasai H, Kohno K. Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 945-951
- 4 Choi YS, Kim S, Kyu Lee H, Lee KU, Pak YK. In vitro methylation of nuclear respiratory factor-1 binding site suppresses the promoter activity of mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 118-122
- 5 Huo L, Scarpulla RC. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 644-654
- 6 Garstka HL, Schmitt WE, Schultz J, Sogl B, Silakowski B, Pérez-Martos A, Montoya J, Wiesner RJ. Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5039-5047
- 7 Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 570-579
- 8 Santos JH, Hunakova L, Chen Y, Bortner C, Van Houten B. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 1728-1734
- 9 Aksimentiev A, Balabin IA, Fillingame RH, Schulten K. Insights into the molecular mechanism of rotation in the Fo sector of ATP synthase. *Biophys J* 2004; 86: 1332-1344
- 10 Angevine CM, Herold KA, Fillingame RH. Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13179-13183
- 11 张莹, 别平, 吴乔, 李昆. 不同冷保存时间对大鼠移植肝脏能量代谢的影响. *第三军医大学学报* 2006; 28: 1959-1961

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;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。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 2008-07-28)

人肝癌细胞系HepG2与HepG2.2.15差异HLA结合肽的分离与鉴定

陈黎, 谢兴旺, 张恒辉, 费然, 丛旭, 魏来, 陈红松

陈黎, 谢兴旺, 张恒辉, 费然, 丛旭, 魏来, 陈红松, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044

陈黎, 北京大学医学部内科学硕士, 主要从事乙型肝炎病毒感染相关HLA结合肽的研究。

新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. 985-2-099-113

国家重点基础研究(973)计划资助项目, No. 2007CB512906

作者贡献分布: 此课题由陈黎, 陈红松, 谢兴旺及张恒辉设计; 研究过程由陈黎, 张恒辉及费然操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由费然与丛旭提供; 数据分析由陈黎, 谢兴旺, 张恒辉及陈红松完成; 本论文写作由陈黎, 谢兴旺及张恒辉完成, 并由陈红松与魏来修改。

通讯作者: 陈红松, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝病研究所. chen2999@sohu.com

电话: 010-88325726 传真: 010-68318386

收稿日期: 2008-05-03 修回日期: 2008-06-16

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-28

Identification of differential HLA-binding peptide between two hepatoma cell lines HepG2 and HepG2.2.15

Li Chen, Xing-Wang Xie, Heng-Hui Zhang, Ran Fei, Xu Cong, Lai Wei, Hong-Song Chen

Li Chen, Xing-Wang Xie, Heng-Hui Zhang, Ran Fei, Xu Cong, Lai Wei, Hong-Song Chen, Hepatology Institute, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Supported by: the Program for New Century Excellent Talents, No. 985-2-099-113; and the Major State Basic Research Development Program of China, No. 2007CB512906
Correspondence to: Hong-Song Chen, Hepatology Institute, Peking University People's Hospital, 11 Xizhimen Southern Street, Beijing 100044, China. chen2999@sohu.com

Received: 2008-05-03 Revised: 2008-06-16

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To screen the differential HLA-binding peptides between HepG2 and HepG2.2.15 cell lines, and to find some HLA-binding peptides correlated with hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: HepG2 and HepG2.2.15 cells were harvested (10^8 cells), and the peptides were isolated from the cell membrane by mild acid elution, respectively. Then the mixture of peptides was fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC) and the differential fractions only expressed in HepG2.2.15 cell line were identified by nanoESI-MS/MS analysis.

Bioinformatic analysis and MASCOT index were used to investigate the sequence and source of the peptides. Finally the expression of mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: HPLC fractions were markedly different between HepG2 and HepG2.2.15 cells. A peptide, SPDDPSRYISPDQ, from enolase 1 (ENO1) was obtained, which was only expressed in HepG2.2.15 cells, by nanoESI-MS/MS analysis. The result of RT-PCR confirmed that ENO1 expression was significantly higher in HepG2.2.15 cells than that in HepG2 cells.

CONCLUSION: A human peptide SPDDPSRYISPDQ from ENO1 can be presented on the surface of HepG2.2.15 cells by HLA, and ENO1 mRNA expression is significantly higher in HepG2.2.15 than that in HepG2, suggesting that HBV infection may cause the up-regulation of ENO1 expression.

Key Words: HepG2; HepG2.2.15; Hepatitis B virus; Enolase1; High performance liquid chromatography; Mass spectrometry

Chen L, Xie XW, Zhang HH, Fei R, Cong X, Wei L, Chen HS. Identification of differential HLA-binding peptide between two hepatoma cell lines HepG2 and HepG2.2.15. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2343-2348

摘要

目的: 分离并鉴定整合表达HBV的人肝癌细胞系HepG2.2.15及其母细胞系HepG2的差异HLA I类分子结合肽, 寻找与HBV感染相关的HLA结合肽。

方法: 洗涤法得到HepG2和HepG2.2.15细胞表面的HLA I类分子及与其结合的肽段。效液相色谱(HPLC)对两种细胞的洗脱肽段进行分离和图谱比较, 挑选出HepG2.2.15特有的峰段进行纳升电喷雾串联质谱(nanoESI-MS/MS)分析, 结合MASCOT数据库检索和从头测序, 分析多肽的序列和来源。后采用RT-PCR法进

■背景资料

慢性乙型肝炎(CHB)是我国最常见的慢性传染性疾病之一, 易于慢性化、重症化, 已经成为严重威胁人类健康的公共卫生问题。目前, 除干扰素和核苷类似物可使部分乙肝患者血清HBV DNA转阴外, 尚没有其他特效的治疗药物。因此, 开发同时有治疗与预防作用的HBV疫苗具有重要的理论意义及潜在巨大的经济及社会价值。

■同行评议者

林菊生, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所; 张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■研发前沿

乙肝疫苗经历了传统的血源疫苗到重组蛋白疫苗,到1990年代出现了DNA疫苗,伴随着DNA疫苗的发展出现了多表位DNA疫苗。蛋白质抗原不是通过完整的分子发挥作用的,抗原分子表位的研究成了近年来新的发展趋势;随着分子生物学及免疫学技术的日益成熟,大量表位得以鉴定,为特异性细胞免疫治疗奠定了基础。目前正在研制更好的HBV疫苗,如:DNA疫苗、含其他蛋白序列的HB疫苗、联合疫苗、单剂疫苗、口服疫苗等,以增强疫苗的免疫原性,简化乙肝疫苗接种。

行mRNA表达检测。

结果: HPLC对比显示HepG2和HepG2.2.15的HLA结合肽存在显著差异。利用nanoESI-MS/MS技术从HPLC差异峰段中分离鉴定出一条来源于已知蛋白人烯醇酶-1(enolase1, ENO1)的多肽SPDDPSRYISPDQ。RT-PCR结果显示, ENO1在HepG2和HepG2.2.15细胞中均有表达,且在HepG2.2.15细胞中表达明显高于HepG2细胞。

结论: 来自ENO1的多肽SPDDPSRYISPDQ能够被HLA I类分子提呈到HepG2.2.15细胞表面,且ENO1 mRNA在HepG2.2.15细胞中的表达显著高于HepG2细胞。提示HBV感染可能引起ENO1表达上调。

关键词: HepG2细胞; HepG2.2.15细胞; 乙型肝炎病毒; 烯醇酶-1; 高效液相色谱; 质谱

陈黎, 谢兴旺, 张恒辉, 费然, 丛旭, 魏来, 陈红松. 人肝癌细胞系HepG2与HepG2.2.15差异HLA结合肽的分离与鉴定. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2343-2348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2343.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的感染是一项严重的全球性公共卫生课题。据WHO估计^[1], 全球有20多亿人感染HBV, 而HBsAg携带者为3.5亿。我国属HBV感染高流行区, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%^[2]。HepG2.2.15细胞是由HepG2细胞衍生而来的稳定支持HBV复制、组装和分泌的细胞系, 是一个研究HBV生命活动的良好细胞系^[3]。HepG2.2.15不仅表现HepG2的生物学特性, 同时又因为其携带有HBV基因组而表达不同于HepG2的特性, 比如他可以分泌HBeAg及HBsAg^[4]。所以我们可以通过对比这两种细胞表面HLA分子结合的抗原肽寻找差异所在, 从而筛选出HepG2.2.15细胞所递呈的HBV特异性天然表位或者HBV感染相关蛋白来源的HLA结合肽, 为乙肝的免疫发病机制研究及预防治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞培养所用DMEM, 胎牛血清均购自Gibco公司; 色谱所用三氟乙酸、乙腈购自Sigma公司, C-18 Spe-Pak柱(经典型)购自Waters公司; 流式细胞所用抗体FITC标记的抗人的HLA-A2, 阴性对照为抗鼠的IgG, 均购自BD公司; 免疫组

化所用抗体为ABCam公司的抗鼠的HLA-A2。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HepG2购自ATCC, HepG2.2.15为本所保存。HepG2和HepG2.2.15用含100 mL/L胎牛血清, 100 mg/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基, 并于HepG2.2.15培养液中加入400 mg/L的G418; 细胞均于37℃, 50 mL/L CO₂孵箱培养。

1.2.2 弱酸法提取细胞表面结合肽: 每10⁸细胞与1 mL的柠檬酸缓冲液(0.131 mol/L枸橼酸, 0.066 mol/L磷酸氢二钠, 调节pH至3.3), 在室温下作用5 min, 离心, 4℃, 2000 r/min, 5 min^[5-6]。收集上清, 即为多肽混合液。为了验证后期实验的稳定性和可靠性, 我们将HepG2样品分成两份, 其中一份掺入一段来源于HCV的多肽(RLIVFPDLGV)做为参照。

1.2.3 弱酸洗脱细胞表面HLA结合肽效率的检测: 应用流式细胞术, 免疫荧光检测细胞表面HLA-A2的表达。

1.2.4 HPLC纯化: 从HepG2和HepG2.2.15细胞上提取的肽分别用反相HPLC系统(安捷伦, HP1100型)进行分馏。样品注入C18柱(4.6 mm×150 mm, Waters), 进行梯度洗脱, B液为0%-100%乙腈, A液为1 g/L TFA, 梯度设置如下: 0%-0% B 10 min, 0%-60% B 60 min, 60%-100% B 10 min, 100%-100% B 10 min, 流速1 mL/min。紫外检测214 nm, 280 nm。收集两种细胞差异的峰段, 冻干, -20℃保存。

1.2.5 NanoESI-MS/MS分析: 挑选出HepG2.2.15样品中特有峰段的馏分和两组HepG2样品的差异峰, 将他们分别溶于10 μL 1 g/L的TFA中, 注入带有电喷雾离子源的纳升电喷雾串联质谱仪(nanoESI-MS/MS)中。质谱仪的扫描范围500-15 000, 用于测定每个样品中肽段的分子量和质荷比。为了对天然肽进行MS测序, 每个肽段的撞击诱导解离(CID)的质谱结果都按单电荷的离子形式记录。

1.2.6 HLA结合肽的鉴定: NanoESI-MS/MS的结果采用MASCOT数据库检索和从头测序两种方法进行。我们主要通过MASCOT数据库检索的方法来确定多肽的来源和序列: 由Q-TOF质谱图得到的原始数据文件经Masslynx软件(Micromass公司)处理转换成.pkl文件, 然后提交到MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)上进行检索, 检索数据库为NCBI nr的人和病毒数据库。搜库参数设置如下: 酶切选用无酶切; 可

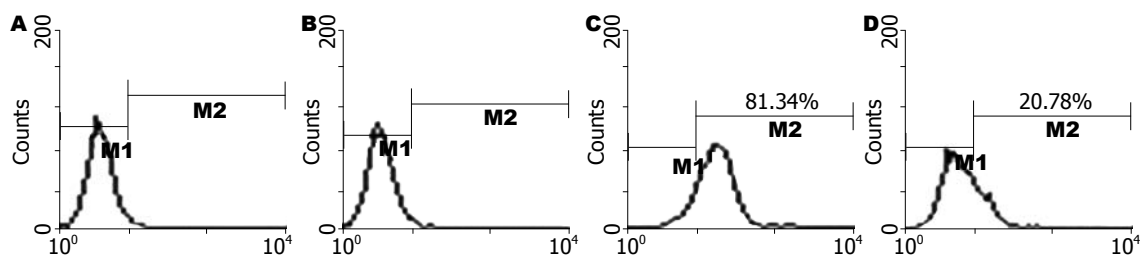


图1 HepG2.2.15细胞的流式分析结果. 用HLA-A2抗体标记细胞表面; A-B: 阴性对照; C: 酸处理前细胞, HLA-A2标记率为81.34%; D: 酸处理后细胞, HLA-A2标记率为20.78%. A, C: 洗脱前; B, D: 洗脱后.

■ 相关报道

Liu对105位中国乙肝患者核心抗原的研究发现, 93.3%缬氨酸突变位异亮氨酸(V27I). 突变后的多肽与HLA-A2分子有很高的结合力, 并且能在急性乙肝患者中引发特异性CTL反应, V27表位可以与I27表位特异性的CTL发生交叉反应, 反之则不然.

表1 RT-PCR引物及退火温度

基因	引物	退火温度(°C)	产物片段大小(bp)
ENO1	5'-GCGTTCAATGTCATCAATGG-3'	60	591
	5'-GTTGACTTTGAGCAGGAGGC-3'		
GAPDH	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'	60	114
	5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'		

变修饰选择M-氧化和C-烷基化; 母离子误差值设为 100×10^{-6} , 碎片离子为0.1 Da, $P < 0.05$; 肽段匹配的打分值超过显著性检验水准时初步判定该肽段的来源被鉴定. 另一方面, 质谱图经Micromass的专用软件MaxEnt3处理后, 借助Micromass的专用软件MasSeq直接推导出肽段序列, 同时对该质谱图进行手工读图确认, 判定原则为二级质谱中所有主要肽谱峰都与理论计算的片段离子相匹配. 从头测序的结果可以辅助已知肽段的鉴定, 还能够提供新的不能查找到来源的肽段的序列.

1.2.7 肽段HLA结合力的分析: 利用SYFPEITHI数据库中的算法对上述两个肽段的HLA结合力进行评分(<http://www.syfpeithi.de/scripts/MHCServer.dll/home.htm>). 在线预测的HLA位点限定在HepG2和HepG2.2.15已知的HLA分型: HLA-A2, HLA-A24, HLA-B51及HLA-B53^[7].

1.2.8 RT-PCR验证: 用RT-PCR法验证我们鉴定的多肽来源蛋白ENO1在HepG2.2.15和HepG2中的表达. ENO1 RT-PCR的引物及退火温度见表1, 循环条件为94°C 预变性5 min, 94°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 35个循环后接72°C延伸10 min^[8].

2 结果

2.1 弱酸洗脱细胞表面HLA I类分子及其结合肽的效率 利用流式细胞技术比较弱酸洗脱前后细胞表面的HLA-A2表达量发现, 经过弱酸处理后细胞表面的HLA-A2标记显著减少, 由洗脱前的81.34%减少到洗脱后的20.78%(图1). 利用免

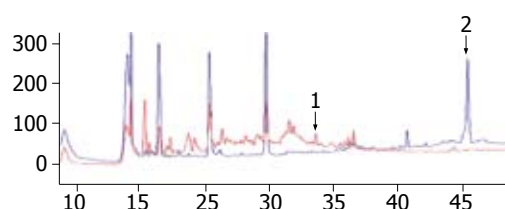


图2 HepG2和HepG2.2.15的HPLC色谱. HepG2: 蓝色; HepG2.2.15: 红色; 箭头1: 两种细胞的差异峰; 箭头2: HepG2.2.15细胞中掺入的HCV来源的参照多肽峰.

疫荧光技术比较洗脱前后细胞表面HLA-A2的量也得到类似结果. 提示弱酸处理能有效洗脱细胞表面的HLA I类分子及其结合的多肽.

2.2 HPLC的差异比较 以反向HPLC纯化分离肽段, 比较掺入HCV肽段的HepG2和未掺入HCV肽段的HepG2 HPLC图, 以及HepG2.2.15和HepG2细胞的HPLC图, 挑选出HepG2样品差异的峰段和HepG2.2.15细胞特有的峰段(图2), 进行质谱分析.

2.3 MS分析鉴定 从掺入HCV肽段和未掺入HCV肽段的HepG2弱酸洗脱液差异色谱峰中, 鉴定出了实验掺入的HCV肽段, 其序列为RLIVFP-DLGV. 同时从HepG2.2.15和HepG2的一个差异峰中, 鉴定出了1条人源的肽段, 即ENO1来源多肽: SPDDPSRYISPDQ(图3).

2.4 肽段HLA结合力的分析 利用SYFPEITHI数据库, 按照既定的HLA分型对ENO1的多肽HLA结合力进行了在线预测. 发现该肽段与HLA-B51的结合力为22分. 肽段结合力的预测结果见表2.

■创新盘点

本研究通过HPLC和nanoESI-MS/MS分析,直接在Hep G2.2.15细胞表面分离鉴定出与HLA结合的多肽,并确定其来源分别是ENO1.

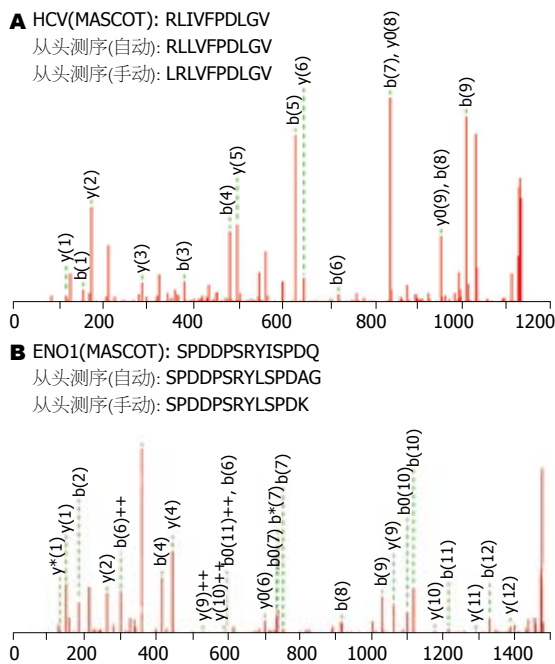


图3 被鉴定肽段的串联质谱。A: 掺入的参照HCV来源的多肽。M/Z: 564.87的离子质谱图, 该离子的MASCOT分析序列: RLIVFPDL, 自动从头测序的序列为RLLVFPDL; B: 人烯醇酶-1来源的多肽。M/Z: 738.8的离子质谱图, 该肽段的MASCOT分析序列: SPDDPSRYISPDQ.

2.5 烯醇酶-1在细胞中表达的验证 RT-PCR结果显示, ENO1在HepG2和HepG2.2.15细胞中均有表达, 且在HepG2.2.15细胞中表达明显高于HepG2细胞(图4)。

3 讨论

内源性抗原是指细胞内产生的非己成分, 以一种不同于外源性抗原加工和递呈的方式进行加工和递呈, 而被加工的内源性抗原肽与HLA I类分子结合形成复合体^[9]。淋巴细胞只能识别与HLA分子结合的限制性多肽(8-12个氨基酸), 即细胞表位(epitope)^[10]。弱酸洗脱法已经被证实可以有效的洗脱细胞表面HLA I类分子及其结合的多肽^[11-14]。我们以HepG2和HepG2.2.15细胞为研究对象, 大量培养两种细胞至 10^8 , 用弱酸洗脱法获得浓度较高的多肽洗液, 其中主要包含HLA I类分子及其结合多肽。然后利用HPLC和nanoESI-MS/MS分析, 寻找在HepG2和HepG2.2.15细胞有差异表达的HLA I类分子结合肽。

为了检测高效液相色谱联用串联质谱技术从多肽混合物中分离和鉴定多肽技术的稳定性和可靠性, 事先在HepG2的弱酸洗脱液中掺入了一段来自HCV聚合酶的参照肽段(RLIVFPDLGV)。HPLC分离出了在掺入HepG2

表2 已被鉴定肽段列表

多肽来源蛋白	HCV(参照多肽)	人烯醇酶-1
实际序列	RLIVFPDLGV	SPDDPSRYISPDQ
测序序列	LRLVFPDLGV	SPDDPSRYLSPDK
M/Z	564.87	738.8
理论分子量	1127.7254	1475.5854
实测分子量	1127.6703	1475.6528
Accession number	gi/13936941	gi/39644850
SYFPEITHI评分	未分析	22
HLA 分子	HLA-A*02	HLA-B*51

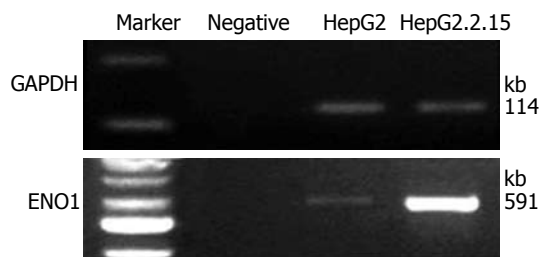


图4 HepG2和HepG2.2.15细胞中ENO1 mRNA的表达。

细胞弱酸洗脱液中的多肽并进行二级质谱分析。用质谱分析的原始.pkl文件在MASCOT数据库中进行检索分析, 我们成功地找到事先掺入的参照肽段, 同时质谱程序自动分析得到的序列为LRLVFPDLGV, 与肽段实际序列基本匹配。由此可见, HPLC联用nanoESI-MS/MS技术是一种有效的分离和鉴定多肽的方法。但这种方法也有一定的局限性, 从上述的分析结果可以看出, nanoESI-MS/MS不能精确区分谷氨酰胺/赖氨酸(Gln/Lys)和异亮氨酸/亮氨酸(Ile/Leu), 而且在读序列过程中偶尔会有前后氨基酸置换的现象。如果分离鉴定的是新的肽段, 从头测序的结果可能与实际的肽段序列有一定的差异。

应用同样的方法, 我们从HepG2和HepG2.2.15的一个较为明显的色谱差异峰中鉴定出了1条来源于人ENO1的多肽: SPDDPSRYISPDQ。既往的研究发现, ENO1的表达与包括HBV在内的多种病毒感染相关^[15-17]。最有意义的是, Yoon *et al*^[18]利用表达谱芯片发现ENO1在HBV相关性肝癌中的表达显著上调, 并进一步证实了ENO1在4个HBV相关性细胞系中的表达显著高于正常组织(HBV相关性细胞系: SNU354, SNU368, SNU387和SNU475)。我们的实验结果证实ENO1在HepG2.2.15中表达明显高于HepG2细胞, 这同上述的相关报道均提示HBV感染可能会引起ENO1的表达上调, 并参与

HBV导致的相关疾病的发生发展. 更为重要的是我们发现ENO1的SPDDPSRYISPDQ肽段能被HLA分子呈递于HepG2.2.15表面, 且肽段HLA结合力的分析表明该肽段与HLA-B51分子有较强的结合力, 提示他可能是被HLA-B51分子呈递的, 这与目前报道的HepG2.2.15细胞的HLA分型是吻合的. 现有的研究和进展均证实, HBV感染确实能够导致某些自身抗原出现, 而且这些自身抗原在乙肝的免疫发病过程中具有十分重要的作用^[19]. 精氨酸酶^[20]和230 kDa高尔基体相关蛋白(GCP230)^[21]就被证实为HBV感染相关的自身抗原. 另外, 也已有研究发现ENO1可以在一些自身免疫性疾病中作为自身抗原引起免疫反应^[22]. 所以, 我们推测来源于ENO1的多肽SPDDPSRYISPDQ很可能是与HBV感染引起的自身抗原表位, 需要进行更深入的研究来明确其在HBV免疫发病中的作用.

质谱技术已在蛋白组学研究中广泛使用^[23-28], 但在乙肝表位鉴定方面尚处于探索阶段. 通常情况下, 一个细胞表面有 10^5 - 10^6 个MHC I类分子, 呈递大约 10^4 个不同种类的肽^[29], 不同种类肽的丰度相差极大, 而病理衍生肽往往是低丰度的, 在检测时会被高丰度的自身肽掩盖^[30]. 因此对MHC I类分子结合肽的研究, 需要先进的分离和检测技术. 利用nanoESI-MS/MS技术可以对微量而又复杂的多肽混合物进行较准确的分析. 本实验利用HPLC和nanoESI-MS/MS分离鉴定出1条HepG2.2.15表面的HLA I类分子结合肽, 初步证实了HPLC联合nanoESI-MS/MS的方法在细胞HLA结合肽筛选过程中的可行性, 并展示了其快捷的优点.

本研究通过对HepG2和HepG2.2.15细胞株分析, 分离并鉴定出1条来自ENO1, 并能够被HLA I类分子提呈到HepG2.2.15细胞表面的肽段SPDDPSRYISPDQ. 且ENO1 mRNA在HepG2.2.15细胞中的表达明显高于HepG2细胞. 提示HBV感染可能引起ENO1表达的上调, 并被呈递到细胞表面. 这为进一步研究乙肝病毒感染相关的蛋白功能和免疫学致病机制的研究提供了重要线索.

4 参考文献

- 1 World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 dex, 2000-10, cited: 2008-05; 1(1): 24 screens. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/in.html>
- 2 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨,

白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658

- 3 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009
- 4 Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4641-4644
- 5 Sugawara S, Abo T, Kumagai K. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* 1987; 100: 83-90
- 6 Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Salter RD, Lotze MT. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14: 94-103
- 7 Datema G, Mulder A, Claas FH, van den Elsen PJ. Detection and characterization of HLA class I molecules in the supernatant of an hepatocarcinoma cell line and of EBV-transformed B cell lines. *Hum Immunol* 1999; 60: 435-441
- 8 Ito S, Honma T, Ishida K, Wada N, Sasaoka S, Hosoda M, Nohno T. Differential expression of the human alpha-enolase gene in oral epithelium and squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2007; 98: 499-505
- 9 Lau JY, Bird GL, Naoumov NV, Williams R. Hepatic HLA antigen display in chronic hepatitis B virus infection. Relation to hepatic expression of HBV genome/gene products and liver histology. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 888-895
- 10 Mitchison NA. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *Eur J Immunol* 1971; 1: 18-27
- 11 周迈, 彭吉润, 王红霞, 钟朝辉, 郭晏同, 潘秀英, 冷希圣. 利用质谱技术对肝癌组织中自然呈递的MAGE表位进行鉴定. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1395-1399
- 12 杨惠祥, 徐勇. 负载酸洗抗原肽的树突状细胞诱导抗膀胱癌的作用. 肿瘤防治研究 2006; 33: 352-354
- 13 朱学军, 曹雪涛, 雷虹, 于益芝, 王建莉, 章卫平, 马施华. 弱酸洗脱提取的肿瘤抗原肽致敏的树突状细胞对CTL的体内外激活效应. 中华微生物学和免疫学杂志 2000; 20: 98-101
- 14 刘清萍, 刘中华, 唐新科, 陈平, 梁宋平. 串联质谱在多肽测序中的应用. 生命科学研究 2004; 8: 112-116
- 15 Niikura M, Liu HC, Dodgson JB, Cheng HH. A comprehensive screen for chicken proteins that interact with proteins unique to virulent strains of Marek's disease virus. *Poult Sci* 2004; 83: 1117-1123
- 16 Ghosh AK, Steele R, Ray RB. Functional domains of c-myc promoter binding protein 1 involved in transcriptional repression and cell growth regulation. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2880-2886
- 17 Leong WF, Chow VT. Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection. *Cell Microbiol* 2006; 8: 565-580
- 18 Yoon SY, Kim JM, Oh JH, Jeon YJ, Lee DS, Kim JH, Choi JY, Ahn BM, Kim S, Yoo HS, Kim YS, Kim NS. Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells

■应用要点

目前, 治疗性乙肝疫苗的研究集中在针对乙肝优势表位的多表位乙肝疫苗上, 本实验提供了快速有效的筛选乙肝HLA结合肽的方法, 为后期乙肝优势表位的筛选奠定了理论基础.

■同行评价

本文题目较明确,研究方法较新颖,书写规范,可读性强,对临床医生开拓眼界有一定的帮助。

- using expressed sequence tags. *Int J Oncol* 2006; 29: 315-327
- 19 Pelli N, Fensom AH, Slade C, Boa F, Mieli-Vergani G, Vergani D. Argininosuccinate lyase: a new autoantigen in liver disease. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 455-461
- 20 Funaki T, Fujiwara T, Hong HS, Misumi Y, Nishioka M, Ikehara Y. Identification and characterization of a 230-kDa Golgi-associated protein recognized by autoantibodies from a patient with HBV hepatitis. *Cell Struct Funct* 1996; 21: 63-72
- 21 Chang GC, Liu KJ, Hsieh CL, Hu TS, Charoenfuprasert S, Liu HK, Luh KT, Hsu LH, Wu CW, Ting CC, Chen CY, Chen KC, Yang TY, Chou TY, Wang WH, Whang-Peng J, Shih NY. Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5746-5754
- 22 Ditzel HJ, Masaki Y, Nielsen H, Farnaes L, Burton DR. Cloning and expression of a novel human antibody-antigen pair associated with Felty's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9234-9239
- 23 Chen P, Zhang L, Li X, Wang X, Cao R, Liu Z, Xiong J, Peng X, Wei Y, Ying X, Wang X, Liang S. Evaluation of strategy for analyzing mouse liver plasma membrane proteome. *Sci China C Life Sci* 2007; 50: 731-738
- 24 Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
- 25 Liu J, Zhu P, Peng J, Li K, Du J, Gu J, Ou Y. Identification of disease-associated proteins by proteomic approach in ankylosing spondylitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 531-536
- 26 Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- 27 Juan HF, Chen JH, Hsu WT, Huang SC, Chen ST, Yi-Chung Lin J, Chang YW, Chiang CY, Wen LL, Chan DC, Liu YC, Chen YJ. Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: from mouse to human. *Proteomics* 2004; 4: 2766-2775
- 28 Hansson L, Rabbani H, Fagerberg J, Osterborg A, Mellstedt H. T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma. *Blood* 2003; 101: 4930-4936
- 29 Lemmel C, Stevanović S. The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* 2003; 29: 248-259
- 30 Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991; 352: 67-70

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, 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 2008-07-28)

整合素 $\alpha 6$ 在肝细胞癌黏附过程中诱导PI3K及MAPK双信号传导通路

乔世峰, 朱理玮

乔世峰, 天津医科大学博士后流动站, 天津医科大学总医院普外科 天津市 300052

朱理玮, 天津医科大学总医院普外科 天津市 300052

乔世峰, 2006年天津医科大学博士后流动站进站, 副主任医师, 主要从事肝脏肿瘤研究。

作者贡献分布: 乔世峰与朱理玮对此文贡献均等; 此课题由朱理玮设计; 研究过程及数据分析、论文的撰写由乔世峰完成。

通讯作者: 朱理玮, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院普外科. zhuliwei0804@126.com

电话: 022-60362876

收稿日期: 2008-04-16 修回日期: 2008-05-21

接受日期: 2008-05-27 修回日期: 2008-07-28

Integrin $\alpha 6$ induces PI3K and MAPK signal pathway in the adhesion of hepatocellular carcinoma

Shi-Feng Qiao, Li-Wei Zhu

Shi-Feng Qiao, Postdoctoral Station of Tianjin Medical University; Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Li-Wei Zhu, Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Li-Wei Zhu, Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. zhuliwei0804@126.com

Received: 2008-04-16 Revised: 2008-05-21

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To investigate the changes of signal pathways in the adhesion of hepatocellular carcinoma with extracellular matrix.

METHODS: BEL-7402 cells were cultured regularly on media containing laminin (LN) or bovine serum albumin (BSA, served as control matrix). After treatment with anti-integrin $\alpha 6$ monoclonal antibody, cell changes and integrin $\alpha 6$ -induced signal pathways were observed. Boyden chamber was used to detect cell migration and invasion ability. Western blot was adopted to analyze the phosphorylation of ERK. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to measure the expression of PI3K and Akt mRNA.

RESULTS: BEL-7402 cells adhered to different extracellular matrices within 30 min to 1 h without significance. The rate of cell adhesion on LN-coated substrate was 187.2%, but decreased to 104.4% after anti-integrin $\alpha 6$ monoclonal antibody treatment ($P < 0.05$). The number of BEL-7402 cells migrated through the Matrigel was 103.2 ± 16.5 per high power field (HPF), and anti-integrin $\alpha 6$ monoclonal antibody inhibited it to 88.7 ± 9.9 ($P < 0.01$). The expression levels of PI3K and Akt were up-regulated, and phosphorylation of ERK was increased after BEL-7402 cell adhered to LN; however, anti-integrin $\alpha 6$ monoclonal antibody partly inhibited the up-regulation and phosphorylation.

CONCLUSION: Cultured BEL-7402 cells highly express integrin $\alpha 6$. PI3K and ERK pathway is involved in the adhesion associated with LN and integrin $\alpha 6$.

Key Words: Integrin; Integrin; Laminin; Hepatocellular carcinoma; Signal transduction

Qiao SF, Zhu LW. Integrin $\alpha 6$ induces PI3K and MAPK signal pathway in the adhesion of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2349-2353

摘要

目的: 探讨肝细胞癌与细胞外基质发生黏附过程中所引起的信号转导通路的变化。

方法: LN作为细胞外基质, BSA作为对照基质, 常规培养人肝细胞癌细胞系BEL-7402细胞; 以整合素 $\alpha 6$ 单抗作用后检测细胞黏附于LN之后的变化以及所诱导的信号传导通路。Boyden小室检测细胞迁移及侵袭能力; Western blot分析检测细胞ERK磷酸化, RT-PCR方法检测PI3K及Akt基因mRNA表达的变化。

结果: 细胞在不同基质上发生黏附的时间为30 min-1 h, 但没有明显差异。细胞在LN基质上的黏附率为187.2%, 而以整合素 $\alpha 6$ 抗体作

■背景资料

原发性肝细胞肝癌恶性度高、较早即发生肝内外转移。黏附在转移过程中非常关键, 而层黏连蛋白及其整合素受体的相互作用在细胞与细胞外基质的黏附中诱导的信号转导通路的改变具有极其重要的作用。

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科; 梁力建, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

■研发前沿

在临床抗肝癌治疗中,整合素 $\alpha 6$ 有望成为一个新的亮点,寻找肝癌转移治疗的新途径和开发新的抗癌药物,减少肝癌的转移与复发,为该领域的研究热点。

用后黏附率为104.4%,细胞黏附率明显下降($P<0.05$)。BEL-7402细胞穿过Matrigel发生侵袭的细胞数分别为每高倍视野 103.2 ± 16.5 个,抗整合素 $\alpha 6$ 单抗10 mg/L作用后为 88.7 ± 9.9 个,有显著性差异($P<0.01$); BEL-7402细胞PI3K及Akt的表达在黏附于细胞外基质后明显增加,而且ERK磷酸化明显增加,整合素 $\alpha 6$ 抗体可以部分降低表达及磷酸化。

结论: 细胞在黏附过程中有PI3K及ERK两条传导信号分子参与,并与整合素 $\alpha 6$ 及LN相关。

关键词: 整合素; 层粘连蛋白; 肝细胞癌; 信号传导

乔世峰, 朱理玮. 整合素 $\alpha 6$ 在肝细胞癌黏附过程中诱导PI3K及MAPK双信号传导通路. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2349-2353

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2349.asp>

0 引言

肿瘤的侵袭和转移实质上是细胞与细胞及细胞与细胞外基质间由特定受体介导的一系列相互作用, LN是基底膜的非胶原糖蛋白, 参与多种生物学活性. 整合素 $\alpha 6$ 为细胞表面黏附分子类, 是LN的单特异性受体, 在很多肿瘤都有整合素 $\alpha 6$ 的表达和分布的变化^[1]. 癌细胞不断迁移扩散过程的核心是肿瘤细胞不断变化的对于黏附的选择, 在整合素介导的黏附中有大量的结构蛋白、骨架蛋白、信号分子及蛋白激酶等参与, 调节了细胞的运动性、极性、微管动力、细胞运输和细胞黏附^[2].

原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种恶性度高、较早即发生肝内外转移的肿瘤. 在大多数肝癌中可以检测到诱导产生的LN受体 $\alpha 6\beta 1$ 在细胞表面连续分布而且明显的与LN共表达^[3]. 整合素家族介导的细胞黏附具有重要作用, 整合素与配体结合后, 在细胞表面集结, 并可集结相关的多分子复合体, 形成黏着斑, 现在认为这些黏着复合物也是信号转导的特殊部位. 蛋白质磷酸化是整合素刺激后可检测到的最早发生的反应, PI3K/Akt通路和丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路广泛存在细胞中, 与肿瘤的侵袭、转移、预后相关^[4-5]. 我们以LN作为细胞外基质, 细胞黏附后以整合素 $\alpha 6$ 抗体阻断细胞与LN的相互作用, 检测PI3K/Akt和MAPK/ERK信号转导通路中信号蛋白水平和磷酸化水平的变化, 阐明LN与整合素 $\alpha 6$ 在肝细

胞癌转移过程中所诱导的信号转导途径。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640为GIBCO Co.产品; 抗整合素 $\alpha 6$ 抗体GoH3购自Chemicon; ABC法免疫组化检测试剂盒购自Santa Cruz公司; 鼠抗人 β -ERK1/2 mAb购自Santa Cruz公司. 抗 β -actin单抗购自Sigma; 化学发光试剂ECL、胶片均购自Santa Cruz公司; TRIzol试剂盒为Invitrogen产品; MMLV逆转录酶、dNTP为Promega公司产品; PCR试剂盒、Marker为天为时代公司产品; PCR引物由赛百盛生物工程公司合成. BEL-7402人肝癌细胞系由本室保存. 主要制品: Boyden小室、无PVP孔径8 μ m直径13 mm的聚碳酸酯膜、人工基膜(Matrigel)及下室趋化因子由北京大学医学部细胞学系提供。

1.2 方法 细胞在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基, 50 mL/L CO₂培养箱内, 37℃培养. 将基质LN以40 mg/L, 1 mL/cm²表面积的量加至培养板或培养瓶, 4℃包被过夜, 50 g/L BSA于37℃封闭40 min. 无血清RPMI 1640漂洗3次后备用. 对照组不加基质而仅以50 g/L BSA封闭. 培养的单层细胞经预冷并PBS漂洗后, 加入细胞裂解液, 用细胞刮棒把细胞集中, 经4℃ 12 000 g离心2 min去除细胞骨架成分, 取上清。

1.2.1 细胞黏附实验: 取状态良好的BEL-7402细胞, 使用前用PBS洗三次, 制成细胞悬液, 每100 μ L稀释液中含细胞8000个, 加入基质包被的96孔板中, 100 μ L/孔, 实验组加整合素 $\alpha 6$ 单抗(1:100), 对照组以PBS代替, 50 mL/L CO₂培养箱内37℃孵育1 h. 用无血清培养基100 μ L/孔轻柔漂洗3次以除去未黏附的细胞, 加入酸性磷酸酶底物应用液(0.2 mol/L乙酸钠缓冲液中含2 g/L TritonX-100、20 mmol/L硝基苯磷酸盐, pH5.5)100 μ L/孔, 37℃ 2 h, 加入1 mol/L NaOH 10 μ L/孔终止反应, 室温放置10 min, 全自动酶标仪405 nm处检测每孔的光吸收值。

1.2.2 Boyden Chamber检测细胞侵袭: 参照Albini *et al*^[6]的体外侵袭实验方法. BEL-7402细胞分组制备细胞悬液, 浓度为 3.5×10^8 /L, 安装好Boyden Chamber, 在Matrigel凝胶上加入细胞悬液200 μ L, 置于50 mL/L CO₂培养箱中于37℃培养18 h. 将膜固定后, 苏木精染色, 镜下观察. 每张膜随机选取5个高倍视野, 计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 每组细胞设3个复孔。

1.2.3 PI3K、Akt基因mRNA表达水平的检测: 按

■相关报道

LN受体 $\alpha 6\beta 1$ 在肝细胞癌细胞表面连续分布且明显与LN共表达, 与肝癌的发生发展密切相关. 整合素与配体结合后, 在细胞表面集结形成黏着斑, 现在认为这些黏着复合物也是信号转导的特殊部位, 引发了信号蛋白分子的磷酸化。

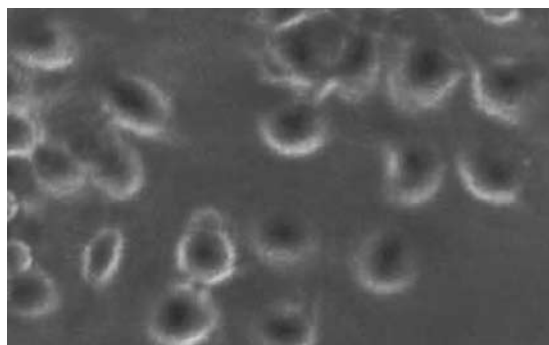


图1 BEL-7402肝癌细胞的黏附状态($\times 400$). 细胞以球形为主, 伪足很少见.

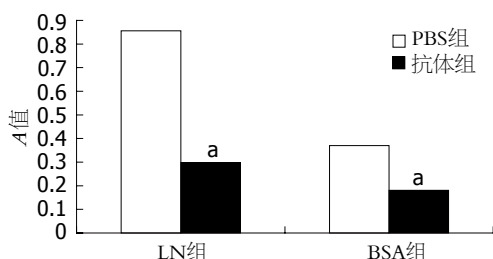


图2 酸性磷酸酶法检测BEL-7402细胞的黏附结果. $P < 0.05$ vs PBS组.

说明书提取培养BEL-7402细胞的RNA, 溶于20 μ L DEPC水中, 测定吸光值(A). 根据总RNA的浓度, 分别取1 μ g总RNA为模板, β -actin为内参, 进行半定量RT-PCR. PI3K基因有义链引物序列: 5'-CATCACTTCCTCCTGCTCTAT-3', 反义链引物序列: 5'-CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC-3', 产物377 bp; Akt基因有义链引物序列: 5'-GGACAACCGCCATCCAGACT-3', 反义链引物序列: 5'-GCCAGGGACACCTCCATCTC-3', 产物121 bp; 内参照 β -actin基因有义链引物序列: 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCC-3', 反义链引物序列: 5'-CTGGGGTGTGAAGGTCTC-3', 产物217 bp. PI3K、Akt扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min后进入30个循环(94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min; β -actin的PCR扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min预变性后开始32个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 最后于72 $^{\circ}$ C延伸10 min. PCR扩增产物在18 g/L琼脂糖凝胶上电泳分离.

1.2.4 Western blot检测细胞ERK磷酸化: 细胞约 5×10^6 /瓶, 消化悬浮后使细胞黏附于不同基质的平皿, 加入裂解缓冲液后, 置冰上裂解20 min, 4500 g离心10 min, 取上清液, 以120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白样品. 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉封闭过夜, 加

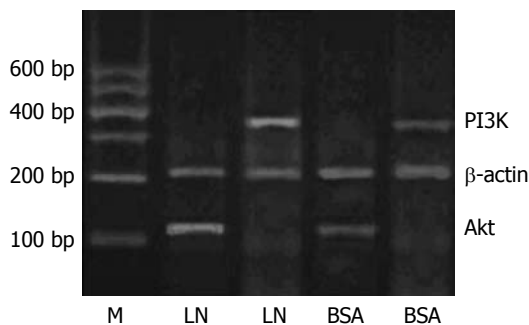


图3 BEL-7402细胞PI3K及Akt的表达. M: Marker.

入一抗, 次日加1:400稀释的一抗, 室温孵育1 h, 0.5 mL/L Tween 20-PBS洗5遍, 加入羊抗鼠-HRP(1:400), 室温孵育1 h, 室温下分别孵育1 h. 膜与化学发光增强剂反应5 min, 暗房中处理膜并覆盖底片, 曝光过夜, 经显影和定影, 冲洗底片并晾干. 以 β -actin为内参照.

统计学处理 所得数据以mean $\pm$ SD表示, 数据处理用SPSS11.0统计软件, 与对照组比较用 t 检验.

2 结果

2.1 细胞黏附实验 细胞在不同基质上发生黏附的时间为30-60 min, 没有显著性差异. 细胞呈球形, 很少有伪足伸出(图1). BEL-7402肝癌细胞的黏附以405 nm的A值表示, 在LN基质上A值为 0.856 ± 0.089 ; 在无基质包被的A值为 0.298 ± 0.034 , 二者相比较差异有显著意义($P < 0.05$). 用抗整合素 $\alpha 6$ 单抗10 mg/L作用后二者的黏附细胞均有减少, A值分别为 0.370 ± 0.042 和 0.181 ± 0.023 , 与抗体作用前相比较有显著性差异($P < 0.05$). LN组黏附率为187.2%, 抗体组为104.4%, 黏附率明显下降, 二者相比差异有显著意义($P < 0.05$, 图2).

2.2 Boyden小室检测BEL-7402细胞的侵袭 BEL-7402细胞穿过Matrigel发生侵袭的细胞数分别为每高倍视野 103.2 ± 16.5 个, 抗整合素 $\alpha 6$ 单抗10 mg/L作用后为 88.7 ± 9.9 个, 穿膜的细胞数明显减少, 有显著性差异($P < 0.01$).

2.3 PI3K mRNA、Akt mRNA在肝癌细胞中的表达 PI3K基因RT-PCR产物为377 bp; Akt基因RT-PCR产物为121 bp; 内参照 β -actin基因RT-PCR产物217 bp. BEL-7402细胞PI3K及Akt的表达在黏附于细胞外基质LN后明显增加(图3).

2.4 细胞裂解后Western blot分析检测ERK磷酸化 利用Western blot技术检测BEL-7402细胞p-ERK1/2的磷酸化情况. 结果表明, 细胞在LN上

■ 创新盘点

本文利用肝细胞癌细胞系, 以LN作为细胞外基质, 探讨肝细胞肝癌在与LN发生黏附过程中所引起的信号转导通路的变化, 发现LN及其整合素 $\alpha 6$ 受体在黏附过程中起重要的作用, 并诱导了PI3K和MAPK两条信号传导通路.

■应用要点

肿瘤细胞的转移过程中启动了多个信号传导通路,本文进一步证实了整合素 $\alpha 6$ 在肝癌转移的重要作用,细胞黏附于LN后通过整合素 $\alpha 6$ 诱导了PI3K及MAPK两条信号传导通路,对于揭示肿瘤细胞转移的机制提供了新的证据。

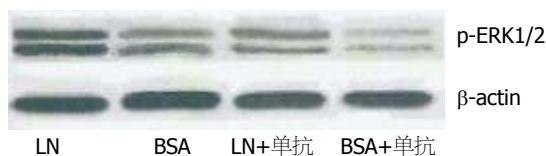


图4 BEL-7402细胞p-ERK1/2的表达。

黏附后p-ERK1/2的磷酸化明显增加;在经整合素 $\alpha 6$ 单抗10 mg/L作用后p-ERK1/2的磷酸化略有下降(图4)。

3 讨论

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,复发与转移是影响疗效、延长生存期的主要障碍^[7]。目前对该病的病因及发病机制认识尚不清楚,死亡率较高。肿瘤的转移是一个多阶段复杂的过程,其中细胞黏附在癌细胞侵袭转移过程中发挥着重要作用,实际上癌细胞不断迁移扩散过程的核心是肿瘤细胞不断变化的对于黏附的选择。整合素 $\alpha 6$ 为细胞表面黏附分子类,主要和 $\beta 1$ 及 $\beta 4$ 亚单位结合,组成 $\alpha 6\beta 1$ 和 $\alpha 6\beta 4$,是LN的单特异性受体。LN是各种基膜的主要成分,它的合成和降解始终伴随着肿瘤细胞侵袭和转移的每一个环节。在很多肿瘤都有整合素 $\alpha 6$ 的表达和分布的变化,整合素与配体结合后,在细胞表面集结相关的多分子复合体,形成黏着斑,现在认为这些黏着复合物也是信号转导的特殊部位。

肿瘤的发生、发展是细胞与细胞外基质共同参与的多步骤的过程,肝癌与 $\alpha 6$ 整合素有密切的关系,在大多数肝癌中可以检测到诱导产生的 $\alpha 6\beta 1$,在细胞表面连续分布而且明显的与LN共表达,表达水平与患者的预后呈负相关^[8]。我们以BEL-7402为靶细胞,以LN铺板作为细胞外基质,BSA为对照组,用抗整合素 $\alpha 6$ 抗体阻断 $\alpha 6$ 受体与LN基质的结合,在黏附实验中发现BEL-7402细胞在不同基质上发生黏附的时间为30-60 min,没有显著性差异。细胞呈球形,很少有伪足伸出,一般在1 h后开始有细胞铺展,伸出伪足。细胞在LN基质上的黏附率较对照组明显增加,而以整合素 $\alpha 6$ 抗体作用后细胞的黏附有明显的抑制作用,细胞黏附率明显下降,差异具有统计学意义,表明细胞在黏附过程中的确有整合素 $\alpha 6$ 和LN的参与,起促进黏附的作用。基底膜是阻止肿瘤细胞侵袭转移的机械屏障,其主要功能性成分LN在调节肿瘤细胞的迁移、侵袭和增殖过程中起活跃的促进作用。Matrigel是一种人工基膜,主要

成分为LN、IV型胶原、硫酸乙酰肝素等,有报道认为肿瘤细胞穿过铺板的Matrigel的能力与他们在动物体内迁移的能力相一致,可以代表肿瘤的侵袭能力^[9]。我们的结果发现,抗整合素 $\alpha 6$ 单抗可以降低BEL-7402细胞的穿膜能力,我们还另有实验发现MMP的分泌也同时减少,表明整合素 $\alpha 6$ 和LN与BEL-7402细胞的侵袭表型相关。

信号传导通路的异常改变是肿瘤细胞的重要生物学特性,蛋白质磷酸化是整合素刺激后可检测到的最早发生的反应。PI3K/Akt通路广泛存在细胞中^[10],是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路,影响细胞的存活和凋亡,且与肿瘤的侵袭、转移、预后相关。PI3K(phosphoinositide 3-kinase)主要由一个催化亚基和一个调节亚基构成,本身既具有Ser/Thr激酶的活性,也具有磷脂酰肌醇激酶的活性。Akt又称蛋白激酶B,有报道Akt-蛋白激酶B的激活在肝细胞癌的发生、发展中起了重要的作用。另一与肝癌的发生有关的信号转导通路为Ras-MAKP异常^[11],MAPK是一组可以被多种细胞外信号激活的丝/苏氨酸激酶。ERK(extracellular signal-regulated kinase)是一类具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,主要有ERK1/2两种亚型,是最早发现的经典的MAPK信号转导途径。整合素介导的细胞与基底膜间的相互作用调节细胞的极性、迁移、增殖、分化和细胞的存活^[12]。我们的结果发现PI3K及Akt的表达在黏附于细胞外基质后明显增加;LN及整合素 $\alpha 6$ 的相互作用同样促进了蛋白表达的变化,细胞在黏附过程中同时启动了MAKP和PI3K两条信号传导通路,并与LN及整合素 $\alpha 6$ 相关。

4 参考文献

- 1 Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 724-730
- 2 Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. The polarized distribution of Na^+ , K^+ -ATPase and active transport across epithelia. *J Membr Biol* 2001; 184: 299-304
- 3 Liu LX, Jiang HC, Liu ZH, Zhou J, Zhang WH, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Integrin gene expression profiles of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 631-637
- 4 Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Laing A, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP. Phosphoinositide 3-kinase accelerates postoperative tumor growth by inhibiting apoptosis and enhancing resistance to chemotherapy-induced apoptosis. Novel role for an old enemy. *J Biol Chem*

- 2005; 280: 20968-20977
- 5 Zeng P, Wagoner HA, Pescovitz OH, Steinmetz R. RNA interference (RNAi) for extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) alone is sufficient to suppress cell viability in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 961-967
- 6 Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3239-3245
- 7 王凤山, 刘永峰. 转移性肝癌的治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 115-119
- 8 Torimura T, Ueno T, Kin M, Inuzuka S, Sugawara H, Tamaki S, Tsuji R, Sujaku K, Sata M, Tanikawa K. Coordinated expression of integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1997; 28: 1131-1138
- 9 Kim WH, Lee BL, Kim DK, Kleinman HK. Laminin-1-adherent cancer cells show increased proliferation and decreased apoptosis in vivo. *Anticancer Res* 1999; 19: 3067-3071
- 10 Voigt P, Brock C, Nürnberg B, Schaefer M. Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Biol Chem* 2005; 280: 5121-5127
- 11 Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002; 277: 33676-33682
- 12 李兴睿, 郭悦青, 易继林. 整合素 $\beta 1$ 和固生蛋白 Tenascin共表达与肝癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 100-103

■同行评价

本文是一篇研究信号转导通路对肝癌发生和发展影响的较好文章, 但只是体外肝癌细胞株的研究, 其研究的范围和影响有限, 但文章资料可靠, 结果有说服力, 学术价值较好。

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 ●

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量, 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 $\pm$ 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素 B_1 、维生素 B_2 、维生素 B_6 、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素 B_{12} 用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)

姜黄素对缺氧HepG2细胞中HIF-1 α 表达的影响及可能机制

侯伟, 覃华, 刘爽, 王颖, 刘南植, 赵秋, 田德安

■背景资料

缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是调节机体氧稳态平衡的重要转录因子, 与肿瘤缺氧诱导的血管发生有关。中药姜黄系活血化瘀药, 辛温、无毒。姜黄素是姜黄最重要的活性成分, 近来研究发现他能抑制实体肿瘤的血管生成。

侯伟, 覃华, 王颖, 刘南植, 赵秋, 田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

刘爽, 湖北省疾病预防控制中心卫生监督检验防护所 湖北省武汉市 430079

侯伟, 2003年华中科技大学同济医学院硕士, 主要从事消化系统疾病的临床和基础研究。

作者贡献分布: 此课题由侯伟, 赵秋, 刘南植及田德安设计; 研究过程由侯伟, 覃华, 刘爽及王颖操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵秋提供; 数据分析由侯伟与刘爽完成; 本论文写作由侯伟与赵秋完成。

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. zhaoqiu461@163.com 电话: 027-83663208

收稿日期: 2008-04-25 修回日期: 2008-06-03

接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-07-28

Effect of curcumin on hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in hepatocellular carcinoma cells HepG2 under hypoxia and its possible mechanism

Wei Hou, Hua Qin, Shuang Liu, Ying Wang, Nan-Zhi Liu, Qiu Zhao, De-An Tian

Wei Hou, Hua Qin, Ying Wang, Nan-Zhi Liu, Qiu Zhao, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Shuang Liu, Institute of Health Surveillance and Protection, Hubei Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zhaoqiu461@163.com

Received: 2008-04-25 Revised: 2008-06-03

Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To study the effect of curcumin on hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) expression in HepG2 hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions as well as the possible mechanism.

METHODS: HepG2 cells were treated with different concentrations (0, 1, 2, 5, 10 μ mol/L) of curcumin under hypoxic conditions for 6 h. The protein and mRNA levels of HIF-1 α were de-

tected by Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. Then HepG2 cells were treated with 0, 10 μ mol/L curcumin, or 10 μ mol/L curcumin plus 10 μ mol/L MG-132 under hypoxic conditions for 6 h. The protein levels of HIF-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blot.

RESULTS: After HepG2 cells were co-incubated with curcumin (1-10 μ mol/L) for 6 h, the protein level of HIF-1 α decreased significantly as compared with that in the control cells (0 μ mol/L curcumin treatment), in a dose-dependent manner ($F = 79.81$, $P < 0.01$), but the mRNA level of HIF-1 α was not affected by curcumin. In the presence of MG-132, a proteasome inhibitor, the HIF-1 α and VEGF protein levels decreased by curcumin was restored to the level of control cells ($F = 68.47$, 83.79 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Curcumin suppresses HIF-1 α expression at post-transcriptional level in HepG2 cells under hypoxia, probably via proteasome-dependent pathway.

Key Words: Curcumin; Hepatocellular Carcinoma; Anoxia; Hypoxia-inducible factor-1; Vascular endothelial growth factor

Hou W, Qin H, Liu S, Wang Y, Liu NZ, Zhao Q, Tian DA. Effect of curcumin on hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in hepatocellular carcinoma cells HepG2 under hypoxia and its possible mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2354-2358

摘要

目的: 研究姜黄素对缺氧条件下人肝癌细胞HepG2中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达的影响, 并探讨其可能机制。

方法: 0、1、2、5、10 μ mol/L的姜黄素处理缺氧条件下的HepG2细胞6 h后, 用Western blot免疫印迹法和RT-PCR检测HIF-1 α 的蛋白及mRNA的表达; 0 μ mol/L, 10 μ mol/L姜黄素, 10 μ mol/L姜黄素+10 μ mol/L MG-132处理缺氧条件下的HepG2细胞6 h后, 用Western blot

■同行评议者

姚希贤, 教授, 河北医科大学附属医院第二医院消化内科

检测HIF-1 α 和VEGF的蛋白水平.

结果: HepG2细胞经1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理后, HIF-1 α 蛋白水平与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理)比较明显降低($F = 79.81$, $P < 0.01$), 且降低程度随着姜黄素处理浓度的增加而变大, 但各剂量组HIF-1 α 的mRNA水平与对照组比较无显著性差异; 蛋白酶体抑制剂MG-132可以逆转姜黄素所致的HepG2细胞内HIF-1 α 和VEGF蛋白表达抑制($F = 68.47$, 83.79 , 均 $P < 0.01$).

结论: 姜黄素通过蛋白酶体途径, 在转录后水平抑制缺氧HepG2细胞的HIF-1 α 表达.

关键词: 姜黄素; 肝细胞癌; 缺氧; 缺氧诱导因子-1; 血管内皮生长因子

侯伟, 覃华, 刘爽, 王颖, 刘南植, 赵秋, 田德安. 姜黄素对缺氧HepG2细胞中HIF-1 α 表达的影响及可能机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2354-2358
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2354.asp>

0 引言

肿瘤的主要特征是肿瘤细胞的快速生长并伴缺氧微环境的形成^[1]. 在缺氧条件下, 肿瘤细胞为了继续生长, 启动一系列缺氧适应性反应, 其中就包括缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)相关的基因诱导. HIF-1是维持肿瘤细胞氧平衡的重要转录因子, 在缺氧条件下转运入核, 与缺氧反应元件结合, 促进靶基因转录^[2]. HIF-1由 α 和 β 亚基组成, 其中HIF-1 α 是受氧分子调节的主要功能亚基. 人体肿瘤组织中HIF-1 α 高水平表达, 表达程度与肿瘤的进展程度、转移和放/化疗抵抗力正相关^[3-7]. 异源肿瘤模型也证实了HIF-1 α 高表达与肿瘤的生长和血管生成密切相关^[8]. 所以HIF-1 α 已成为许多癌症研究的重点, HIF-1 α 抑制剂也被应用于癌症化疗. 姜黄素是天然黄酮类化合物, 具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、降血脂等多种药理作用^[9-10], 美国国立肿瘤研究所已将其列为癌症化学预防药物, 进入一期临床试验. 姜黄素的抗癌机制复杂^[11], 是否也作为一种HIF-1 α 抑制剂来发挥其抗癌效益, 目前的研究和报道并不多. 故本实验选取人肝癌HepG2细胞作为研究对象, 观察姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞的HIF-1 α 及HIF-1 α 靶基因血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达影响, 以研究HIF-1 α 在姜黄素抗肝癌机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG2细胞为同济医院肝病研究所自备, DMEM高糖培养基和胎牛血清(美国Gibco公司), 姜黄素和氯化钴(美国Sigma公司), 蛋白酶体抑制剂MG-132(美国Alexis公司), CO₂恒温细胞培养箱(日本Sanyo公司), 鼠抗人HIF-1 α 抗体和鼠抗人VEGF抗体(美国Santa Cruz公司), 鼠抗 α -tubulin抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(美国Sigma公司), 蛋白定量试剂盒、电泳和转膜装置(美国Bio-rad公司), 增强化学发光剂(ECL)和显影暗盒(英国Amersham公司), 显影胶片(英国宝丽莱T667胶片), 莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶试剂(美国Promega公司), Taq DNA聚合酶(美国MBI公司), β -actin和HIF-1 α 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成, PCR仪和图像分析(德国Biometra公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HepG2细胞中加入含50 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 置于50 mL/L CO₂、37℃、饱和湿度的常氧环境培养箱内培养, 待细胞贴壁融合至80%时更换新鲜无血清培养基, 继续培养24 h后, 细胞进入试验. 为了充分模拟缺氧微环境, 将培养箱调至50 mL/L CO₂、950 mL/L N₂、37℃、饱和湿度的缺氧条件, 并在细胞缺氧培养前5 min往培养基内添加终浓度300 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴^[12].

1.2.2 实验设计与分组: 细胞缺氧培养同时, 分别加入终浓度为0、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用6 h; 细胞缺氧培养同时, 分别加入0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+10 $\mu\text{mol/L}$ MG-132作用6 h. 作用完成后收集细胞, 提取细胞蛋白和mRNA. 以0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用的HepG2细胞作为对照组.

1.2.3 Western blot免疫印迹法检测HIF-1 α 和VEGF的蛋白表达水平: 用细胞裂解液溶解细胞后提取全细胞蛋白并定量, 将点样蛋白浓度调成一致后电泳分离、转膜. 转膜后的硝酸纤维素膜用50 g/L脱脂奶粉缓冲封闭液4℃封闭过夜, 加一抗HIF-1 α (1:200)或一抗VEGF(1:200)室温振摇孵育2 h, 洗膜30 min后加二抗(1:8000)室温振摇孵育2 h, 再洗膜30 min除去未结合的二抗后, 暗盒显影. 免疫反应带用ELC试剂盒检测, 化学发光信号用自显影胶片记录. Biometra图像分析仪对条带积分吸光度进行定量分析. 内参选用 α -tubulin, 用HIF-1 α / β -actin和VEGF/ β -actin分别表示HIF-1 α 和VEGF的蛋白相对表达量. 每

■研究前沿

抑制肿瘤血管新生是当前抗肿瘤治疗的重要策略之一. 研究肿瘤血管生成抑制的靶点, 并针对性地研发安全、有效的抗肿瘤血管新生药物, 是肿瘤防治研究领域的热点.

■创新盘点

本文观察了不同剂量姜黄素作用下,人肝癌细胞HepG2在缺氧环境中HIF-1 α 表达的变化,并探讨了可能的分子机制。发现姜黄素是在转录后水平通过蛋白酶体途径使HIF-1 α 降解失活,继而下调HIF-1靶相基因VEGF的表达,抑制肿瘤血管生成。

表 1 HepG2细胞的HIF-1 α 表达水平

剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	HIF-1 α 蛋白 (HIF-1 α / α -tublin)	HIF-1 α mRNA (HIF-1 α / β -actin)
0	0.689 $\pm$ 0.068	0.504 $\pm$ 0.086
1	0.523 $\pm$ 0.032 ^a	0.544 $\pm$ 0.088
2	0.353 $\pm$ 0.031 ^b	0.526 $\pm$ 0.093
5	0.218 $\pm$ 0.019 ^b	0.519 $\pm$ 0.041
10	0.132 $\pm$ 0.009 ^b	0.567 $\pm$ 0.085

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ 组。

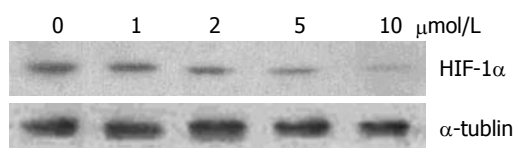


图 1 姜黄素处理对缺氧条件下HepG2细胞内HIF-1 α 蛋白表达的影响。

个实验组重复3次计算统计量。

1.2.4 RT-PCR检测HIF-1 α 的mRNA水平: 按照TRIzol说明书方法提取细胞mRNA, 测总RNA浓度和纯度。在25 μL 逆转录反应体系中, 以1 μg 总RNA为模板, 以随机引物Random 9mers为引物, 用M-MLV逆转录酶将mRNA逆转录为cDNA。取3 μL 逆转录产物cDNA, 用Taq DNA聚合酶进行PCR反应, PCR反应体积25 μL 。以 β -actin作为内参。引物序列如下: HIF-1 α : 上游引物5'-CAA AAC ACA CAG CGA AGC-3', 下游引物5'-TCA ACC CAG ACA TAT CCA CC-3', 扩增产物长度473 bp; β -actin: 上游引物5'-CAT CAC TAT CGG CAA TGA GC-3', 下游引物5'-GAC AGC ACT GTG TTG GCA TA-3', 扩增产物长度156 bp。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min后, HIF-1 α : 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min; β -actin: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min。30个循环后72 $^{\circ}\text{C}$ 维持5 min, PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统进行半定量分析, 用HIF-1 α / β -actin表示HIF-1 α 基因的相对表达量。每个实验组重复3次计算统计量。

统计学处理 实验数据用mean $\pm$ SD表示, 使用SPSS12.0软件进行组间方差分析。

2 结果

2.1 不同剂量姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞内HIF-1 α 表达影响 1 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理使HepG2细胞缺氧6 h后的HIF-1 α 蛋白表达明显下降, 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 2、5、

表 2 姜黄素在蛋白酶体抑制剂加入后对缺氧HepG2细胞的HIF-1 α 和VEGF蛋白表达

分组	HIF-1 α 蛋白 (HIF-1 α / α -tublin)	VEGF蛋白 (VEGF/ α -tublin)
对照组	0.807 $\pm$ 0.079	0.754 $\pm$ 0.084
姜黄素	0.223 $\pm$ 0.018 ^a	0.057 $\pm$ 0.005 ^a
姜黄素+ MG-132	0.863 $\pm$ 0.081 ^b	0.679 $\pm$ 0.073 ^b

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 姜黄素组。

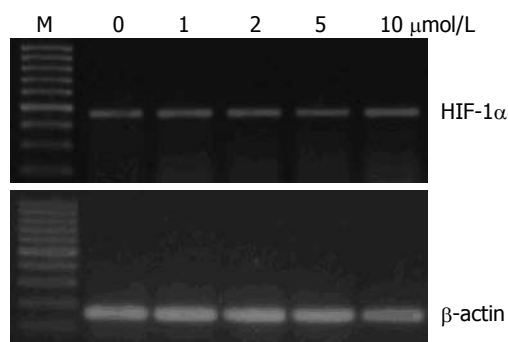


图 2 姜黄素处理对缺氧条件下HepG2细胞内HIF-1 α mRNA表达的影响。M: Marker。

10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的处理使HepG2细胞内HIF-1 α 蛋白表达水平的下降更为明显, 各剂量组与对照组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 且呈一定的剂量效应关系; 1-10 $\mu\text{mol/L}$ 各个剂量组姜黄素处理的HepG2细胞, 缺氧6 h后的HIF-1 α mRNA表达水平与对照组相比, 差异无显著性(图1-2, 表1)。

2.2 蛋白酶体抑制剂作用下, 姜黄素对缺氧HepG2细胞内HIF-1 α 和VEGF的蛋白表达影响 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理使HepG2细胞缺氧6 h后的HIF-1 α 蛋白和VEGF蛋白表达明显下降, 与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素与10 $\mu\text{mol/L}$ MG-132共同处理后, 缺氧HepG2细胞内的HIF-1 α 蛋白和VEGF蛋白表达水平与姜黄素处理组相比均明显上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 接近对照组水平(表2, 图3)。

3 讨论

姜黄素是从姜科植物姜黄根茎中提取的酚性色素, 是姜黄最重要的生物活性成分, 因其对多种肿瘤的抑制作用, 被视为有极大开发前景的癌症预防及治疗药物^[13-14]。姜黄素的抗癌作用复杂, 研究发现他通过正相调节谷胱甘肽转移酶^[15]、抑制细胞色素P450^[16]、减轻氧化应激^[9]

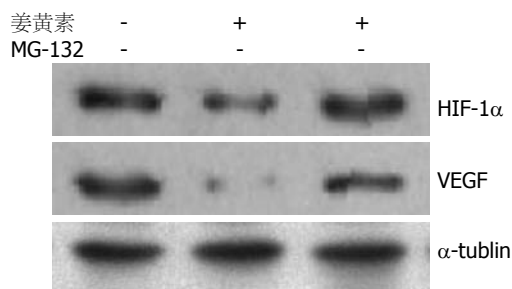


图 3 姜黄素和MG-132对缺氧HepG2细胞内HIF-1 α 和VEGF的蛋白表达影响。

和炎症^[17]、抑制肿瘤生长^[18]、诱导细胞周期停滞与凋亡^[19]或抑制血管生成^[20]等,阻止肿瘤的起始和形成。最近有研究发现姜黄素还能直接抑制体外血管内皮细胞增殖和体内毛细血管的形成^[21-23]。这证明姜黄素肿瘤的预防效能起码有部分是因为他对血管生成的直接抑制。但是姜黄素拮抗肿瘤血管形成作用的分子基础和其作用靶分子还未阐明。

HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 组成的异源二聚体,是调节哺乳动物机体氧稳态平衡的重要转录因子,广泛存在于各种实体肿瘤中,与肿瘤缺氧诱导的血管发生有关^[8,24]。HIF-1 α 是HIF-1的功能性亚基,在常氧条件下不断通过泛素-蛋白酶体途径水解,缺氧条件下则因降解受阻而在胞质内聚集,转位入核与HIF-1 β 结合成HIF-1分子,并与缺氧反应元件结合,启动下游靶基因转录^[25]。杜静 *et al*^[26]的实验观察到,人肝癌细胞HepG2在缺氧条件下, HIF-1 α 和其调控基因VEGF等的表达较常氧条件下显著升高。而我们的实验发现,姜黄素能明显抑制缺氧HepG2细胞的HIF-1 α 蛋白表达。这与Bae *et al*^[27]的实验结果相似。上述结果提示HIF-1 α 很可能是姜黄素抗肝癌作用的靶分子,姜黄素通过抑制其表达或活性来调控多种促肿瘤生长相关基因表达,从而抑制肝癌的发生和发展。同时我们还发现,姜黄素在下调HIF-1 α 蛋白水平的同时并没有改变HIF-1 α 的mRNA表达,说明姜黄素对HepG2细胞内HIF-1 α 的抑制效应不是发生在转录水平,而是在转录后水平使HIF-1 α 失稳,影响其活性。最近有报道称,姜黄素可诱导细胞内p53的聚集,从而间接抑制HIF-1 α 的稳定性,促进泛素-蛋白酶体对HIF-1 α 蛋白的降解^[28-29]。为了验证上述观点,我们引入蛋白酶体抑制剂MG-132,发现MG-132可以逆转姜黄素对HIF-1 α 蛋白和VEGF蛋白的抑制作用。结果提示姜黄素很可能是依赖蛋白酶体途径来降低HIF-1 α 蛋白的稳定性和

活性。但是姜黄素通过蛋白酶体途径使HIF-1 α 失稳的确切机制还需要进一步研究。

抗缺氧诱导的肿瘤血管生成是目前肿瘤治疗的研究热点之一^[30]。我们的实验发现姜黄素通过蛋白酶体途径,在转录后水平促使缺氧HepG2细胞的HIF-1 α 降解失活,继而下调HIF-1靶相基因VEGF的表达,抑制肿瘤血管生成,延缓肿瘤生长。这提示天然黄酮姜黄素可能作为HIF-1 α 抑制剂,成为未来安全有效的肝癌预防与治疗剂。同时,我们的研究也为开发和筛选新型临床抗肝癌药物提供了一定的理论依据。

4 参考文献

- 1 Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-6465
- 2 Hägg M, Wennström S. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Exp Cell Res* 2005; 306: 180-191
- 3 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 4 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenacker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4693-4696
- 5 杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波. 食管鳞癌细胞系EC-109中缺氧诱导因子-1 α 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1247-1251
- 6 Zhao Q, Du J, Gu H, Teng X, Zhang Q, Qin H, Liu N. Effects of YC-1 on hypoxia-inducible factor 1-driven transcription activity, cell proliferative vitality, and apoptosis in hypoxic human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2007; 34: 242-247
- 7 孙威, 张丹丹, 郭琳, 王强. HIF-1 α 及其调控基因PTEN在胃癌中表达的相互关系及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2847-2851
- 8 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 4010-4015
- 9 Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 1995; 94: 79-83
- 10 Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, Reddy BS. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 597-601
- 11 Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 363-398
- 12 Huang Y, Du KM, Xue ZH, Yan H, Li D, Liu W, Chen Z, Zhao Q, Tong JH, Zhu YS, Chen GQ. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-

■应用要点

本文研究姜黄素抑制肿瘤血管生成可能的作用靶分子,为寻找新的抗癌治疗靶点和开发、筛选新型临床抗肝癌药物提供一定的理论依据。

■同行评价

本研究对照设计合理, 结论明确, 具有一定的创新性和良好的学术价值。

- 1alpha. *Leukemia* 2003; 17: 2065-2073
- 13 Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, Hsieh CY. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001; 21: 2895-2900
- 14 Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6847-6854
- 15 Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 445-456
- 16 Thapliyal R, Maru GB. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 541-547
- 17 Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999; 18: 6013-6020
- 18 Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D, Bondada S. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53. *Clin Immunol* 1999; 93: 152-161
- 19 Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 873-878
- 20 Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 376-383
- 21 Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem* 2000; 275: 10405-10412
- 22 Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Park HJ, Shim BS, Choi SH, Kwon HJ. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol* 2003; 10: 695-704
- 23 Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1664-1671
- 24 Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709-720
- 25 Michel G, Minet E, Mottet D, Remacle J, Michiels C. Site-directed mutagenesis studies of the hypoxia-inducible factor-1alpha DNA-binding domain. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1578: 73-83
- 26 杜静, 赵秋, 谷华, 滕晓丽, 覃华, 刘南植, 梁扩寰. 缺氧诱导因子-1 α 及其靶基因在人肝癌HepG2细胞中的表达和意义. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 607-609
- 27 Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK, Kim KW. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep* 2006; 15: 1557-1562
- 28 Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 11680-11685
- 29 Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34-44
- 30 杨军, 陈明清, 董坚. VEGF/VEGFR2信号转导通路在抗肿瘤血管生成中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3611-3616

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者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 2008-07-28)

Genistein对TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质样转化的作用

韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛

韩磊, 郭克建, 陈希涛, 中国医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省沈阳市 110001

周文平, 中国人民解放军沈阳军区总医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110001

韩磊, 医学博士, 主要从事肝、胆、胰肿瘤外科治疗的研究。

作者贡献分布: 韩磊、郭克建和周文平对此文所作贡献均等; 此课题由韩磊与郭克建设计; 研究过程由韩磊与周文平操作完成; 数据分析由韩磊与陈希涛完成; 本论文写作由韩磊与郭克建完成。

通讯作者: 郭克建, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科. hanlei1974@sina.com

电话: 024-83283350

收稿日期: 2008-04-17 修回日期: 2008-06-12

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-28

Effect of Genistein on epithelial-mesenchymal transdifferentiation induced by transforming growth factor- β 1 in human pancreatic cancer cell line Panc-1

Lei Han, Ke-Jian Guo, Wen-Ping Zhou, Xi-Tao Chen

Lei Han, Ke-Jian Guo, Xi-Tao Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Wen-Ping Zhou, General Hospital of Chinese PLA Shenyang Military Command, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ke-Jian Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. hanlei1974@sina.com

Received: 2008-04-17 Revised: 2008-06-12

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of Genistein on epithelial-mesenchymal transdifferentiation (EMT) induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in human pancreatic cancer cell line Panc-1, and to explore the mechanism of Genistein inhibiting invasion of Panc-1 cells.

METHODS: Panc-1 cells were treated with TGF- β 1 and Genistein (0, 1, 25, 50 μ mol/L), and those treated with PSB served as controls. Transwell chamber assay was performed to determine the invasion ability change of Panc-1 cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction

(RT-PCR) was used to estimate the mRNA expression of vimentin and E-cadherin. Western blotting assay was used to measure the protein expression of E-cadherin. Cell structure was observed by microscopy.

RESULTS: TGF- β 1 obviously promoted EMT and invasion ability of Panc-1 cells. Not only the invasion ability but also EMT induced by TGF- β 1 were significantly inhibited by Genistein in a dose-dependent manner. The number of Panc-1 cells was larger in 0 μ mol/L Genistein group than that in the control group (99.16 ± 11.30 vs 65.46 ± 8.99 , $P < 0.05$). Genistein at concentration of 50 μ mol/L down-regulated the mRNA expression of vimentin and up-regulated the mRNA and protein expression of E-cadherin. The characteristic morphology of EMT was reversed.

CONCLUSION: Genistein can inhibit TGF- β 1-induced invasion of Panc-1 cells remarkably, which may be one of its anti-invasion mechanisms.

Key Words: Genistein; Pancreatic cancer; Invasion; Transforming growth factor- β 1; Epithelial-mesenchymal transdifferentiation

Han L, Guo KJ, Zhou WP, Chen XT. Effect of Genistein on epithelial-mesenchymal transdifferentiation induced by transforming growth factor- β 1 in human pancreatic cancer cell line Panc-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2359-2363

摘要

目的: 研究Genistein对人胰腺癌细胞系Panc-1诱导细胞上皮-间质样转化的作用, 以探讨Genistein抑制胰腺癌侵袭作用的机制。

方法: 用TGF- β 1和不同浓度Genistein(0、1、25、50 μ mol/L)处理Panc-1细胞, 对照组加入等量PSB。采用Transwell小室法检测Genistein作用于TGF- β 1诱导Panc-1细胞后侵袭力的变化; RT-PCR技术检测波形蛋白(Vimentin)、E-钙依赖黏附素(E-Cadherin)的mRNA表达;

■背景资料

胰腺癌是恶性程度很高的消化系统肿瘤, 发病率呈上升趋势。由于胰腺癌特殊的生物学特性, 使药物治疗胰腺癌始终不理想。目前亟待解决的问题是寻找一种可以针对肿瘤侵袭过程的重要环节及肿瘤所建立的局部微环境的破坏能力强, 而对正常人体细胞作用轻微的无毒或低毒性药物。

■同行评议者

张水军, 教授, 郑州大学第一附属医院普通外科; 吴泰瑞, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■研究前沿

在胰腺癌侵袭研究领域, 上皮细胞向间叶样细胞转化(EMT)成为近年来研究热点. 运动能力相对弱的胰腺癌上皮细胞在TGF- β 1诱导后可以向具有运动能力相对强的间叶细胞转化, 使肿瘤细胞更具有侵袭和转移的能力. 这种细胞转化在胰腺癌中与侵袭能力呈正相关.

Western blot蛋白印迹法检测E-Cadherin蛋白的表达; 应用显微镜观察分析细胞结构的改变.

结果: TGF- β 1对Panc-1细胞有显著诱导上皮-间质转化的作用, 并增加细胞侵袭力, Genistein不但对诱导后Panc-1细胞侵袭力有抑制, 对细胞上皮-间质样转化也有抑制, 且这种作用呈剂量依赖性. 0 μ mol/L Genistein组细胞计数明显比对照组高(99.16 ± 11.30 vs 65.46 ± 8.99 , $P < 0.05$), 50 μ mol/L Genistein处理诱导后细胞48 h, 细胞侵袭力下降, Vimentin mRNA表达水平降低, 而E-Cadherin mRNA和蛋白表达水平升高, 细胞形态学间质样特性被逆转.

结论: Genistein具有明显抑制TGF- β 1诱导的人胰腺癌细胞Panc-1侵袭力的作用, 这可能是其抗侵袭作用的机制之一.

关键词: 三羟异黄酮; 胰腺癌; 侵袭; 转化生长因子- β 1; 细胞上皮间质样转化

韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛. Genistein对TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质样转化的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2359-2363

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2359.asp>

0 引言

细胞上皮间质样转化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)发生于多种生理、病理过程, 如胚胎发育、伤口愈合、肿瘤转移级联反应阶段. EMT的发生以上皮细胞极性的丧失和间质特性的获得、细胞间黏附能力丧失和细胞迁移及运动能力获得为主要特征, 与肿瘤细胞侵袭和远隔转移有密切关系^[1-3]. 在胰腺癌侵袭研究领域, EMT已成为热点, 越来越多的学者致力于通过各种方法抑制EMT而降低胰腺癌的侵袭性^[4]. TGF- β 1具有强烈的刺激EMT的作用^[1,3]. 三羟异黄酮(genistein)是大豆中一类重要的非营养素成分, 具有广泛抗癌作用. 研究发现, Genistein可以通过干预肿瘤细胞骨架中波形蛋白的排布方式, 降低肿瘤的恶性程度^[5]以及逆转腹膜间皮细胞的EMT细胞形态学的改变^[6]. 目前, Genistein在胰腺癌EMT过程中的作用尚无相关报道. 本研究通过观察Genistein对E-钙依赖黏附素(E-Cadherin)和波形蛋白(vimentin)表达以及细胞形态学方面的影响, 探讨其在TGF- β 1诱导的胰腺癌细胞Panc-1发生EMT过程中所发挥作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞系Panc-1购自上海中科院

细胞研究所. 用含双抗及100 mL/L小牛血清的高糖DMEM培养液, 在37°C含50 mL/L的培养箱中传代培养. 人重组TGF- β 1购自Pepro tech公司. 24孔Transwell侵袭小室购自Corning公司; Matrigel购自B.D.公司; 目的基因引物通过在GenBank上查找, 并应用Primer 5软件自行设计, 由大连宝生物工程有限公司合成; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; Genistein购自Sigma公司. 鼠抗E-cadherin抗体购自武汉博士德公司.

1.2 方法

1.2.1 Transwell体外侵袭实验: 应用24孔Transwell侵袭小室进行侵袭实验. 上室的聚碳酸酯膜-Matrigel($250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)在37°C聚合后待用. 收集对数生长期Panc-1细胞经胰酶消化后加入无血清培养液制成单细胞悬液加入上室孔中, 细胞浓度为 2×10^5 /孔, 用10 mg/L TGF- β 1和不同浓度Genistein处理, 使Genistein终浓度分别为0、1、25、50 μ mol/L, 对照组加入等量PSB. 下室中加入趋化因子400 μ L(MRC-5细胞48 h无血清的条件培养液), 培养48 h. 待培养时间结束后将Transwell上室的附着细胞用湿棉签擦去. 苏木精染色, 封片后显微镜下(200倍)计数穿过滤膜的细胞数. 每张膜计数上下左右中5个随机的不同视野, 每组平行设3个滤膜. 侵袭抑制率 $\text{IR}(\%) = [(\text{对照组穿膜细胞数} - \text{给药组穿膜细胞数}) / \text{对照组穿膜细胞数}] \times 100\%$.

1.2.2 Western blot蛋白印迹检测E-cadherin表达 10 μ g/L TGF- β 1处理细胞后30 min加入不同浓度Genistein, 常规培养48 h. 细胞用预冷的PBS洗3遍, 适当体积裂解缓冲液[20 mmol/L Tris-HCL, pH7.5, 0.1 mmol/L Na_3VO_4 , 25 mmol/L NaF, 25 mmol/L β -glycerophosphate, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 2 mg/L leupeptin]重悬细胞, 超声裂解细胞后, 4°C 12 000 g离心1 h, 收集上清-70°C保存. 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 用80 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 分离的蛋白电转移至PVDF膜后, 用5%脱脂奶的TBST室温封闭4 h, 加入1:400鼠抗E-cadherin, β -actin 4°C孵育过夜, 1:2000稀释的酶标二抗室温孵育1 h, TBS洗净后, 酶显法, 显色剂显色. 采用FlourChem V 2.0凝胶成像分析软件(America)分析. 实验重复3次.

1.2.3 RT-PCR检测E-cadherin和Vimentin的表达: 细胞总的RNA的提取: 收集各实验组细胞, 按TRIzol试剂盒说明提取RNA, 电泳鉴定RNA质量并在 $A_{260\text{nm}}$ 测其浓度. 引物序列: Vimentin: sense primer(5'-CGC TTC GCC AAC TAC AT-3'),

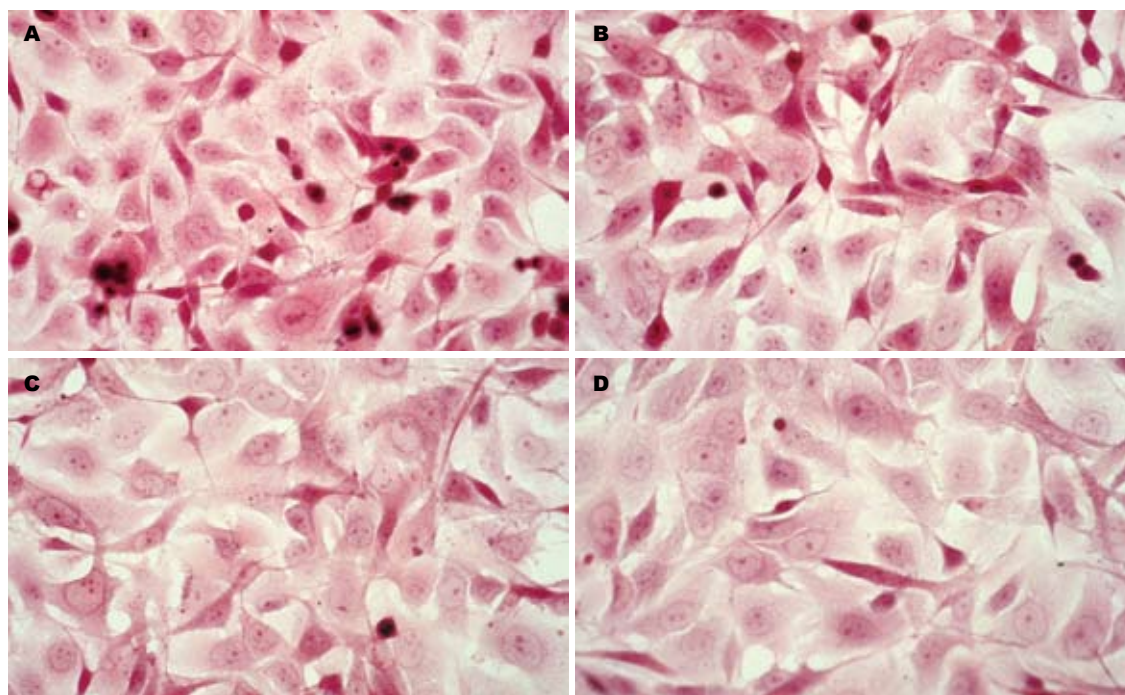


图1 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1形态学改变的影响(光镜 $\times 400$)。A: Panc-1细胞; B: TGF- β 1处理组细胞; C: Genistein(25 μ mol/L)治疗组; D: Genistein(50 μ mol/L)治疗组。

■ 相关报道

虽然Genistein的抗肿瘤作用已被广泛认识,但在以往研究中,多集中在Genistein的抑制肿瘤细胞生长和增殖、促进凋亡等方面,关于针对其在胰腺癌EMT过程中的作用还没有相关报道。其他研究发现,Genistein可以通过干预肿瘤细胞骨架中波形蛋白的排布方式,降低肾癌的恶性程度。在EMT相关分子机制的研究中发现,Genistein可以逆转腹膜间皮细胞的EMT细胞形态学改变。

表1 Genistein对Panc-1细胞侵袭力的影响(10 μ g/L TGF- β 1)

分组	Genistein剂量(μ mol/L)	细胞计数	抑制率(%)
空白对照组	—	65.46 $\pm$ 8.99	—
TGF- β 1刺激组	0	99.16 $\pm$ 11.30 ^a	0
治疗1组	1	94.45 $\pm$ 14.11	4.75
治疗2组	25	95.36 $\pm$ 12.36	3.83
治疗3组	50	46.63 $\pm$ 7.68	52.97 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs TGF- β 1刺激组。

antisense primer(5'-AGG GCA TCC ACT TCA CAG-3')690 bp. E-caderin: sense primer(5'-CGC ATT GCC ACA TAC A-3'), antisense primer(5'-CGT TAG CCT CGT TCT CA-3')502 bp; 以为 β -actin内参, sense primer(5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3')antisense primer(5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'), 318 bp. PCR扩增条件: 变性94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火55-57 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环31次。将15 g/L琼脂糖凝胶置于含0.5 $\times$ TBE的电泳槽中, 取10 μ L扩增产物与1 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液混合后上样, 电泳(10 mA, 100 V)结束后, 结果采用FlourChem V 2.0凝胶成像分析软件(America)分析。实验重复3次。

1.2.4 光镜观察: 将各组细胞常规培养48 h后, 常规HE染色后, 光镜(10 $\times$ 40倍)观察并拍照。

1.2.5 透射电镜观察: 10 μ g/L TGF- β 1处理细胞后30 min分别加入不同浓度Genistein(对照组加入等体积DMEM培养基), 培养48 h收集各组细胞(1×10^5 /瓶), 25 g/L戊二醛固定, 常规包埋、切片, 透射电镜观察细胞超微结构的变化。

统计学处理 采用SPSS13.0软件包对结果进行分析, 应用方差分析及两样本间 χ^2 检验方法统计分析, 数据以mean $\pm$ SD表示; $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1细胞侵袭力的影响 与TGF- β 1刺激组相比, 治疗3组抑制率增加($P < 0.05$), 提示高浓度Genistein具有抑制TGF- β 1诱导后的胰腺癌细胞侵袭能力(表1)。

2.2 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1细胞形态学改变的影响 光镜结果: TGF- β 1(10 μ g/L)诱导后Panc-1表现散在趋势, 细胞间连接不紧密, 呈散在生长; 细胞形态呈不规则改变, 部分细胞呈梭形。Genistein浓度为25 μ mol/L细胞散在生长趋势减轻, 部分呈团簇型生长, 细胞连接较为紧密, 浓度为50 μ mol/L时表现更为明显(图1)。透射电镜结果: TGF- β 1处理组细胞胞质内可见致密核心颗粒分布, 部分细胞内可见在细胞核周围形成“丝团状”结构, 细胞外微绒毛增多变密; Genistein(50 μ mol/L)治疗组后伪足形成减少, 细

■创新盘点

本研究首次报道Genistein对TGF- β 1诱导后胰腺癌发生EMT细胞转化的潜在逆转作用,为阐明该药在胰腺癌中与EMT之间的关系提供了有价值的理论参考。

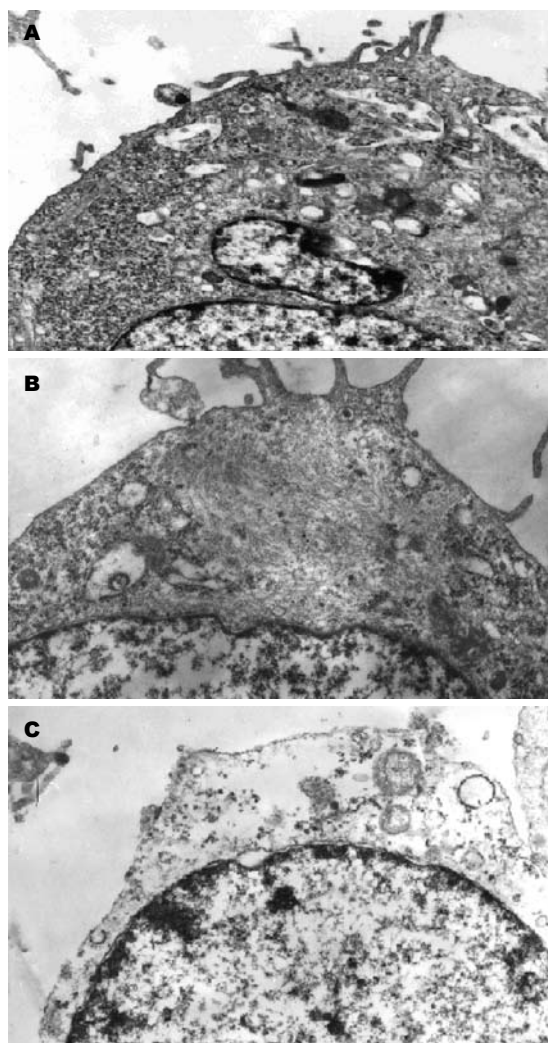


图2 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1细胞超微结构改变的影响。A: Panc-1细胞($\times 8000$); B: TGF- β 1处理组($\times 10\,000$); C: Genistein治疗组($\times 8000$)。

胞骨架重排,呈解聚状态,分布弥散,核周“丝团状”结构消失(图2)。

2.3 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1细胞E-cadherin和Vimentin表达的影响 与TGF- β 1处理组相比,治疗1、2、3组(1、25、50 $\mu\text{mol/L}$)E-cadherin mRNA和蛋白表达明显增加,Vimentin mRNA表达降低,呈浓度依赖性(图3),说明Genistein通过降低Vimentin表达和增加E-cadherin表达,降低外源性TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞Panc-1发生EMT的诱导作用。

3 讨论

EMT的重要特征之一是上皮细胞标志的E-cadherin表达的减少和间质细胞标志的Vimentin表达增加。EMT在胰腺癌侵袭和转移中的发挥重要作用,并于不良预后有关。殷涛 *et al*^[7]研究表明TGF- β 1可以明显诱导人胰腺癌细胞Panc-1的发

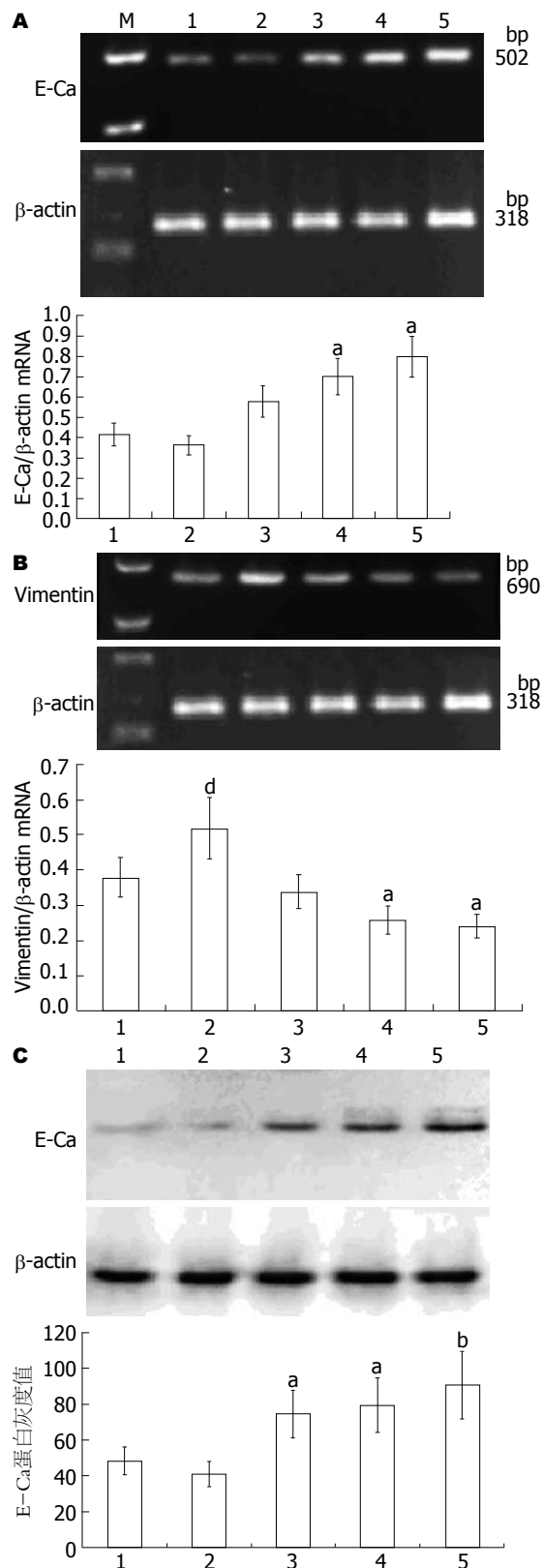


图3 Genistein对TGF- β 1诱导Panc-1细胞E-cadherin和Vimentin表达的影响。A: E-cadherin mRNA表达; B: Vimentin mRNA表达; C: E-cadherin蛋白表达。M: marker; 1: 空白对照组; 2: TGF- β 1处理组; 3: 治疗1组; 4: 治疗2组; 5: 治疗3组。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs TGF- β 1处理组; ^c $P < 0.01$ vs 对照组。

生EMT,同时细胞侵袭能力增加。本实验结果也表明:外源性TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞Panc-1

48 h后E-cadherin表达下降, 而Vimentin表达明显增加, 形态学具有上皮细胞向间质细胞转变的特征. 与以往文献报道结果一致.

E-cadherin是一种Ca²⁺依赖性跨膜糖蛋白, 广泛分布于各类上皮细胞, 是维持上皮细胞、组织形态和结构完整性和极性的重要分子^[8]. E-Cadherin胞内区通过连环素(Catenins)与细胞内骨架系统形成复合体, 发挥上皮细胞间的黏附功能^[9]. 在肿瘤组织中, 他可使细胞保持密切接触, 难以脱离原发部位进入周围组织和脉管, 故具有抑制肿瘤转移作用. Vimentin是一种中间丝, 是细胞骨架(cytoskeletal)成分之一, 细胞骨架与细胞的运动行为密切相关. Vimentin被看作是一种间质细胞的标志物^[10]. Vimentin在上皮源肿瘤中的反常高表达现象是肿瘤发生EMT过程的表型改变^[11]. 细胞发生EMT时Vimentin排列方式发生改变, 使细胞更具有运动能力. 本实验中, 人胰腺癌细胞Panc-1经Genistein治疗后, E-cadherin表达明显增加而Vimentin表达降低, 同时细胞形态学方面, 与TGF- β 1处理组相比, 表现为细胞连接趋于紧密, 类成纤维样细胞数量减少, 电镜下细胞骨架重新排列, 细胞伪足减少, 细胞运动能力减弱. 由此说明, Genistein具有对抗TGF- β 1诱发EMT的作用, 使细胞侵袭能力降低.

Genistein是一种酪氨酸蛋白激酶抑制剂, 他能竞争性地抑制ATP结合到酪氨酸激酶催化结构域, 抑制酪氨酸激酶的活性, 同时还具有类雌激素作用、抗氧化及抑制拓扑异构酶II活性等多种生物学效应. 虽然Genistein的抗肿瘤作用已被广泛认识, 但在以往研究中, 多集中在Genistein的抑制肿瘤细胞生长和增殖、促进凋亡等方面^[12-14]. 已有实验表明, 在胰腺癌细胞中, Genistein可以改变多种与肿瘤生长和侵袭有关的基因表达^[15], 在胰腺癌裸鼠的转移模型中也发挥明显的抑制作用^[16], 但关于其在胰腺癌EMT过程中的作用尚无相关报道. 本研究首次表明, Genistein在细胞转化方面发挥一定的作用, 这可能是其抗肿瘤侵袭作用的机制之一. 在未来, 我们将进一步研究Genistein在TGF- β 1诱导EMT过程中相关信号转导通路的作用靶点.

4 参考文献

- 1 Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558
- 2 Bates RC, DeLeo MJ 3rd, Mercurio AM. The

epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res* 2004; 299: 315-324

- 3 Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 2001; 61: 4222-4228
- 4 Jungert K, Buck A, von Wichert G, Adler G, König A, Buchholz M, Gress TM, Ellenrieder V. Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1563-1570
- 5 汪涌, 刘凡, 胡玉珍, 张运涛, 张顺. 金雀异黄素对肾癌细胞系GRC-1细胞生物学行为的影响. 第四军医大学学报 2002; 23: 1580-1583
- 6 Demir AY, Groothuis PG, Nap AW, Punyadeera C, de Goeij AF, Evers JL, Dunselman GA. Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells. *Hum Reprod* 2004; 19: 21-29
- 7 殷涛, 王春友, 赵刚, 刘涛, 周峰, 陶京. 转化生长因子- β 1诱导的上皮向间叶转化对胰腺癌侵袭和转移的意义. 华中科技大学学报(医学版) 2007; 36: 67-70
- 8 介建政, 田力, 王巍, 刘治滨, 王文跃. CD44拼接变体V6与上皮钙粘附素在胰腺癌中的表达及意义. 中国实验诊断学 2007; 11: 309-311
- 9 Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 1996; 83: 437-446
- 10 Fraga CH, True LD, Kirk D. Enhanced expression of the mesenchymal marker, vimentin, in hyperplastic versus normal human prostatic epithelium. *J Urol* 1998; 159: 270-274
- 11 Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AA, Villette JM, Stower MJ, Maitland NJ. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002; 52: 253-263
- 12 Moiseeva EP, Almeida GM, Jones GD, Manson MM. Extended treatment with physiologic concentrations of dietary phytochemicals results in altered gene expression, reduced growth, and apoptosis of cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 3071-3079
- 13 Sakla MS, Shenouda NS, Ansell PJ, Macdonald RS, Lubahn DB. Genistein affects HER2 protein concentration, activation, and promoter regulation in BT-474 human breast cancer cells. *Endocrine* 2007; 32: 69-78
- 14 Huang X, Chen S, Xu L, Liu Y, Deb DK, Platanius LC, Bergan RC. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3470-3478
- 15 Bai J, Sata N, Nagai H, Wada T, Yoshida K, Mano H, Sata F, Kishi R. Genistein-induced changes in gene expression in Panc 1 cells at physiological concentrations of genistein. *Pancreas* 2004; 29: 93-98
- 16 Büchler P, Gukovskaya AS, Mouria M, Büchler MC, Büchler MW, Friess H, Pandolfi SJ, Reber HA, Hines OJ. Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid. *Pancreas* 2003; 26: 264-273

■同行评价

本文内容比较新颖, 研究方法得当, 论述条理, 具有较好的学术价值.

COX-2基因多态性及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的相关性

朱克祥, 李玉民, 李汛, 石斌, 周文策, 单勇, 刘涛, 何雯婷, 俸铁兰

■背景资料

我国胃癌的发病率和死亡率高居恶性肿瘤发病的第3位, 但胃癌发病的确切机制尚不清楚, 现多倾向于胃癌是由菌株-环境-宿主共同作用的多基因疾病。因此, 从宿主因素方面研究胃癌发病的易感性具有重要意义。

朱克祥, 李玉民, 李汛, 周文策, 单勇, 兰州大学第一医院普外二科 甘肃省兰州市 730000

石斌, 兰州大学第一医院重症监护室 甘肃省兰州市 730000
刘涛, 何雯婷, 兰州大学第一医院肿瘤防治中心 甘肃省兰州市 730000

俸铁兰, 兰州大学第一医院手术室 甘肃省兰州市 730000

朱克祥, 硕士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由朱克祥, 李玉民, 李汛, 石斌及周文策设计; 研究过程由朱克祥与单勇完成; 标本收集由朱克祥, 刘涛, 何雯婷及俸铁兰完成; 论文的撰写由朱克祥完成; 李玉民资助本研究并对论文校正。

通讯作者: 李玉民, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院普外二科, 肝胆胰外科研究所, 肝移植中心。

lmy19621225@hotmail.com

电话: 0931-8625200-6321

收稿日期: 2008-04-04 修回日期: 2008-06-11

接受日期: 2008-06-20 在线出版日期: 2008-07-28

Association of COX-2 genetic polymorphisms and *H pylori* infection with gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu Province in China

Ke-Xiang Zhu, Yu-Min Li, Xun Li, Bin Shi,
Wen-Ce Zhou, Yong Shan, Tao Liu, Wen-Ting He,
Tie-Lan Feng

Ke-Xiang Zhu, Yu-Min Li, Xun Li, Wen-Ce Zhou, Yong Shan, the Second Department of General Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Bin Shi, Intensive Care Unit, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Tao Liu, Wen-Ting He, Cancer Center, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Tie-Lan Feng, Operating Room, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Professor Yu-Min Li, Research Institute of Hepatopancreatobiliary and the Second Department of General Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. lmy19621225@hotmail.com

Received: 2008-04-04 Revised: 2008-06-11

Accepted: 2008-06-20 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship among cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphisms (COX-2-899G>C and COX-2 codon587G>A), *H pylori* infection and susceptibility to gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu

Province in China.

METHODS: Blood samples were collected from 140 patients with gastric carcinoma and 125 normal persons in Hexi area of Gansu Province. Genomic DNA was extracted by phenol chloroform method and polymorphisms of COX-2-899G>C (G to C) and codon 587G>A(G to A) were genotyped by PCR-TaqMan. For detection of *H pylori* infection, Warthin-starry staining was used.

RESULTS: Three kinds of COX-2-899G>C genotypes were found, including GG, GC and CC. Their frequencies in gastric cancer patients were 72.9%, 21.4%, 5.7% and their frequencies in the normal controls were 84.0%, 12.8%, 3.2%, respectively. COX-2-899C carriers had an increased risk of gastric carcinoma (OR = 1.956, 95% CI: 1.067-3.586). COX-2 587codonG>A included three genotypes: G/G, G/A and A/A. Their frequencies in the cancer patients were 86.4%, 11.4%, 2.2%, and in the normal controls were 89.6%, 9.6%, 0.8%, respectively. However, No significant differences of COX-2 587codon G>A polymorphisms were observed between the cancer patients and the normal controls in each genotype. The rate of *H pylori* infection was significantly higher in the cancer patients than that in the healthy control (68.6% vs 50.4%, $P = 0.003$). Stratification analysis showed that COX-2 -899C carrier with *H pylori* infection had a higher risk for gastric cancer (OR = 2.471, 95% CI: 1.076-5.675).

CONCLUSION: COX-2 -899C genotype may increase the susceptibility to gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu province in China. In addition, *H pylori* infection and COX-2 -899C play a synergic role in gastric cancer pathogenesis. However, COX-2 codon 587G>A has no relation with gastric cancer in this area.

Key Words: Cyclooxygenase-2; *H pylori*; Polymorphism; Gastric cancer

Zhu KX, Li YM, Li X, Shi B, Zhou WC, Shan Y, Liu T, He WT, Feng TL. Association of COX-2 genetic polymorphisms and *H pylori* infection with gastric cancer

■同行评议者

马欣, 主任医师,
甘肃省人民医院
消化科

in high-incidence Hexi area of Gansu Province in China. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(21): 2364-2370

摘要

目的: 研究COX-2-899G>C, COX-2codon 587G>A基因多态性在胃癌高发区甘肃河西地区健康人群与胃癌患者的分布, 检测幽门螺旋杆菌(*H pylori*)在上述人群中的感染情况, 探讨COX-2 -899G>C, COX-2codon587G>A基因多态性以及*H pylori*感染与河西地区胃癌发生的关系。

方法: 采用PCR-TaqMan探针法检测甘肃河西地区健康人群和胃癌患者COX-2 -899G>C, COX-2codon 587G>A的基因多态性, 用Warhin-starry染色法检测本研究对象的*H pylori*感染率。

结果: COX-2-899G>C分为G/G, G/C, C/C三种基因型, 其频率在胃癌患者中分别为72.9%, 21.4%, 5.7%; 在普通人群中分别为84.0%, 12.8%, 3.2%。与G/G基因型相比, COX-2-899*C基因携带者患胃癌的风险增加($OR = 1.956$, 95% CI: 1.067-3.586)。COX-2 codon587G>A三种基因型为G/G, G/A, A/A, 其频率在胃癌患者中分别为86.4%, 11.4%, 2.2%; 在健康人群中分别为89.6%, 9.6%, 0.8%。COX-2codon 587G>A三种基因型在胃癌组和健康对照组间无显著性差别。*H pylori*感染率在胃癌组和对照组分别为68.6%, 50.4%, 两组间具有显著差异($P = 0.003$)。分层分析提示COX-2 -899*C基因携带者若同时伴有*H pylori*感染, 其患胃癌的风险明显增加($OR = 2.471$, 95% CI: 1.076-5.675)。

结论: COX-2 -899G>C的C等位基因增加我国胃癌高发区甘肃河西地区胃癌发病的风险, 而且与*H pylori*感染对胃癌的发病有一定的协同作用; COX-2 codon 587G>A基因多态性与甘肃河西地区胃癌的易感性无关。

关键词: 环氧化酶-2; 基因多态性; 幽门螺旋杆菌; 胃癌

朱克祥, 李玉民, 李汛, 石斌, 周文策, 单勇, 刘涛, 何雯婷, 俸铁兰. COX-2基因多态性及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2364-2370
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2364.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。2005年我

国约有40万的胃癌新发病例和30万死亡病例, 发病率和死亡率高居全部恶性肿瘤发病的第3位^[1]。20世纪80年代以来, 幽门螺杆菌(*H pylori*)与胃癌的关系受到广泛关注, 被认为是胃癌发生的独立危险因素。然而, 在*H pylori*感染人群中仅有少数个体发展为胃癌, 这说明胃癌发生是多因素综合的结果, 其中遗传特性所决定的个体易感性扮演着不可忽视的角色。COX-2不仅是启动炎症反应的关键酶, 而且还参与多种肿瘤的发生和发展过程。既往对COX-2与胃癌的关系探讨多体现在COX-2在胃癌组织中表达水平的研究, 迄今鲜见COX-2启动子区-899G>C和COX-2codon 587G>A多态性与胃癌关系的报道。本研究探讨COX-2启动子区-899G>A、COX-2codon 587 G>A多态性以及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 140例胃癌病例为2007-07/2007-11在甘肃省张掖市医院, 甘肃省武威市医院, 甘肃省酒泉市医院胃镜室进行胃镜检查, 胃镜及活检病理诊断均为胃癌的患者, 125例对照人群为同时期在本地区进行胃镜体检的健康人群。研究对象均为汉族。吸烟者定义为既往或目前每天吸烟1支以上, 并持续1年或1年以上者。胃癌家族史定义为家族中有1名以上一级亲属或2名以上二级亲属患有胃癌者。每位研究对象胃镜检查时活检胃黏膜3-5块用40 g/L甲醛溶液固定。同时所有研究对象在胃镜检查后采集外周静脉血2 mL(外周静脉穿刺置入EDTA抗凝管)先放入液氮罐冷存, 后转入-80℃冰柜保存。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*感染检测: 用Warhin-starry法检测*H pylori*。在Warthin-starry染色中, *H pylori*呈棕褐色微弯曲短杆状, 常位于胃黏膜表面或/和胃小凹及肿瘤性腺腔内, 呈散在、密集或成堆分布。无*H pylori*检出者为阴性。

1.2.2 基因多态性位点分型: 采用常规蛋白酶K、酚/氯仿法抽提外周血基因组DNA。PCR-TaqMan探针对COX-2基因-899G>C和COX-2 codon 587G>A位点基因分型。COX-2启动子-899和第10外显子codon587基因位点的TaqMan探针及其引物由上海基康生物有限公司设计合成。COX-2 -899G>C的引物和探针的序列如下: Primer fw: 5'-ACCCGT GGAGCTCACATTA ACTAT-3'; Primer rev:

■ 研发前沿

COX-2在多种肿瘤组织中呈现高表达, 与胃癌等消化系统肿瘤的发生、发展和转移之间具有明显相关性, 因此, COX-2与胃癌的关系密切。但是, 目前对COX-2与胃癌关系的研究多集中在COX-2在胃癌组之中的表达, 而对COX-2单核苷酸多态性与胃癌发病的易感性则比较少。而单核苷酸多态性是继限制性片段长度多态性、微卫星之后从宿主(基因多态性)方面研究胃癌的第三代遗传标记。

■相关报道

潘凯枫 *et al* 研究胃癌高发发现场不同阶段胃癌癌前病变病例和胃癌病例, 对COX-2基因启动子区和编码区基因的多态位点及频率进行筛查, 并对基因多态与胃癌及癌前病变的关系进行研究。结果发现, COX-2基因的启动子区和编码区存在多个多态位点, 其中启动子区和COX-2转录水平密切相关的-1195G>A多态与胃癌的发病风险密切相关。

5'-ATACTGTTCTCCGTACCTTCACCC-3'; 等位基因G特异性TaqMan探针: Probe(G)5'-FAM-CCTTTCCCgCCTCTCTTTCCA-TAMRA-3'; 等位基因C特异性TaqMan探针: Probe(C)5'-TET-ACCTTTCCCcCCTCTCTTTCCAAGA-TAMRA-3', 扩增片段长125 bp. COX-2codon 587G>A的引物和探针的序列如下: Primer fw: 5'-GAGCTCATTAACAG TCACCATCA-3', Primer rev: 5'-ACGTTCTTTTAGTATATGT GGGATTG-3', 等位基因G特异性TaqMan探针: Probe(G)5'-FAM-TTCTTCCCgCTC CgGACTAGATGA-TAMRA-3', 等位基因A特异性TaqMan探针Probe(A)5'-TET-CAAGTTCTTCCCgCTCCaGACTAGATG -TAMRA-3', 扩增片段长87 bp. COX-2 -899G>C和codon 587 G>A的PCR反应体系均为10 μ L, 其中含2 $\times$ TaqMan Master Mix(购自ABI)5.0 μ L, Forward primer 0.45 μ L(10 μ mol/L), Reverse primer 0.45 μ L(10 μ mol/L), TaqMan FAM probe 0.25 μ L(10 μ mol/L), TaqMan TET probe 0.25 μ L(10 μ mol/L), Template DNA 2.0 μ L(10 mg/L), ddH₂O 1.6 μ L. 在Rotor Gene3000型荧光定量PCR仪进行扩增反应, COX-2 -899G>C扩增参数: 开始先50 $^{\circ}$ C预热2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 然后95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C复性30 s, 共40个循环. COX-2codon 587G>A扩增参数: 开始先50 $^{\circ}$ C预热2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 然后95 $^{\circ}$ C变性10 s, 60 $^{\circ}$ C复性35 s, 共40个循环. Rotor-Gene 6.1.81软件判读基因型. 实验中设阴性对照和阳性对照, 并采用单纯随机抽样法对其中50例样本进行重复基因型检测, COX-2 -899G>C和codon 587 G>A分别获得一致结果。

统计学处理 用 χ^2 检验比较分类变量和基因分型在胃癌组和健康对照组中的分布差异. 以非条件Logistic回归计算相对风险度(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI), 评价各基因型与胃癌发病风险的关系, 并以年龄、性别、吸烟史、*H pylori*感染和胃癌家族史对等位基因频率进行分层分析. 数据统计学分析采用SPSS13.0软件包。

2 结果

2.1 一般特征 胃癌患者组年龄25-84岁, 中位年龄59岁; 健康对照组年龄24-81岁, 中位年龄58岁. 两组间的年龄、性别和吸烟人数构成差异均无统计学意义($P>0.05$), 而胃癌阳性

表 1 胃癌患者和健康对照组的一般特征 (n, %)

特征	健康对照组	胃癌组	P
中位年龄(范围)	58(24-81)	59(25-84)	0.539
<65岁	70(56.0)	80(57.1)	
≥ 65 岁	55(44.0)	60(42.9)	
性别			0.896
男	85(68.0)	94(67.1)	
女	40(32.0)	46(32.9)	
吸烟状况			0.924
吸烟	58(46.4)	74(52.9)	
不吸烟	67(53.6)	66(47.4)	
胃癌家族史			0.038
有	17(13.6)	33(23.6)	
无	108(86.4)	107(76.4)	
<i>H pylori</i> 感染			0.003
阳性	63(50.4)	96(68.6)	
阴性	62(49.6)	44(31.4)	

家族史在胃癌组中的比例明显高于健康对照组(23.6% vs 13.6%, $P = 0.038$). 在胃癌组中, *H pylori*阳性者分布频率高于对照组(68.6% vs 50.4%, $P = 0.003$, 表1)。

2.2 COX-2 587 codon G>A基因多态性在胃癌及健康对照组中频率分布及比较 COX-2codon 587G>A多态性位点有GG、GA和AA 3种基因型(图1), 他们的分布频率及其与胃癌风险度的关系归纳于表2. GG、GA和AA 3种基因型的其频率在对照组中分别为89.6%, 9.6%和0.8%, 在胃癌组中分别为86.4%, 11.4%和2.2%. 经检验两组基因型分布符合Hardy-weinberg平衡规律($P>0.05$). 以COX-2 codon 587 GG基因型作参照, 单独携带codon 587GA或携带codon 587 AA基因型的个体对患胃癌的风险均无统计学差异(GA型: $OR = 1.234$, 95% CI: 0.559-2.732; AA型: $OR = 2.777$, 95% CI: 0.285-27.087). 将携带codon 587GA和携带codon 587 AA型者合并后与携带codon 587 GG型相比较, 带有587*A基因型的个体在两组之间仍无明显的差别($OR = 1.353$, 95% CI: 0.693-2.866). 进一步分层分析亦未见COX-2codon 587G>A与胃癌风险度关联有显著统计学意义。

2.3 COX-2 -899G>C基因多态性在胃癌及健康对照组中频率分布及比较 COX-2 -899G>C多态性位点有GG、GC和CC 3种基因型(图2), 3种基因型分布频率及其与胃癌风险度的关系见表3. 3种基因型GG、GC和CC其频率在胃癌组中分别为72.9%, 21.4%和5.7%, 在对照组中分别为

表 2 COX-2codon 587G>A基因型在胃癌和对照中的分布 (n, %)

基因型	健康对照组	胃癌组	OR	95% CI
GG	112(89.6)	121(86.4)	1.0	
GA	12(9.6)	16(11.4)	1.234	0.559-2.732
AA	1(0.8)	3(2.2)	2.777	0.285-27.087
GA+AA	13(10.4)	19(13.6)	1.353	0.693-2.866
G等位基因	118(94.4)	129(92.1)	1.0	
A等位基因	7(5.6)	11(7.9)	1.437	0.540-3.830

表 3 COX-2 -899G>C基因型在胃癌和对照中的分布 (n, %)

基因型	健康对照组	胃癌组	OR	95% CI
GG	105(84.0)	102(72.9)	1.0	reference
GC	16(12.8)	30(21.4)	1.930	0.993-3.254
CC	4(3.2)	8(5.7)	2.059	0.601-7.049
GC+CC	20(26.0)	38(27.1)	1.956	1.067-3.586
G等位基因	113(90.4)	117(83.6)	1.0	reference
C等位基因	12(9.6)	23(16.4)	1.714	0.737-3.988

84.0%, 12.8%和3.2%。经检验两组基因型分布符合Hardy-weinberg平衡规律($P>0.05$)。与COX-2 -899GG纯合子基因型相比, 单独携带-899 GC杂合子或携带-899CC纯合子基因型的个体在胃癌组和对照组之间均无统计学差异(GC型: $OR = 1.930$, 95% CI: 0.993-3.254; CC型: $OR = 2.059$, 95% CI: 0.601-7.049)。但将携带-899 GC和携带-899CC型者合并后与携带-899GG型相比较, 带有COX-2 -899*C基因型的个体在胃癌组显著增高, OR 值为1.956(95% CI: 1.067-3.586)。

2.4 COX-2 -899G>C基因多态性与胃癌关系的相关性分析 按年龄、性别、吸烟史、*H pylori*感染和胃癌家族史对COX-2 -899G>C等位基因频率在病例和对照组中进行分层分析(表4), 并将GC和CC 2种基因型合并后与纯合型GG作比较。结果显示: 在年龄、性别、吸烟史的分层分析中未观察到基因型胃癌和对照两组间的分布差异。但在*H pylori*感染分层中, *H pylori*感染阳性同时携带COX-2 -899*C基因型的个体在胃癌组明显高于对照组(29.2% vs 14.3%), *H pylori*感染后COX-2 -899*C基因型携带者相对于COX-2 -899GG携带者患胃癌的风险增加2.47倍($OR = 2.471$, 95% CI: 1.076-5.675); 在具有胃癌家族史的人群中, 携带COX-2 -899*C基因型的个体患胃癌的风险是携带COX-2 -899GG基因型的3.81倍($OR = 3.810$, 95% CI: 1.110-1.307)。

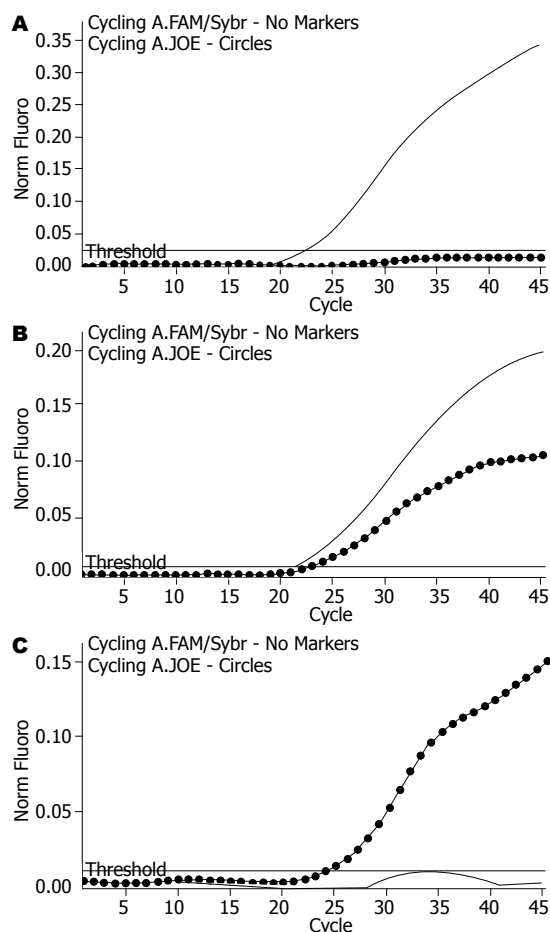


图 1 COX-2 codon 587 G>A多态性位点PCR-TaqMan. A: COX-2codon 587G>A(GG型); B: COX-2codon 587G>A(GA型); C: COX-2codon 587G>A(AA型)。

3 讨论

胃癌是由生物因素、环境因素和宿主因素共同作用, 多阶段, 多步骤的衍进而成的恶性疾病。经典流行病学调查结果认为, 胃癌主要与重盐、喜食腌渍、熏烤等含亚硝酸盐食品及慢性胃疾病史等因素关系密切, 多食新鲜蔬菜水果则具有降低胃癌危险性的作用^[2]。然而近年来我国居民饮食结构发生了较大变化, 总体趋于合理, 但胃癌死亡率的下降趋势并不明显, 有些地区甚至仍呈上升趋势。因此, 人们把胃癌发生的研究重点逐渐转移到生物和遗传因素上。*H pylori*感染是胃癌发生的主要的生物因素^[3]。本研究显示甘肃河西地区胃癌组*H pylori*感染阳性率为68.6%, 高于对照组的50.4%, *H pylori*感染者罹患胃癌的风险增加2.15倍, 与几项^[4-6]关于*H pylori*与胃癌关系的Meta分析结果显示的*H pylori*与胃癌关系 OR 值一般在2-4之间的结论相一致。表明*H pylori*感染同样在河西地区胃癌的发生过程中起着重要的作用。

■创新盘点

本文选择COX-2 587 G>A, COX-2 -899G>C两个对COX-2基因功能具有影响的位点对COX-2基因SNP与胃癌关系进行研究, 迄今是首次研究, 具有明显的创新性。同时, 本研究采用目前国外有大量应用, 而国内仍应有很少的实时定量PCR-TaqMan法对上述SNP位点进行给予分型, 方法新颖。

应用要点

本研究从基因水平研究胃癌发病的易感性, 尽管尚属初步研究, 但COX-2 587 G>A, COX-2 -899G>C与胃癌关系经过大量样本验证后可以作为胃癌早期诊断和预警标记。*H. pylori*感染与胃癌的关系表明根除*H. pylori*感染同样对胃癌高发区河西地区胃癌防治极其重要。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素过程中的关键限速酶。目前, 已知COX至少有2中同种异构体, 结构型COX-1和诱导型COX-2。COX-1和COX-2在结构上有60%以上的同源性, 并且有相似的酶活性。COX-1发挥看家作用, 其mRNA和蛋白质水平在人体内保持相对恒定, 主要调节生理性PG的合成, 维持机体的正常的生理功能, 如保护胃黏膜、调节肾脏血流和控制血小板的聚集等。而COX-2是一种诱导酶, 在正常状态下大多数组织不表达, 但在炎症因子、致癌剂、癌基因(如*v-src*、*ras*)产物等刺激作用下诱导表达。已大量研究表明COX-2在多种肿瘤组织中呈现高表达, 与胃癌等消化系统肿瘤的发生、发展和转移之间具有明显相关性^[7-9], 但国内对COX-2基因多态性与胃癌关系的研究报道少见。我们对COX-2基因-899 bp G>C和10外显子587密码子G>A多态性与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的关系进行首次研究。我们的研究表明: COX-2 codon 587G>A多态性与甘肃河西地区胃癌的发生无明显的相关性; 携带COX-2 -899*C基因型的个体在胃癌组明显高于对照组人群, 提示COX-2 -899*C基因型比COX-2 -899GG基因型对胃癌更具有易感性, 在相同环境下携带COX-2 -899*C基因型的个体患胃癌风险增加。同时, 我们的研究还提示-899*C基因与*H. pylori*感染具有协同作用, 携带COX-2 -899*C基因型者若长期经历*H. pylori*的慢性感染, 其慢性的胃部炎性疾病可能会更易转化为胃癌。然而, 携带COX-2 -899*C基因型的个体对胃癌易感性增加的原因尚不能阐明, 可能与-899G>C影响COX-2的转录活性有关。转录水平上的调控是COX-2基因调控表达和稳定性的主要机制^[10]。与COX-2基因转录活性有关的启动子区域具有典型的TATA盒, 其上游还有CCAAT增强子序列、AP-2、NF- κ B、IL-6、SP-1、EST-1以及CRE等多个顺式作用元件, 可结合相应的反式作用因子, 从而实现COX-2基因转录水平的调控^[11-12]。其中SP1是一个O-糖基化的转录调节因子, 是一正性转录调节因子, 他识别10个核苷酸长度的同源序列5'-GGGGCGGGG-3', 即他通过一个富含G的元件(如GC盒)而起作用^[13-14]。COX-2 -899 bp位于转录因子SP-1结合域内^[15], 由于转录起始点上游的转录调控元件之间存在着错综复杂的连带关系, COX-2 -899G>C的多态性改变影响了转录

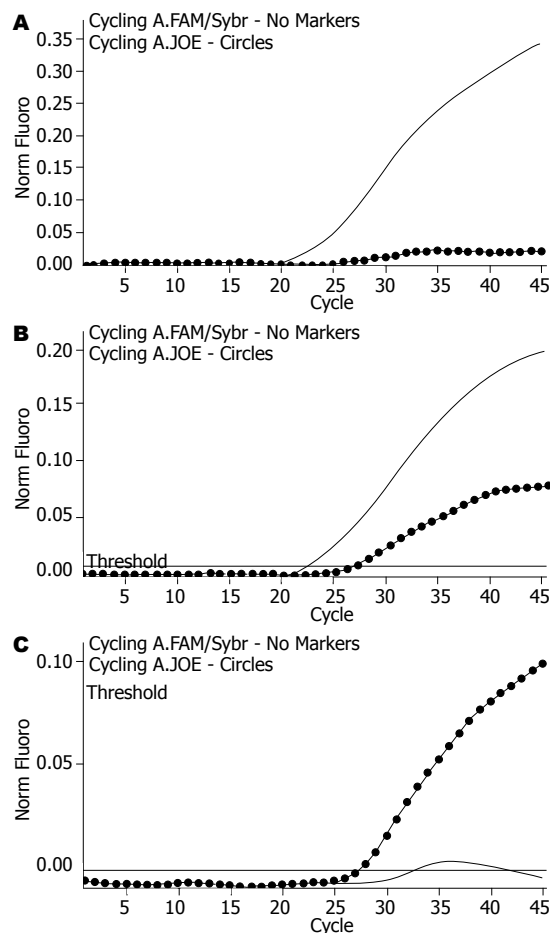


图2 COX-2 -899G>C多态性位点PCR-TaqMan. A: COX-2 -899G>C(GG型); B: COX-2 -899G>C(GC型); C: COX-2 -899G>C(CC型)。

调控元件之间的作用方式, 从而影响COX-2的转录性表达。在一项前列腺癌的研究中认为携带COX-2 -899C等位基因的美籍黑人患前列腺癌的风险增加^[16]。Konheim *et al*^[17]在研究COX-2与2型糖尿病发病的易感性时, 发现与-899GG型相比, 携带COX-2 -899CC纯合子基因型的印第安人2型糖尿病的发病率增加了30%。

许多研究证实*H. pylori*感染与诱导COX-2的表达有明显的相关性, 在*H. pylori*感染的胃黏膜中COX-2 mRNA和蛋白表达明显增加^[18-19]。*H. pylori*感染后诱导多种炎性因子的活化, 而炎性因子如NF- κ B、IL-6活化后可结合COX-2基因的相应启动子区的转录元件, 进而调节COX-2在胃癌中的作用。此可帮助我们理解*H. pylori*感染与COX-2 -899G>C对胃癌关系的联合作用, 但其具体的机制仍不清楚。

遗传因素对胃癌发病非常重要。胃癌发生于同卵同胞和家族聚集现象都支持这一观点。胃癌发生的家族聚集现象的重要原因之一是共同

表 4 COX-2 -899G>C基因型与胃癌发病风险的相关性的分层分析

分层类别	健康对照组		胃癌组		OR	95% CI
	G/G	C携带者	GG	C携带者		
年龄						
<65岁	59	11	61	19	1.671	0.733-3.810
≥65岁	46	9	41	19	2.369	0.965-5.813
性别						
男	75	10	73	21	2.518	0.951-4.894
女	30	10	29	17	1.759	0.629-4.471
吸烟状况						
吸烟	50	8	54	20	2.315	0.936-5.726
不吸烟	55	12	48	18	1.719	0.752-3.929
胃癌家族史						
有	10	7	9	24	3.810	1.110-1.307
无	95	13	93	14	1.100	0.491-2.466
H pylori感染						
阳性	54	9	68	28	2.471	1.076-5.675
阴性	51	11	34	10	1.364	0.522-3.562

■同行评价
本研究设计合理, 创新性强, 结论真实, 具有一定的临床实用价值.

的环境和(或)遗传学基础.

在世界范围内, 我国属于胃癌高发的国家之一, 而甘肃河西地区又是我国胃癌的一个高发区, 该地区胃癌检出率为7.79%^[20]. 本研究选择胃癌高发区甘肃河西地区胃癌患者作为研究对象, 并取相同地理条、年龄性别相近的健康人作对照, 具有明显的区域性和现实意义. 值得注意的是, 本研究只能视为初步研究, 有关结论有必要进一步扩大样本验证.

4 参考文献

1 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20

2 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37

3 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 51-65

4 Azuma T, Ohtani M, Yamazaki Y, Higashi H, Hatakeyama M. Meta-analysis of the relationship between CagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 1926-1927; author reply 1927-1928

5 Poddar U, Yachha SK. Helicobacter pylori in children: an Indian perspective. *Indian Pediatr* 2007; 44: 761-770

6 Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003; 125: 1636-1644

7 Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L, Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3466-3471

8 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

9 Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, Kandil MA, El-Kady NM. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 363-374

10 Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol* 2003; 4: 605-615

11 Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302: 723-727

12 Lukiw WJ, Bazan NG. Strong nuclear factor-kappaB-DNA binding parallels cyclooxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporal lobe neocortex. *J Neurosci Res* 1998; 53: 583-592

13 Maclean KN, Kraus E, Kraus JP. The dominant role of Sp1 in regulating the cystathionine beta-synthase -1a and -1b promoters facilitates potential tissue-specific regulation by Kruppel-like factors. *J Biol Chem* 2004; 279: 8558-8566

14 Lee J, Kosaras B, Aleyasin H, Han JA, Park DS, Ratan RR, Kowall NW, Ferrante RJ, Lee SW, Ryu H. Role of cyclooxygenase-2 induction by transcription factor Sp1 and Sp3 in neuronal oxidative and DNA damage response. *FASEB J* 2006; 20: 2375-2377

15 Grabe N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2002; 2: S1-S15

16 Panguluri RC, Long LO, Chen W, Wang S, Coulibaly A, Ukoli F, Jackson A, Weinrich S, Ahaghotu C, Isaacs W, Kittles RA. COX-2 gene promoter haplotypes and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2004; 25: 961-966

17 Konheim YL, Wolford JK. Association of a promoter variant in the inducible cyclooxygenase-2 gene (PTGS2) with type 2 diabetes mellitus in Pima

- Indians. *Hum Genet* 2003; 113: 377-381
- 18 Konturek PC, Rembiasz K, Konturek SJ, Stachura J, Bielanski W, Galuschka K, Karcz D, Hahn EG. Gene expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2, and gastrin in atrophic gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* before and after eradication therapy. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 36-46
- 19 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp-cagA* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 246-249
- 20 李玉民, 石斌, 柴琛, 李汛, 周文策, 刘虎, 米登海, 段国学, 王芳, 徐创贵, 张勇, 邓瑞, 郭进华, 张正坤, 傅汉中, 施耀仁, 梁聚民, 孙文勤, 薛群基, 刘维民. 甘肃省河西地区胃癌发病状况的调查. *中华普通外科杂志* 2004; 19: 183-184

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

本刊讯 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平, 上海同仁医院联合福建省肿瘤医院, 定于2008-11-7/12在福建省福州市举办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. 会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办. 中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办. 会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台. 本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题, 以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨. 会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示, 内容精彩. 参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

1 征稿内容

消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; 消化系良性疾病(如: 门静脉高压、胆道结石和消化道出血等)的内镜及介入新技术应用; 消化病诊治边缘交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验和个案报告等稿件.

2 征稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果和结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文. 优秀论文将安排在国家级杂志上发表; (4)邮寄稿件要求Word格式打印, 并附软盘, 特别鼓励E-mail投稿(以附件Word格式传送); (5)截稿日期: 2008-08-31.

3 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科. hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120
施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科. endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

结肠癌组织中*CASP9*的表达及其多态性

何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 娄毅, 李建华

何向民, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

王莉莉, 娄毅, 中国医科大学医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001

方长清, 刘树立, 李建华, 中国医科大学病理教研室 辽宁省沈阳市 110001

何向民, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤的研究工作。

辽宁省科技基金资助项目, No. 2005225003-6

作者贡献分布: 此课题由何向民, 王莉莉, 娄毅及李建华设计; 研究过程由何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 娄毅操作完成; 数据分析由王莉莉, 娄毅及李建华完成; 本论文写作由何向民, 王莉莉, 娄毅及李建华完成。

通讯作者: 李建华, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学病理教研室. louyi_1963_1019@163.com

电话: 024-23256666

收稿日期: 2008-05-10 修回日期: 2008-06-05

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-28

Expression of *CASP9* gene and its polymorphism distribution in colon cancer

Xiang-Min He, Li-Li Wang, Chang-Qing Fang,
Shu-Li Liu, Yi Lou, Jian-Hua Li

Xiang-Min He, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li-Li Wang, Yi Lou, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Chang-Qing Fang, Shu-Li Liu, Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of Liaoning Province, No. 2005225003-6

Correspondence to: Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. louyi_1963_1019@163.com

Received: 2008-05-10 Revised: 2008-06-05

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the expression of *CASP9* in colon cancer, and single nucleotide polymorphism (SNP) distribution of *CASP9* gene in colon cancer patients and normal individuals.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of *CASP9* gene in 170 colon cancer patients and their corresponding normal colon tissues. We analyzed the genotype of rs1052576 in *CASP9* gene in 170 colon cancer patients and

100 normal people by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The SNP genotype frequency and allele frequency in patients and normal controls were analyzed by legally constituted authority statistical method.

RESULTS: In comparison with that in normal colon tissues, *CASP9* gene expression was obviously down-regulated in 47% (80/170) colon cancer tissues ($P < 0.05$). The genotype and allele frequencies of rs1052576 located at exon 5 of *CASP9* gene had significant difference between the two groups, and the G allele frequency in colon cancer patients was higher than that in the healthy controls ($\chi^2 = 9.99$, $P = 0.001$). The genotype frequency of rs1052576 in cancer patients was associated with the histological differentiation ($\chi^2 = 15.8$, $P = 0.003$).

CONCLUSION: *CASP9* gene expression is down-regulated in colon cancer, and the G allele of rs1052576 in *CASP9* gene is associated with the carcinogenesis of colon cancer.

Key Words: Colon Cancer; *CASP9* gene; Single nucleotide polymorphism; Polymerase chain reaction

He XM, Wang LL, Fang CQ, Liu SL, Lou Y, Li JH. Expression of *CASP9* gene and its polymorphism distribution in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2371-2375

摘要

目的: 探讨*CASP9*基因在结肠癌中的表达及其SNP多态位点在结肠癌患者和正常人中的分布情况。

方法: 应用RT-PCR方法检测170例结肠癌患者及对应癌旁正常组织中*CASP9*的表达情况; 应用限制性片段长度多态性技术结合测序, 分析结肠癌患者及100例正常人*CASP9*基因2个SNP位点基因型; 应用列联表法统计分析患者组和对照组各SNP位点基因型及等位基因频率。

结果: 47%(80/170)的结肠癌组织*CASP9*基因表达明显下调, 与癌旁正常组织相比差异有

■背景资料

凋亡和肿瘤的发生发展有着密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗副作用的重要原因。*CASP9*基因定位于1p36.3-p36.1, *CASP9*参与线粒体介导的凋亡途径。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■相关报道

有研究表明,在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现了caspase-9基因转录和翻译水平的下调,非小细胞肺癌中*CASP9*基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异。

统计学意义($P < 0.05$)。位于*CASP9*基因第5外显子的SNP位点rs1052576的基因型频率和等位基因频率在两组人群中的分布差异有统计学意义;患者组G等位基因频率明显高于对照组($\chi^2 = 9.99, P = 0.001$);基因型频率的分布与结肠癌的组织分化程度有关($\chi^2 = 15.8, P = 0.003$)。

结论: *CASP9*基因在结肠癌中低表达, rs1052576多态位点G等位基因和结肠癌的发生相关。

关键词: 结肠癌; *CASP9*基因; 单核苷酸多态; 聚合酶链反应

何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 姜毅, 李建华. 结肠癌组织中*CASP9*的表达及其多态性. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2371-2375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2371.asp>

0 引言

结肠癌是西方国家较常见的恶性肿瘤之一, 5年总体生存率约为40%^[1]。近年来, 随着国内生活水平的提高和生活习惯的改变, 我国结肠癌发病率亦呈逐渐升高的趋势。大量研究表明结肠癌的发生、发展是多基因畸变的结果。目前已经发现很多和结肠癌发生相关的基因, 如*RAS*基因家族、*ERBB*基因家族、*Myc*基因家族、*p53*等^[2-3]。凋亡和肿瘤的发生发展有着密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗、放疗副作用的重要原因。*CASP9*基因定位于1p36.3-p36.1, *CASP9*参与线粒体介导的凋亡途径^[4-5]。rs1052576位点位于*CASP9*基因第5外显子, 有研究表明该位点的G等位基因与胃癌和非小细胞肺癌有关^[6-7]。为探讨*CASP9*基因与结肠癌的分子遗传学联系, 我们研究*CASP9*基因在结肠癌中的表达, 进一步分析了*CASP9*基因内已知单核苷酸多态rs1052576位点在170个结肠癌患者及100个正常人中的分布情况, 分析其与结肠癌遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第一医院2001-2007年新鲜手术切除结肠癌组织标本170例, 患者术前均未接受过放、化疗。其中男96例, 女74例, 年龄38-73岁。根据组织学分化程度: 高分化22例, 中分化100例, 低分化48例(黏液腺癌和印戒细胞癌归入低分化癌); 有淋巴结转移64例, 无转移106例; 有远处转移28例, 无转移142例; 临床Dukes分期: A期30例, B期66例, C期46例, D期28

例。癌旁结肠黏膜组织取自距肿瘤 ≥ 5 cm、外观正常的结肠黏膜。所有组织均经病理检查证实。

1.2 方法

1.2.1 半定量RT-PCR分析*CASP9*表达: 用TRIzol试剂提取结肠癌组织和癌旁正常结肠黏膜组织的总RNA。用逆转录酶和Oligo(dT)20引物合成cDNA。应用Primer3设计*CASP9*引物序列, 上游引物为: 5'-TGT GTC GGT CGA GAA GAT TG-3', 下游引物为: 5'-CTG CTC AAA GAT GTC GTC CA-3', 扩增长度349 bp。跨越cDNA865-1214位碱基序列。 β -actin作为内对照, 上游引物为: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 下游引物为: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 扩增长度498 bp^[4]。两对引物加入25 μ L PCR反应体系中, PCR反应条件为94 $^{\circ}$ C变性45 s, 59 $^{\circ}$ C复性45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 共35个循环。RT-PCR产物经15 g/L琼脂糖胶分离, 用AlphaImage 2000自动成像仪(Alpha Innotech Corp., San Jose, CA)摄影, 用Fluorchem v2.0 Stand Alone软件分析RT-PCR产量。

1.2.2 SNP的选取及引物设计: rs1052576位于*CASP9*基因第5外显子。在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>数据库获取rs1052576的序列信息。明确两侧基因组序列及SNP是否引起酶切位点改变。应用Primer3软件设计引物(Sangon公司合成)。rs1052576引物序列: CCT CCT GAG TAG CTG GGA TT/AAG GGT GTT TTG GAC ACA AG, 长度464 bp, 酶切后片段长度307 bp/157 bp(*Bst*u I)。应用常规饱和酚-氯仿法提取结肠癌患者及正常人外周静脉血基因组DNA。

1.2.3 目的片段扩增和酶切鉴定: 反应液总体积25 μ L, 其中基因组DNA约40 ng, 10 $\times$ 反应缓冲液(MgCl₂ 15 mmol/L)2.5 μ L, dNTP(2.0 mmol/L)2.0 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L)各0.5 μ L, Taq酶16.67 nkat。循环参数: rs1052576: 94 $^{\circ}$ C变性8 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 58 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。所有PCR产物均经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测确认。*Bst*u I酶切鉴定rs1052576基因型。等位基因为G时能被*Bst*u I酶识别。酶切反应体系20 μ L: 其中PCR产物8 μ L, *Bst*u I 83.35 nkat, 10 $\times$ 缓冲液2 μ L。37 $^{\circ}$ C水浴过夜, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型。

统计学处理 应用Arlequin软件(<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/methods.html>)检测病例组与对照组中的Hardy-weinberg平衡; 应用SPSS10.0软件统计分析患者组和对照组中基

表 1 *CASP9*基因表达与结肠癌临床病理参数的关系 (n)

病理参数	<i>CASP9</i> 基因表达		χ^2	<i>P</i>
	下调	无明显改变		
性别				
男	44	52	0.13	0.7184
女	36	38		
组织学分级				
低分化	16	32	17.71	0.0001
中分化	60	40		
高分化	4	18		
淋巴结转移				
有	27	37	0.97	0.3246
无	53	53		
远处转移				
有	10	18	1.73	0.1884
无	70	72		
Dukes分期				
A	16	14	1.98	0.5765
B	32	34		
C	22	24		
D	10	18		

因型频率、等位基因频率, 以及*CASP9*基因表达率是否存在差异。

2 结果

2.1 结肠癌组织*CASP9*基因表达 正常结肠黏膜组织中均有*CASP9*的表达, 而47%(80/170)结肠癌组织*CASP9*表达明显下调(图1), 与癌旁正常组织相比差异有统计学意义。分析*CASP9*基因表达与结肠癌临床病理参数的关系(表1), 结果表明其表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、远处转移以及Dukes分期无关, 而仅与结肠癌组织学分化程度有关。

2.2 rs1052576酶切鉴定和统计分析 经Arlequin软件分析, 对照组和患者组中2个SNP位点基因型频率及等位基因频率均符合Hardy-weinberg平衡(图2)。患者组及正常对照组SNP位点基因型频率及等位基因频率有区别($P < 0.01$, 表2)。rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.99$, $P < 0.01$); 患者组与对照组相比, 3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 12.76$, $P < 0.01$), AA基因型频率降低, AG基因型频率增高。进一步分析rs1052576基因型频率与患者组织分化程度有关($\chi^2 = 15.8$, $P = 0.003$, 表3)。

3 讨论

结直肠癌的发生、发展过程中涉及多种基因畸

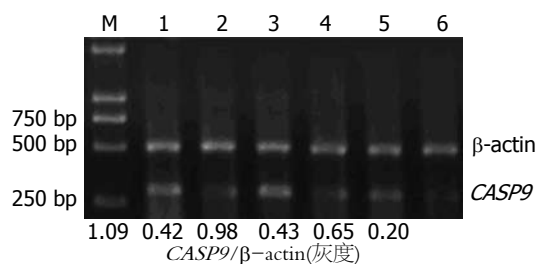


图 1 *CASP9*基因RT-PCR结果。M: DL2000 DNA Ladder; 1, 3, 5: 癌旁正常结肠黏膜组织; 2, 4, 6: 结肠癌组织。

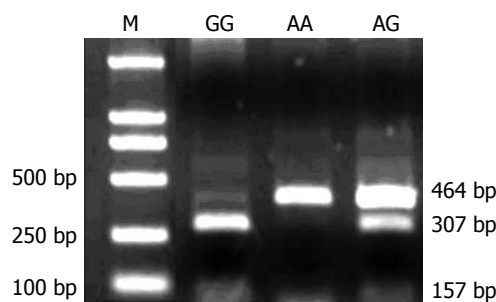


图 2 rs1052576 *BstU I* 酶切不同基因型。

变, 其确切机制至今仍不十分明确。有研究认为结直肠组织的恶性转化过程涉及多个途径, 如细胞周期和凋亡相关途径、Wnt通路和PI3K/Akt生存途径等^[8-10]。本实验研究了细胞周期和凋亡途径中的相关基因*CASP9*在结肠癌和癌旁结肠黏膜组织中的表达, 进一步分析了*CASP9*基因内已知单核苷酸多态rs1052576位点在170个结肠癌患者及100个正常人中的分布情况, 以探讨其在结肠癌形成过程中的生物学意义。

近年来发现恶性肿瘤的共同特征之一就是细胞失控性生长。细胞周期调控机制是一个复杂的蛋白互控系统, 某些基因的畸变往往导致细胞周期监控和驱动机制失控, 从而引起细胞周期启动、运行和终止异常, 使细胞增殖增加, 凋亡减少, 导致肿瘤形成。对细胞凋亡的耐受意味着肿瘤细胞逃避化疗药物治疗和免疫介导破坏的一个潜在机制。对于大多数抗肿瘤药物, 细胞凋亡始于细胞色素C/Apaf-1/caspase-9途径^[11-12]。失去激活细胞凋亡途径可以导致细胞对多种化疗药物的耐受。在dATP和ATP的作用下, Apaf-1/细胞色素C复合物通过CARD-CARD结构域相互作用与caspase-9前体结合, 从而激活caspase-9, 即成熟caspase-9从凋亡小体中释放出来^[13-15]。一旦与Apaf-1结合, caspase-9就会被细胞色素C和dATP激活, 进一步激活caspase-3, 从而引起细胞凋亡。caspase-3的激活依赖于caspase-9。

*CASP9*基因定位于1p36.3-p36.1, 编码的蛋

■创新盘点

本研究应用半定量RT-PCR方法发现在170例结肠癌中有80例出现了*CASP9*基因表达的明显下调, 进一步分析rs1052576基因型频率在结肠癌患者中的分布, 发现3种基因型的分布与结肠癌患者的性别、淋巴结转移、远处转移及临床分期无关, 与肿瘤的分化程度相关。

■应用要点

在结肠癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于结肠癌的早期诊断与预防。

表 2 结肠癌患者rs1052576SNP位点基因型频率和等位基因频率

rs1052576分组	n	基因型频率			等位基因频率	
		GG	AG	AA	G	A
患者组	170	34(22.0) ^b	95(55.9) ^b	41(24.1) ^b	163(52.1) ^b	177(47.9) ^b
对照组	100	13(13.0)	42(42.0)	45(45.0)	68(34.0)	132(66.0)

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 3 rs1052576基因型频率和结肠癌临床特征的关系 (n)

病理参数	基因型			χ^2	P
	GG	AG	AA		
性别					
男	21	52	23	0.50	0.779
女	13	43	18		
组织学分级					
低分化	13	19	16	15.8	0.003
中分化	13	68	19		
高分化	8	8	6		
淋巴结转移					
有	18	37	9	7.75	0.021
无	16	58	32		
远处转移					
有	8	11	9	3.78	0.151
无	26	84	32		
Dukes分期					
A	6	15	9	5.10	0.531
B	11	43	12		
C	9	26	11		
D	8	11	9		

白产物分子质量约为46 kDa, 广泛表达于人类的正常组织, 如神经组织、肌肉组织、肝脏、脾脏、胃和肺等^[16]。有研究表明, 在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现了caspase-9基因转录和翻译水平的下调^[17-18], 目前国内尚未有该基因在结肠癌中的表达研究。我们应用半定量RT-PCR技术发现在170例结肠癌中有80例出现了CASP9基因表达的明显下调, 而癌旁正常对照结肠黏膜组织却未发现明显改变。二者对比差异有统计学意义, 提示凋亡基因CASP9基因与结肠癌的发生相关。分析CASP9表达与结肠癌临床病理参数的关系, 发现其表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、远处转移以及Dukes分期无关, 而仅与结肠癌组织学分化程度有关, 提示CASP9异常表达可能是结肠癌发生中的一个较晚期事件, 参与了结肠癌细胞的进一步恶性分化。

有研究表明, 在胃癌和非小细胞肺癌中CASP9基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异, rs1052576位点的G等位基因肿瘤的淋巴结转移有关^[6-7]。因此, 我们进一步研究该单核苷酸多态在结肠癌中的分布情况, 利用PCR-RFLP方法对170例结肠癌和100例正常人进行了rs1052576位点的基因型分析, 结果发现, rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.99$, $P < 0.01$); 患者组与对照组相比, 3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 12.76$, $P < 0.01$), AA基因型频率降低, AG基因型频率增高, 这和其他学者的研究结果一致。进一步分析rs1052576基因型频率在结肠癌患者中的分布, 发现3种基因型的分布与结肠癌患者的性别、淋巴结转移、远处转移及临床分期无关, 与肿瘤的分化程度相关($\chi^2 = 15.8$, $P < 0.01$)。结果提示: rs1052576(Gln221Arg)位点位于CASP9基因第5外显子, 编码的氨基酸位于CASP9结构域。rs1052576位点的G等位基因与结肠癌的发生相关, 可能是由于蛋白质的空间结构的不同, 影响其在线粒体介导的凋亡caspase-3的激活, 进而阻碍了正常的细胞凋亡过程, 引起结肠癌的发生。因此, 在结肠癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于结肠癌的早期诊断与预防。

4 参考文献

- 1 Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepato-gastroenterology* 2000; 47: 57-70
- 2 Yu KH, Wang WX, Ding YM, Li H, Wang ZS. Polymorphism of thymidylate synthase gene associated with its protein expression in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 617-621
- 3 Janssen A, Schiffmann S, Birod K, Maier TJ, Wobst I, Geisslinger G, Grösch S. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 698-703
- 4 Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in

- malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-211
- 5 Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003; 22: 451-455
- 6 Lou Y, Fang CQ, Li JH. [A study on the expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in non-small cell lung cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2007; 24: 59-62
- 7 方长清, 刘树立, 姜毅, 李建华. 胃癌组织中caspase 9的表达及其多态性变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3190-3193
- 8 Lynch HT, Smyrk TC. Identifying hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 338: 1537-1538
- 9 Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3784-3791
- 10 Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2525-2538
- 11 Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998; 94: 727-737
- 12 Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park DS, Slack RS. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 2001; 155: 207-216
- 13 Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 6660-6664
- 14 Ho AT, Li QH, Hakem R, Mak TW, Zacksenhaus E. Coupling of caspase-9 to Apaf1 in response to loss of pRb or cytotoxic drugs is cell-type-specific. *EMBO J* 2004; 23: 460-472
- 15 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413
- 16 Lemaire C, Godefroy N, Costina-Parvu I, Rincheval V, Renaud F, Trotot P, Bouleau S, Mignotte B, Vayssière JL. Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene* 2005; 24: 3297-3308
- 17 Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Müller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 1400-1407
- 18 Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* 2003; 30 Suppl: S85-S88

■同行评价

本文探讨CASP9基因的表达式及其SNP多肽位点在结肠癌患者和正常人中的分布情况, 有一定新意, 研究对照设计合理, 具有较好的临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 第3套为^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)

黄芩苷对错配修复基因缺失LoVo细胞的抑制作用及其机制

杨柏霖, 刘飞, 谷云飞, 金黑鹰, 刘秀芳

■背景资料

遗传性非息肉性结直肠癌(HNPCC)占所有结直肠癌的5%-15%。HNPCC分子遗传学基础是错配修复基因种系突变, 细胞增殖过程中的错误掺入和缺失不能修复, 基因组DNA微卫星序列发生延长或缩短, 导致结直肠癌及肠外肿瘤的发生。

杨柏霖, 谷云飞, 南京中医药大学附属医院肛肠科 江苏省南京市 210029

刘飞, 金黑鹰, 刘秀芳, 南京中医药大学第三附属医院全国肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001

杨柏霖, 博士, 副主任医师, 主要从事结直肠外科临床与基础研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572447

作者贡献分布: 杨柏霖, 刘飞与金黑鹰对此文所作贡献均等; 此课题由杨柏霖, 刘飞及金黑鹰设计; 研究过程由杨柏霖, 刘飞, 金黑鹰及刘秀芳操作完成; 数据分析由杨柏霖与谷云飞完成; 本论文写作由杨柏霖与刘飞完成。

通讯作者: 杨柏霖, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学附属医院肛肠科。blyang1971@163.com

电话: 025-86617141-71108

收稿日期: 2008-05-02 修回日期: 2008-06-16

接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-07-28

Inhibitory effect of baicalein on colonic LoVo cell line with deficiency of mismatch repair gene *in vitro*

Bo-Lin Yang, Fei Liu, Yun-Fei Gu, Hei-Ying Jin, Xiu-Fang Liu

Bo-Lin Yang, Yun-Fei Gu, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Fei Liu, Hei-Ying Jin, Xiu-Fang Liu, National Center of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572447

Correspondence to: Dr. Bo-Lin Yang, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. blyang1971@163.com

Received: 2008-05-02 Revised: 2008-06-16

Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the influence of baicalein on the apoptosis of colonic LoVo cell line with deficiency of hMSH2 gene as well as its mechanism.

METHODS: LoVo cells were treated baicalein (40 mg baicalein+19.8 mL isotonic+100 μ L HCl+100 μ L NaOH), aspirin (1.8 g aspirin+2 mL methyl cyanide+4 mL NaOH+2 mL HCl) and 1 g/L methyl cyanide (control group). *In vitro* cell culture technique and TUNEL method were used

to measure the apoptosis rate of LoVo cells. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and denaturing gel electrophoresis were employed to detect the status of microsatellite markers BAT-25 and D2S123.

RESULTS: Baicalein and aspirin had obvious inhibitory effect on LoVo cells, and the apoptosis rate of LoVo cells was higher than that in the control group at each time point ($P = 0.0000$). Baicalein was superior to aspirin in inducing apoptosis of LoVo cells at 96 h and 1 wk (93.33% vs 44.23%, 63.29% vs 23.20%; both $P = 0.0000$). The effect of baicalein reached the peak at 96 h, not in a time-dependent manner. Microsatellite status in BAT-25 and D2S123 were not affected by baicalein or aspirin.

CONCLUSION: Baicalein can induce apoptosis of colonic LoVo cells with deficiency of hMSH2 gene *in vitro*, without affecting the microsatellite status of BAT-25 and D2S123.

Key Words: Baicalein; Apoptosis; Microsatellite instability; Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism

Yang BL, Liu F, Gu YF, Jin HY, Liu XF. Inhibitory effect of baicalein on colonic LoVo cell line with deficiency of mismatch repair gene *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2376-2380

摘要

目的: 探讨黄芩苷诱导LoVo细胞凋亡的作用及机制。

方法: 将黄芩苷40 mg溶于19.8 mL生理盐水+100 μ L HCl+100 μ L NaOH, 阿司匹林1.8 g溶于2 mL乙腈+4 mL NaOH+2 mL HCl, 分别处理LoVo细胞, 1 g/L乙腈溶液为对照。采用体外培养技术、TUNEL法观察细胞凋亡率, 变性凝胶电泳检测微卫星标志BAT-25、D2S123状况。

结果: 黄芩苷和阿司匹林均能诱导LoVo细胞凋亡, 在各时间点与对照组比较统计学差异有显著意义($P = 0.0000$); 黄芩对结肠LoVo细胞的诱导凋亡作用明显强于阿司匹林, 24 h两者

■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普通外科

差异无统计学意义, 96 h和1 wk两者差异统计学有显著意义(93.33% vs 44.23%, 63.29% vs 23.20%, 均 $P=0.0000$), 其作用时间在96 h达到高峰, 与时间不呈依赖关系. 黄芩苷和阿司匹林均未影响LoVo细胞的BAT-25、D2S123微卫星状态.

结论: 黄芩苷具有较强诱导LoVo细胞凋亡的作用, 但对LoVo细胞的BAT-25、D2S123微卫星状态无影响, 其诱导LoVo细胞凋亡可能是通过其它作用途径.

关键词: 黄芩苷; 凋亡; 微卫星不稳定; 聚合酶链反应-单链构象多态性

杨柏霖, 刘飞, 谷云飞, 金黑鹰, 刘秀芳. 黄芩苷对错配修复基因缺失LoVo细胞的抑制作用及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2376-2380
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2376.asp>

0 引言

遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)是错配修复基因(mismatch repair, MMR)突变导致的常染色体显性遗传性疾病, 约占结直肠癌的5%-15%, 外显率为90%^[1]. MMR发生突变, 蛋白表达下降、不表达或出现截短, DNA复制错误增加, 微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)而发生结直肠癌. MSI是HNPCC分子表型特征, 90%以上的HNPCC表现为MSI^[2]. 目前对HNPCC化学治疗缺少有效的治疗药物, 研究表明HNPCC肿瘤对以5-FU为主的化疗方案具有抵抗作用^[3]. 非甾体抗炎药物通过抑制环氧化物酶(COX)来达到降低结直肠癌发生的作用, 在临床预防结直肠癌取得了一定成绩^[4]. 研究表明, 清热解毒类中药黄芩、穿心莲等具有类似非甾体抗炎药物的功效, 能通过多途径抑制肿瘤细胞增殖^[5-6].

本研究通过黄芩苷干预错配修复基因缺失的结肠癌LoVo细胞(错配修复基因hMSH2缺失), 探讨黄芩苷诱导错配修复基因缺失结肠腺癌LoVo细胞的凋亡作用及其对微卫星序列的影响, 为中药预防和治疗HNPCC肿瘤提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 黄芩苷购自中国中医药研究所. 错配修复基因hMSH2缺失的结肠腺癌LoVo细胞株购自中科院上海细胞所. F12培养基(Gibco生物有限公司); 胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司); In Situ Cell Death Detection Kit, POD(上海

罗氏诊断产品有限公司); DAB显色Kit(福建迈新生物工程有限公司); Premix Taq(TaKaRa Bio日本株式会社); 琼脂糖、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、尿素、过硫酸胺(Sigma生物工程有限公司); 无水碳酸钠、硝酸银、溴酚兰均为国产分析纯; 寡核酸引物Bat-25, D2S123由美国ABI生物有限公司合成(引物序列D2S123: 上游5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3', 下游5'-GGACTTTCCACCTATGG GAC-3'; Bat-25: 上游5'-TCGCCTCCAAGAATGTA AGT-3', 下游5'-TCTGCATT TTAATATGGCTC-3'). CO₂培养箱、超净工作台、倒置显微镜、ABI9700PCR仪、垂直电泳仪.

1.2 方法

1.2.1 药品处理: 黄芩苷40 mg溶于19.8 mL生理盐水+100 μ L HCl(1 mol/L)+100 μ L NaOH(1 mol/L), 过滤除菌, 使用浓度为20 μ g/mL. 阿司匹林1.8 g溶于2 mL乙腈(1 g/L)+ 4 mL NaOH(1 mol/L)+2 mL HCl(1 mol/L), 过滤除菌, 使用浓度为2.5 mmol/L 1 g/L乙腈溶液为对照.

1.2.2 细胞培养及样本处理: LoVo细胞以F12培养基, 200 mL/L胎牛血清, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养. 取 5×10^7 个/L细胞种于6孔板爬片, 24 h后加药, 分别于48 h, 96 h, 1 wk收集细胞, 无水乙醇固定. 取 5×10^8 个/L细胞种于细胞瓶内, 24 h后加药, 分别于48 h, 96 h, 1 wk用2.5 g/L胰蛋白酶-EDTA消化收集细胞, 用预冷的PBS洗2次, -20 $^{\circ}$ C冻存备用.

1.2.3 TUNEL法检测细胞凋亡: 取上述不同时间的细胞, 新鲜配制的40 g/L多聚甲醛-PBS液(0.01 mol/L, pH7.4)室温下固定30 min, TBS洗涤; 20 mL/L H₂O₂-甲醛室温孵育30 min, TBS洗涤; 通透液冰浴2 min, TBS洗涤; 加入TUNEL混合液, 37 $^{\circ}$ C湿盒内放置2 h, TBS洗涤; 加入转换液, 37 $^{\circ}$ C湿盒内放置30 min, TBS洗涤; 最后以DAB显色, 苏木精复染并固定. 于倒置显微镜下观察, 核染成棕褐色的细胞为凋亡细胞. 随机数5个以上视野, 计算凋亡细胞所占百分率即为凋亡细胞的标记指数.

1.2.4 单链多态性分析(PCR-SSCP)检测细胞MSI: 采用1997年结直肠癌微卫星DNA不稳定国际专题会议确定的5个MSI检测位点中的BAT-25、D2S123作为检测引物^[7], 引物序列来自NCBI基因库(D2S123 Forward: 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' Reverse: 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'; Bat-25 Forward: 5'-TCG

■ 研发前沿

HNPCC患者未能从以5-FU为基础的化疗中获益. 针对HNPCC肿瘤特异性的发病机制, 寻求能够调控和修复MMR基因功能表达的有效药物对HNPCC患者及家族携带者的预防和治疗具有重要意义.

■相关报道

国外最新研究表明非甾体类抗炎药可以通过提高MMR基因的蛋白表达,降低微卫星不稳定而诱导错配修复缺失的肿瘤细胞凋亡。黄芩等清热解毒类中药具有类似非甾体类抗炎药物的作用,多个研究表明黄芩苷具有抑制肠癌、前列腺癌肿瘤细胞的作用。

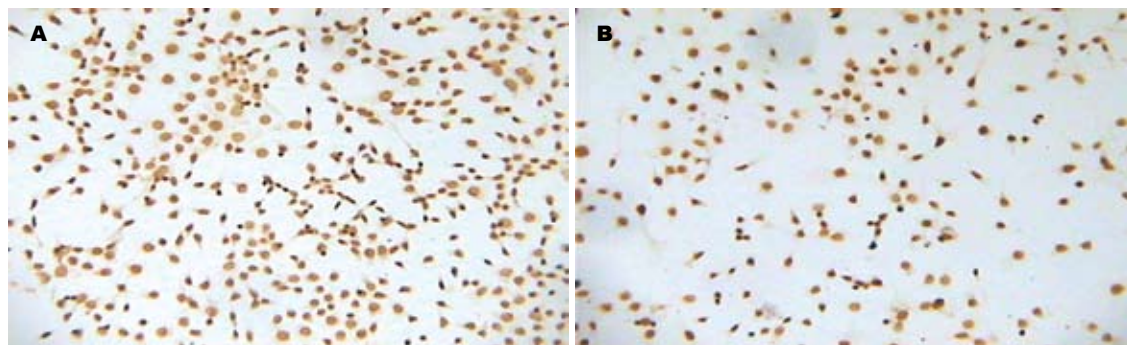


图1 96 h黄芩和阿司匹林诱导LoVo细胞凋亡形态学改变。A: 黄芩; B: 阿司匹林。

表1 不同药物及作用时间与LoVo细胞凋亡指数 (%)

分组	48 h	96 h	1 wk
黄芩	42.24 ^a	93.33 ^b	63.29 ^c
空白对照组	5.30	7.33	7.64
阿斯匹林	29.19	44.23	23.20
乙腈	12.73	10.13	12.82

$\chi^2 = 3.15$, ^a $P = 0.075$; $\chi^2 = 53.83$, ^b $P = 0.0000$; $\chi^2 = 31.13$, ^c $P = 0.0000$ vs 阿司匹林。

CCTCCAAGAATGTAAGT-3' Reverse: 5'-TCTG CATTTTAACTATGGCTC-3'), 由美国ABI生物有限公司合成。取上述不同时间位点的细胞,按DNA抽提试剂盒说明书抽提细胞基因组DNA。7 g/L琼脂糖电泳检测抽提产物。PCR反应体系20 μ L,模板DNA 1 μ L,上下游引物各2 μ L,去离子H₂O 5 μ L, Premix Taq 10 μ L。PCR扩增反应方程式: 95℃预变性15 min, 94℃变性40 s, 56℃退火1 min, 72℃延伸40 s,共30个循环,72℃充分延伸3 min,产物4℃保存。取10 μ L PCR扩增产物95℃变性5 min,迅速置于冰浴;加入10 μ L凝胶上样缓冲液(950 g/L去离子甲酰胺,20 mmol/L EDTA pH8.0,50 mg/L溴酚兰,50 mg/L二甲苯青),置于80 g/L变性聚丙烯酰胺中250 V恒压电泳6 h后,水洗、银染显色、拍照。变性凝胶电泳检测后出现任何不同于正常对照的电泳结果,包括条带的增加、减少或单链位置不同,判断为MSI改变。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件作数据处理分析。不同药物组间采用卡方检验。

2 结果

2.1 不同药物对LoVo细胞的凋亡指数 黄芩、阿斯匹林对结肠LoVo细胞均有明显的诱导凋亡的作用,被染成棕褐色的细胞呈典型的凋亡细胞

形态学改变(图1)。与对照组相比,黄芩、阿斯匹林诱导细胞凋亡的作用统计学差异有显著意义($P = 0.0000$)。阳性细胞凋亡指数视不同的药物而存在较大的差异,黄芩对结肠LoVo细胞的诱导凋亡作用明显强于阿司匹林,24 h两者统计学差异无意义(42.24% vs 29.19%, $P = 0.075$),96 h和1 wk时两者统计学差异有显著意义(93.33% vs 44.23%, $P = 0.0000$; 63.29% vs 23.20%, $P = 0.0000$),其作用时间在96 h达到高峰,与时间不呈依赖关系(表1)。

2.2 黄芩对结肠癌LoVo细胞MSI位点D2S123、BAT-25状态的影响 各时间位点的细胞微卫星位点D2S123、BAT-25的PCR扩增产物经15 g/L琼脂糖电泳检测,结果显示PCR扩增满意(图2)。PCR-SSCP检测结果显示,LoVo细胞表现为MSI,但对照组、黄芩、阿司匹林干预后条带均未发生增加、减少或单链位置改变,提示药物干预后MSI状态无变化(图3)。

3 讨论

HNPCC是一种常染色体显性遗传性疾病,约占结直肠癌的5%-15%,其外显率为90%^[1]。HNPCC的遗传学基础是MMR的突变。错配修复基因在DNA复制过程中水解错配的碱基而维持DNA的精确复制,保证人类遗传的保守性和稳定性。一旦该基因发生突变,错配修复蛋白表达下降、不表达或出现截短,DNA复制错误增加,微卫星不稳定而致结直肠癌及其他肠外肿瘤的发生,该机制是结直肠癌发生的另一个途径。MSI是HNPCC肿瘤的一个重要特征,90%以上的HNPCC家系中的肿瘤具有MSI的特征,15%散发性结直肠癌表现为MSI^[2]。

目前对MSI结直肠癌化学治疗缺少有效的治疗药物,多个研究显示MSI结直肠肿瘤对以5-FU为主的化疗方案具有抵抗作用^[3,8-9]。Corleto

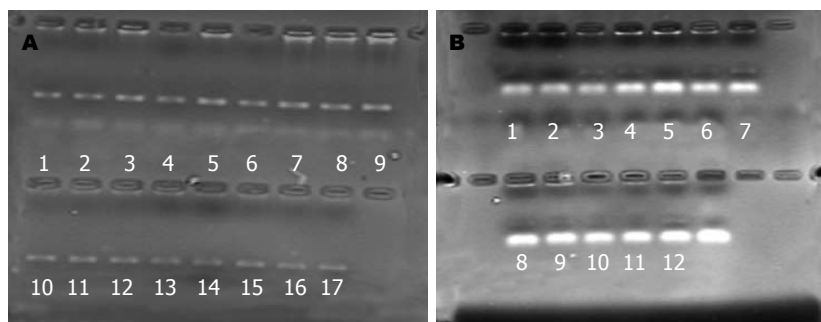


图 2 琼脂糖电泳检测PCR扩增产物. A: D2S123; B: BAT-25.

■应用要点

本研究显示黄芩苷具有特异性抑制错配修复基因缺失的结直肠癌细胞株作用, 其作用效果明显强于阿司匹林, 黄芩可望成为临床预防和治疗HNPCC的中药.

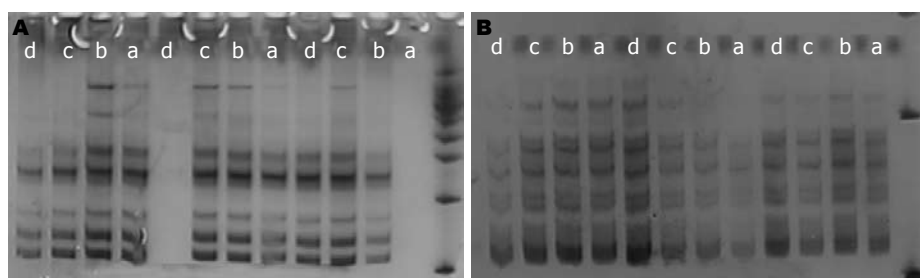


图 3 变性凝胶电泳检测药物干预后96 h的MSI状态. A: D2S123; B: BAT-25; a: 黄芩; b: 空白对照组; c: 阿司匹林; d: 乙腈.

et al^[11]研究了225例HNPCC, 10.2%的患者5年内发生异时性结直肠癌; Wagner *et al*^[10]认为在手术切除了原发结肠肿瘤后, 45%的患者在10年内再次发生结肠癌. 寻求预防和治疗HNPCC有效的药物有利于提高HNPCC治愈率. 非甾体类抗炎药在FAP预防和治疗作用已得到广泛的承认, 其主要通过抑制COX-2达到预防和治疗FAP息肉和结直肠癌的作用^[4]. 黄芩苷是唇形科植物黄芩的有效成分之一, 有清热解毒、抗炎、利胆、抗变态反应等作用, 具有类似非甾体抗炎药物如阿司匹林、消炎痛等的功效. 最近研究表明这些中药可以诱导细胞凋亡、抑制肿瘤发生, 有一定的抗肿瘤及预防肿瘤的作用. 本研究结果显示黄芩苷和阿司匹林都能够诱导错配修复基因hMSH2缺失的结肠LoVo细胞凋亡, 与对照组之间存在显著差异($P = 0.0000$). 在48 h时, 黄芩、阿斯匹林诱导结肠LoVo细胞凋亡作用无显著差异, 96 h和1 wk时统计学差异有显著意义, 黄芩明显优于阿斯匹林($P = 0.0000$), 其作用时间在96 h达到高峰, 与时间不呈依赖关系. 目前关于黄芩诱导肿瘤细胞凋亡的机制尚不明确. Matsuzaki^[12]认为黄芩诱导肿瘤细胞凋亡的机制与有效抑制DNA复制的拓扑异构酶-2活性有关. Chenn *et al*^[13]研究发现黄芩能够上调促凋亡基因BAX, 下调凋亡抑制基因bcl-2而诱导细胞凋亡.

Rüschhoff *et al*^[14]研究发现70% HNPCC结肠癌中COX-2基因呈低表达, 认为非甾体抗炎药并不是通过抑制COX-2途径来诱导HCT116细胞(hMLH1缺失)和LoVo细胞凋亡, 其研究结果显

示发生凋亡的细胞中微卫星不稳定下降, 并从生长细胞中消失. Goel *et al*^[15]在HCT-116细胞、HCT-116+chr3细胞和SW480细胞加入阿司匹林, 发现这3株细胞在48 h和72 h可以发生凋亡, 而且3株细胞的hMLH1、hPSM2、hMSH6和hMSH2基因表达均提高. 本研究发现尽管黄芩对错配修复基因hMSH2缺失LoVo细胞有较强的促凋亡作用, 但PCR-SSCP检测药物作用的不同时间位点微卫星标志BAT-25、D2S123, 条带未发生改变, 黄芩诱导LoVo细胞凋亡可能通过其他途径. 本实验采用的MSI检测位点较少, 药物作用时间较短, 检测方法敏感性等, 结果可能存在误差. 在另一项应用荧光多重聚合酶链反应法检测结直肠癌微卫星不稳定的研究结果显示准确性和敏感性明显高于SSCP法^[16]. 因此, 本研究拟进一步延长药物作用时间、扩大MSI检测位点和检测错配修复基因蛋白定量的改变, 并通过其他途径深入研究黄芩在MSI肿瘤预防和治疗机制.

针对癌变机制在分子水平上进行化学干预已成为令人关注的领域, 寻找具有特异性治疗和预防MSI结直肠癌的有效治疗药物对提高结直肠癌患者生存率具有重要意义. 本研究显示黄芩有较强的诱导错配修复基因缺失的结肠腺癌LoVo细胞凋亡作用, 作用效果较阿司匹林强, 对其作用机制的深入研究有利于开辟中药防治HNPCC肿瘤的新途径.

4 参考文献

- 1 Muller A, Fishel R. Mismatch repair and the

■同行评价

本文立意有新颖性,设计科学,结果客观、可信,对指导临床HNPCC的治疗有一定参考价值。

- 2 杨柏林. 微卫星不稳定性结直肠癌分子病理特征及hMLH1基因甲基化. 大肠肛门病外科杂志 2005; 11: 312-314
- 3 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257
- 4 Ramu R, Marcia CC. Chemoprevention of colorectal cancer. *Dis colon rectum* 2005; 49: 113-125
- 5 顾正勤, 孙颖浩, 许传亮, 刘毅. 黄芩苷诱导前列腺癌细胞株DU145凋亡的体外研究. 中国中药杂志 2005; 30: 63-66
- 6 孙吉平, 贾延勋, 宋健辉, 杨于嘉. 黄芩苷抑制大鼠胰岛细胞瘤细胞株增殖的分子机制研究. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 337-340
- 7 Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456
- 8 Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 394-401
- 9 Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, Sabourin JC, Ducreux M, Praz F. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5738-5744
- 10 Wagner A, van Kessel I, Kriege MG, Tops CM, Wijnen JT, Vasen HF, van der Meer CA, van Oostrom II, Meijers-Heijboer H. Long term follow-up of HNPCC gene mutation carriers: compliance with screening and satisfaction with counseling and screening procedures. *Fam Cancer* 2005; 4: 295-300
- 11 Corleto VD, Zykaj E, Mercantini P, Pillozzi E, Rossi M, Carnuccio A, Di Giulio E, Ziparo V, Delle Fave G. Is colonoscopy sufficient for colorectal cancer surveillance in all HNPCC patients? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7541-7544
- 12 Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S, Matsumura Y, Kobayashi N, Okita K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 170-177
- 13 Chenn S. In vitro mechanism of PC SPES. *Urology* 2001; 58: 28-35; discussion 38
- 14 Rüschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, Bocker T, Brockhoff G, Hofstädter F, Fishel R. Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11301-11306
- 15 Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 383-390
- 16 杨柏林, 赖仁胜, 金黑鹰, 谢玲, 丁曙晴, 朱长乐, 丁义江. 应用荧光多重聚合酶链反应法检测结直肠癌微卫星不稳定. 中华实验外科杂志 2007; 24: 301-303

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, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}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*ln*-(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}, *V*_d, *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 2008-07-28)

低氧微环境与胃癌

郭花, 朱金水

郭花, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科 上海市 200233

作者贡献分布: 本论文由朱金水指导、审阅; 由郭花设计、撰写完成。

通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科. zhujs1803@hotmail.com

电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019

收稿日期: 2008-03-26 修回日期: 2008-06-12

接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-07-28

Hypoxia environment and gastric cancer

Hua Guo, Jin-Shui Zhu

Hua Guo, Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Dr. Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2008-03-26 Revised: 2008-06-12

Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-07-28

Abstract

Tumor hypoxia is a characteristic in many solid tumors. It has been demonstrated that hypoxia in gastric cancer could promote tumor microvessels angiogenesis, affect tumor cell apoptosis, regulate cell cycle, decrease the therapeutic efficacy of radiotherapy, surgery and some forms of chemotherapy, and promote tumor invasion and metastasis. Using oxygen electrodes, radiological and nuclear medical imaging techniques we could assess the tumor oxygenation status. The use of hyperbaric oxygen, carbogen and ARCON and hypoxic cell radiosensitisers can improve the efficacy of radiation and chemotherapy. Hypoxia environment indicates several new methods to treat gastric cancer, and the exogenous markers of tumor hypoxia, HIF-1 inhibitor, and HIF-1 gene therapy will be the focus in the future.

Key Words: Hypoxia; Gastric cancer; Radiotherapy; Chemotherapy

Guo H, Zhu JS. Hypoxia environment and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2381-2384

摘要

低氧是恶性肿瘤微环境的特征之一, 胃癌低氧状态能促进肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、影响细胞周期和增殖、增加放化疗及手术的抵抗性, 使肿瘤对放化疗的疗效明显下降, 并且促进肿瘤的侵袭和远处转移。通过体内氧电极测定、放射自显影、核磁影像技术等方法能够检测胃癌肿瘤的低氧微环境。采用吸入高压氧、carbogen或ARCON气体、给予缺氧细胞放射增敏剂等方法能提高肿瘤的放疗疗效。虽然胃癌肿瘤的低氧微环境对其治疗产生了一定影响, 但其低氧微环境也为临床治疗提供了新的治疗方法, 使胃癌低氧靶向治疗成为可能。因此, 针对肿瘤低氧的低氧标记药物、HIF-1抑制剂、HIF-1基因治疗等将成为今后的研究热点。

关键词: 低氧; 胃癌; 放疗; 化疗

郭花, 朱金水. 低氧微环境与胃癌. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2381-2384

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2381.asp>

0 引言

1955年Thomlinson *et al*首次发现人类肿瘤中存在肿瘤组织内低氧现象, 随着低氧检测技术的不断完善, 越来越多的证据表明人类肿瘤普遍存在低氧微环境, 低氧微环境使肿瘤对放化疗及手术治疗的疗效明显下降。1996年Brizel *et al*^[1]首次发现人类肿瘤远处转移与肿瘤低氧微环境有着密切的相关性。低氧引起肿瘤细胞发生一系列生物学改变, 如细胞代谢的变化、基因表达及基因表型改变、蛋白合成变化等^[2-4], 其结果主要表现在以下几个方面: 促进肿瘤新生血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、影响细胞周期、促进肿瘤的侵袭和远处转移、对放化疗产生抵抗等^[5-7]。低氧状态下的胃癌细胞对放射及化学治疗的效果不理想, 使肿瘤的治疗陷入了困境, 因此胃癌的低氧微环境成为医生及研究学者的研究热点。

胃癌中的低氧微环境是由多种因素参与共同形成的, 如肿瘤组织的快速生长导致血管紊

■背景资料

胃癌低氧状态能促进肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、增加放化疗及手术的抵抗性, 并且促进肿瘤的侵袭和远处转移。

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

■相关报道

低氧是恶性实体瘤的特征之一。研究表明肿瘤内部的氧压力明显低于正常组织。

乱、肿瘤的血液供应能力下降、氧气消耗增加,以及患者处于贫血状态、血红蛋白下降等有关^[8-9]。严重低氧时还可能导致肿瘤组织坏死,但非致命性低氧将对肿瘤细胞的生物学功能产生重要影响,有多种细胞因子和信号转导通路参与此变化过程。随着对肿瘤低氧微环境研究的不断深入,近20多年来人们发现低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)与哺乳细胞低氧微环境密切相关^[10-11],而且还发现了许多提高肿瘤治疗疗效的新方法,低氧微环境这一特点为肿瘤的治疗提供了独特的方法,其中一些治疗策略已经用于动物实验模型及临床实验之中。因此,本文就胃癌低氧微环境及相关检测方法、治疗策略作一评价。

1 胃癌低氧微环境的病理生理学

胃癌细胞的低氧微环境是其病理生理学特点之一。肿瘤低氧状态是由于细胞内氧气供应和消耗之间不平衡造成,肿瘤组织生长快,其内部血流灌注低下,虽然肿瘤内有异常新生血管形成,但肿瘤细胞的氧消耗量超过组织的供氧能力,因此表现出相对不足。另外肿瘤患者的贫血状态使机体供氧能力下降也促进肿瘤低氧微环境的发生。从低氧的发生发展方式上可将胃癌缺氧分为两种:慢性缺氧和急性缺氧。慢性缺氧是由于肿瘤细胞距的距离超过氧气的有效弥散距离(100-150 μm),因而处于缺氧状态;急性缺氧由于肿瘤血管网的结构和功能异常,或肿瘤组织间液压升高使血管内血流暂时减少或阻滞等原因导致短暂的血流中断、血管周围细胞缺氧^[12],但这两种不同的缺氧类型在同一肿瘤中往往是同时存在的。有学者对原发进展期肿瘤进行局部氧分压测定,发现肿瘤组织内的氧分压水平呈区域性分布,但是在肿瘤无氧区域与低氧区域之间很难确定一个明确的分界线将两者一分为二。通过局部氧分压测定发现正常组织氧分压为40-60 mmHg,而肿瘤中氧分压多为8-10 mmHg,有40%的肿瘤氧分压低于5 mmHg, 27.5%的肿瘤氧分压低于2.5 mmHg,研究还发现肿瘤氧分压低的患者的总体生存率比氧分压高的患者预后差^[13-14]。

2 胃癌低氧环境与治疗抵抗

胃癌的低氧状态使胃癌细胞在抵抗放化疗方面扮演着非常重要的角色。临床研究发现部分胃癌患者对放疗的效果不甚理想,研究表明胃癌放疗治疗的疗效受组织氧合程度影响,含氧量低的低氧胃癌肿瘤细胞对放疗的抵抗性是正常

不乏氧细胞的3倍^[15]。这是由于在生理情况下放疗时组织细胞能产生一定数量的氧自由基,这些具有高度活性的自由基能使DNA双链断裂、细胞死亡。氧分压正常时,氧气能够稳定自由基,从而促进自由基对DNA造成损伤、破坏机体修复能力,从而达到一定的杀伤力。但在低氧的肿瘤细胞中,氧气稳定自由基的能力下降,放疗时产生氧自由基受到限制,因此低氧肿瘤对放疗的敏感性下降。Sundf r *et al*^[16]认为原发肿瘤中氧分压低于5 mmHg的亚肿瘤区域的大小是判断患者预后的重要指标。研究还发现肿瘤氧分压低于0.5 mmHg时,即使是致死剂量的放射线,对肿瘤细胞也没有杀伤作用。

此外,肿瘤患者常处于贫血状态,正常组织能够通过增加组织灌注而代偿轻度至中度贫血,但由于肿瘤组织中血管结构异常紊乱,代偿能力下降所以得不到足够的氧气。临床研究表明肿瘤患者低血红蛋白水平与放化疗效果差存在显著相关性^[17],其治疗效果不理想的主要原因仍是细胞低氧。

3 胃癌肿瘤低氧的检测技术

测定实体瘤中氧压力对判断患者预后有很高的临床价值。近年来,放射自显影、核磁影像技术、极普法等已被用于检测肿瘤的低氧区域^[18]。

体内氧电极测定法是唯一可以直接检测肿瘤氧分压的方法,研究发现正常组织中氧分压呈典型的高斯分布,氧分压平均介于40-60 mmHg,而肿瘤组织中氧分压低,其中半数低于10 mmHg。在较长一段时间内,氧电极技术曾被认为是临床上测量肿瘤内氧压力的金标准^[19]。但是该技术仅用于易于获取的浅表肿瘤组织,无法区别严重缺氧和坏死、操作时需要外科手术介入可能引起创伤等因素而存在一定局限性。

利用生物还原药物是一种检测肿瘤内氧分压的无创性技术。该类药物中最常用的内源性标志物是硝基咪唑类,硝基咪唑经过主动扩散通过细胞膜进入细胞,通过胞内还原酶(主要是黄嘌呤氧化酶)的作用,被还原产生自由的阴离子,该中间体在缺氧环境中进一步被还原,与细胞内组分共价结合形成胞内加合物而滞留在细胞中。硝基咪唑在组织中的蓄积量与低氧组织中存活细胞的氧含量呈一定比例,但不聚集于坏死细胞中,进而用正电子放射断层扫描摄影、核磁共振等影像学技术反应肿瘤内的氧化程度^[20]。由于此类化合物反应慢,需要足够的时

■创新盘点

本文对胃癌低氧微环境的病理生理机制、检测方法 & 治疗抵抗等进行了深刻的阐述,提出了新的治疗思路。

间来进行还原反应和结合反应, 因此更适用于慢性低氧细胞的检测。

利用放射性核素 ^{18}F 、 ^{62}Cu 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 等标记的缺氧组织显影剂进行SPECT或PET显影技术也可以对肿瘤内低氧组织进行定性和定量检测^[21-22], 该方法是目前检测肿瘤内低氧状态较为成熟的非侵入性技术。此外, 利用低氧细胞内源性标志物HIF-1 α 、CA9、Glut-1等也能够检测低氧肿瘤的分布空间、检测肿瘤的低氧状态。

4 改善胃癌低氧状态及提高疗效的措施

有证据表明胃癌肿瘤内低氧状态是提示患者预后的指标之一, 早期人们曾用高压氧提高肿瘤内氧含量的方法来提高放疗疗效, 但吸入高压氧可能引起呼吸抑制, 反而使肿瘤的血供更差, 所以后来在高压氧中加入适量二氧化碳气体, 于是诞生了carbogen(卡铂金), 他是由950 g/L氧气和50 g/L二氧化碳构成的混合气体, 放疗前吸入carbogen能改善组织慢性缺氧, 能扩张血管、加快血流速度, 提高放疗疗效^[23]。临床研究表明, 放疗前吸入carbogen气体能明显提高局部头颈癌、子宫颈癌的放疗疗效, 由于某些复杂的技术原因, 临床工作中并没有完全接受这种治疗方式。目前卡铂金联合烟酰胺加速放疗(accelerated radiotherapy combined with carbogen and nicotinamide, ARCON)的方法正在III期临床试验中^[24]。

放射增敏剂被认为是最有希望解决低氧细胞放射线抗拒问题的方法之一。理想的增敏剂应仅对肿瘤细胞有放射增敏作用, 而对正常组织无毒性或毒性很低, 并且能透入肿瘤细胞缺氧区域, 较少或不分布于正常组织中。其代表药物是硝基咪唑类化合物, 如5-硝基咪唑和2-硝基咪唑。他能模拟氧的放射增敏作用, 并选择性与低氧细胞结合, 由于其不参加正常细胞代谢过程, 故不受血管弥散的限制, 从而可以最大限度的使缺氧细胞增敏, 但由于其胃肠道和神经系统副作用使该类药物在临床应用上受到一定限制^[25]。新型毒性较低的增敏剂正在研究开发之中。

一种新型放疗增敏剂Tirapazamine在缺氧状态时会转变为拓扑酶抑制剂, 对肿瘤组织内乏氧细胞具有显著的杀伤作用, 抑制了肿瘤组织内由于乏氧细胞存在导致的抗凋亡作用及放射抵抗性, 因而可以显著增加肿瘤放射治疗的抗肿瘤作用^[26-27]。该药也可以与放射治疗或化学治疗药物同时使用, 消灭不同缺氧程度的癌细胞。

该药的II期临床试验证实他可以增加传统放化疗治疗的疗效, 提高患者反应率及总体生存率。该药还被用于其他癌症的同步化学疗法, 目前已有报告发现在III/IV级头颈部小细胞癌中, 该药与顺铂合用能提高患者3年生存率^[28]。

携带有治疗性基因或无毒性药物酶的厌氧菌也有抗肿瘤作用, 这种厌氧菌被注射到肿瘤低氧区域后发挥活性作用, 全身不良反应少。如*C. novyi-NT*是一种厌氧型细菌, 他能增加脂质酶包裹的多柔比星等药物在肿瘤低氧区域的释放, 这种蛋白可以用于肿瘤化疗过程中药物特异性呈递, 加强微脂粒癌症药物的释放, 增加其疗效^[29]。

HIF-1是胃癌低氧微环境中重要的转录因子, 他过表达于肿瘤组织, 并且参与肿瘤的发生发展过程, 并且受PI3K/Akt、MAPK信号转导通路的调控, 因此是一个新的治疗靶点。目前已提出新靶向HIF-1转录因子治疗胃癌的新思路, 针对HIF-1转录翻译、上游信号活化、信号传导通路、下游效应分子等一些新的治疗方法已经被提出^[30]。如应用LY294002、wortmannin、PD98059等抑制PI3K-AKT-mTOR或MAPK信号转导通路^[31]、应用表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂吉非替尼和埃罗替尼^[32-33]、应用HIF-1反义RNA或shRNA基因治疗^[34]、应用HIF-1小分子抑制剂YC-1、HIF-1 DNA结合活性抑制剂、HIF-1转录活性抑制剂等方法均能抑制胃癌生长。

5 结论

胃癌肿瘤的低氧微环境是放疗、化疗、手术等疗效的重要影响因素, 胃癌低氧状态也是局部复发和远处转移的重要危险因素。低氧虽然改变了肿瘤细胞的生物学特性, 影响其临床预后, 但针对其特异的低氧微环境也为临床肿瘤治疗提供了一些新的治疗方法, 使肿瘤低氧靶向治疗成为可能。因此, 针对胃癌低氧的低氧激活药物、HIF-1信号转导通路、HIF-1抑制剂和HIF-1基因治疗等将成为今后的研究热点^[35]。

6 参考文献

- 1 Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; 56: 941-943
- 2 Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. *Bioessays* 2007; 29: 738-744
- 3 Le QT, Denko NC, Giaccia AJ. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*

■应用要点

HIF-1与低氧的关系十分密切, 针对胃癌低氧的HIF-1抑制剂及其信号通路、HIF-1基因治疗等将成为今后的研究热点。

■同行评价

本文内容新颖, 文笔流畅, 论据充分, 为临床肿瘤治疗提供了新方法。

- 2004; 23: 293-310
- 4 Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007; 85: 1301-1307
- 5 Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 333-339
- 6 Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 341-352
- 7 Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr Mol Med* 2008; 8: 60-67
- 8 Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1441-1454
- 9 Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 281-290
- 10 Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 2008; 15: 621-627
- 11 Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 678-685
- 12 Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 4-9
- 13 Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 237-250
- 14 Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18: 243-259
- 15 Okunieff P, Fenton B, Chen Y. Past, present, and future of oxygen in cancer research. *Adv Exp Med Biol* 2005; 566: 213-222
- 16 Sundfør K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1998; 78: 822-827
- 17 Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004; 116 Suppl 7A: 11S-26S
- 18 Bratasz A, Pandian RP, Deng Y, Petryakov S, Grecula JC, Gupta N, Kuppusamy P. In vivo imaging of changes in tumor oxygenation during growth and after treatment. *Magn Reson Med* 2007; 57: 950-959
- 19 Serganova I, Humm J, Ling C, Blasberg R. Tumor hypoxia imaging. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5260-5264
- 20 Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-276
- 21 O'Donoghue JA, Zanzonico P, Pugachev A, Wen B, Smith-Jones P, Cai S, Burnazi E, Finn RD, Burgman P, Ruan S, Lewis JS, Welch MJ, Ling CC, Humm JL. Assessment of regional tumor hypoxia using 18F-fluoromisonidazole and 64Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) positron emission tomography: Comparative study featuring microPET imaging, Po2 probe measurement, autoradiography, and fluorescent microscopy in the R3327-AT and FaDu rat tumor models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 1493-1502
- 22 Padhani A. PET imaging of tumour hypoxia. *Cancer Imaging* 2006; 6: S117-S121
- 23 Hoskin PJ, Rojas AM, Phillips H, Saunders MI. Acute and late morbidity in the treatment of advanced bladder carcinoma with accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide. *Cancer* 2005; 103: 2287-2297
- 24 Bernier J, Denekamp J, Rojas A, Minatel E, Horiot JC, Hamers H, Antognoni P, Dahl O, Richaud P, Glabbeke MV, PieArart M. ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in head and neck squamous cell carcinomas. The experience of the Co-operative group of radiotherapy of the european organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Radiother Oncol* 2000; 55: 111-119
- 25 Hoogsteen IJ, Marres HA, van der Kogel AJ, Kaanders JH. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19: 385-396
- 26 McKeown SR, Cowen RL, Williams KJ. Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19: 427-442
- 27 Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D. Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem* 2008; 15: 322-338
- 28 Rischin D, Peters L, Fisher R, Macann A, Denham J, Poulsen M, Jackson M, Kenny L, Penniment M, Corry J, Lamb D, McClure B. Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation versus Fluorouracil, Cisplatin, and Radiation in patients with locally advanced head and neck cancer: a randomized phase II trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 98.02). *J Clin Oncol* 2005; 23: 79-87
- 29 Cheong I, Huang X, Bettgowda C, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Zhou S, Vogelstein B. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs. *Science* 2006; 314: 1308-1311
- 30 Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 9445-9450
- 31 Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2170-2180
- 32 Lu Y, Liang K, Li X, Fan Z. Responses of cancer cells with wild-type or tyrosine kinase domain-mutated epidermal growth factor receptor (EGFR) to EGFR-targeted therapy are linked to downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cancer* 2007; 6: 63
- 33 Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. *Breast Cancer* 2007; 14: 132-149
- 34 Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 601-605
- 35 Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13 Suppl 1: S61-S75

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和问题

王石林, 顾国利

王石林, 顾国利, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100036

作者贡献分布: 本文由王石林提出并完成, 顾国利参与部分文献检索, 资料整理和编辑工作。

通讯作者: 王石林, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院普通外科. wangshilin@medmail.com.cn
电话: 010-66928302

收稿日期: 2008-04-21 修回日期: 2008-06-11

接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-07-28

Present status and problems in diagnosis and treatment of Peutz-Jeghers syndrome

Shi-Lin Wang, Guo-Li Gu

Shi-Lin Wang, Guo-Li Gu, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Correspondence to: Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China, wangshilin@medmail.com.cn

Received: 2008-04-21 Revised: 2008-06-11

Accepted: 2008-06-30 Published online: 2008-07-28

Abstract

Peutz-Jeghers syndrome (PJS) is an autosomal dominant inherited disease, which is caused by inactivating germline mutations in LKB1/STK11 and characterized by mucocutaneous pigmentation, multiple gastrointestinal hamartomatous polyps and family history. Life-threatening complications include intestinal obstruction, an increasing risk for developing gastrointestinal malignancies and extraintestinal cancers. PJS more frequently happens to teenagers. Besides susceptibility to malignant cancer, it was characterized by complications associated with polyps, repeated hospitalizations and operations, as well as a high cost of medical cost, which especially brings harm to one-child family in China. This paper focuses on the diagnoses and treatments in PJS, such as clinical use of double-balloon enteroscopy and open surgery combined with intraoperative endoscopy. Also, COX-2 inhibitors and rapamycin for chemoprevention are introduced.

Key Words: Peutz-Jeghers syndrome; Tumor; Therapy; Diagnosis

Wang SL, Gu GL. Present status and related problems in diagnoses and treatments for Peutz-Jeghers syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2385-2389

摘要

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)是一种常染色体显性遗传性疾病, 主要突变基因是LKB1/STK11, 胃肠道错构瘤, 皮肤黏膜色素斑和家族遗传性为其主要特点, 主要并发症是肠梗阻和肠道及胃肠道外恶性肿瘤。本病好发于青少年, 除有恶变倾向外, 由肠道息肉导致的并发症, 反复住院, 多次手术, 高昂的医疗费用, 对国内只有一个独生子女的小家庭, 危害极大。本文着重论述PJS临床诊断和治疗中的一些问题, 如双气囊电子小肠镜的临床应用, 内镜配合手术治疗的经验, 介绍抑制环氧化酶2(COX-2)抑制剂和雷帕霉素预防PJS的新动向。

关键词: Peutz-Jeghers综合征; 肿瘤; 诊断; 治疗

王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和相关问题. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2385-2389

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2385.asp>

0 引言

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS), 又称黑斑息肉病, 是一种常染色体显性遗传性疾病, 主要突变基因是LKB1/STK11, 临床表现以皮肤黏膜色素斑, 胃肠道错构瘤和家族遗传性为三大特征^[1-2]。本病好发于青少年, 除有恶变倾向外, 由肠道息肉导致的并发症, 反复住院, 多次手术, 高昂的医疗费用, 对国内只有一个独生子女的小家庭, 危害极大。该病目前在临床诊断和治疗上还存在一些问题, 值得进一步研究。

1 临床诊断

2003年全国遗传性大肠癌协作组制定了中国人遗传性大肠癌筛检标准的实施方案, 其中PJS的诊断标准为^[3]: 消化道多发错构瘤性息肉伴皮肤,

■背景资料

PJS是一种由LKB1/STK11突变而引起的常染色体显性遗传性疾病, 其主要临床特点是胃肠道错构瘤, 皮肤黏膜色素斑和家族遗传性。主要并发症是肠梗阻和肠道及胃肠道外恶性肿瘤。本病好发于青少年, 除有恶变倾向外, 由肠道息肉导致的并发症, 反复住院, 多次手术, 高昂的医疗费用, 对国内只有一个独生子女的小家庭, 危害极大。

■同行评议者

王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科

■创新盘点

本文在总结PJS的传统临床经验和基础研究进展的同时,也介绍了诸如小肠镜,胶囊内镜,雷帕霉素等一些新诊治技术和方法。

黏膜色素沉着,可有或无家族史。被诊断为PJS者应进行相关基因检测。一般来说,典型PJS诊断不难,但有些患者因多种原因仍可能漏诊。

1.1 黑斑 黑斑是PJS的主要特征之一,黑斑常见于口唇,颊黏膜,手指,手掌,足趾,还可见于会阴部皮肤黏膜。婴儿期口腔颊黏膜上出现的黑斑,有的仅有针尖大小,容易忽略,有的患儿在口腔科就诊由医生偶尔发现黏膜黑斑。青春期后皮肤黑斑可消退,有少数病例仅有胃肠道息肉,缺乏黑斑,而其他疾病,如:恶性黑色素瘤,Addison病,Kaposi肉瘤,口腔汞线,齿龈黑皮病等也可出现类似黑斑,造成诊断困难。

1.2 胃肠道息肉 PJS的息肉可以遍布整个胃肠道,以空肠上段为好发部位。文献[4]中有十二指肠息肉合并上皮细胞移位,侵及胆总管壶腹部,导致梗阻性黄疸,误诊为胰癌行胰十二指肠切除的报道。PJS鼻息肉发生率也较高^[5]。

胃肠道息肉可导致急性或慢性腹痛,肠套叠,肠扭转,肠梗阻,胃肠道出血等;其中肠套叠非常常见,肠套叠发生和STK11状态无关^[6]。

在鉴别诊断上需注意^[7],幼年性息肉病,PTEN错构瘤综合征等也具有错构瘤性息肉,这些疾病都有各自的临床特点,突变基因也不相同。临床医生需要根据息肉的组织学类型,详细的家族史以及患者的年龄和息肉的个数,作出正确诊断,并为选择基因检查的依据^[8]。

1.3 家族史 约有60% PJS有明确或可疑家族史^[9],部分患者可出现隔代遗传,真正散发性PJS非常罕见^[10]。我国由于实行计划生育政策多年,三口之家的小家庭较多,一级亲属人数减少,可能对家族史调查结果有一定影响。

1.4 辅助检查 一般影像学检查,如:胃肠造影,CT, B超等,对PJS息肉的诊断无特异性。由于PJS息肉分布于整个胃肠道,纤维胃镜处理十二指肠息肉以及结肠镜处理结肠息肉都比较方便,但两者都不能达到息肉的好发部位空肠上段。

胶囊内镜检查是一种无创检查方法,主要用于检查和随诊。双气囊电子小肠镜可以观察全部小肠,发现病变并予以治疗^[11-12]。胶囊内镜检查疑有病变或需要治疗时,双气囊电子小肠镜可作为进一步检查,两者可相互补充^[13-14]。目前,胶囊内镜和双气囊电子小肠镜检查在国内尚不能广泛开展。

2 息肉恶变和恶性肿瘤风险

既往认为PJS的息肉不会恶变,理由是这种错

构瘤性息肉,各种细胞发育正常,分化良好,一般不会恶变^[15]。目前认为^[16]随着患者年龄的增长,发生癌肿的风险增加。如Hearle *et al*^[17]总结了419例患者,其中96例患癌,患者在20, 30, 40, 50, 60和70岁发生的风险分别是2%, 5%, 17%, 31%, 60%和85%。癌肿常见部位依次为胃肠,胃食道,小肠,结直肠和胰腺,在30, 40, 50和60岁发生这些癌肿的风险分别为1%, 9%, 15%和33%,女性患者乳癌的风险增加,40, 60岁发生乳癌的风险分别为8%, 31%。女性患者还可发生生殖系统肿瘤^[18]。男性患者还可合并睾丸ser-toli细胞瘤^[19]。也有合并神经结神经胶质瘤的报道^[20]。

国内王振军 *et al*报道^[21]具有家族性的PJS患者中恶性肿瘤发生率为20.1%。其消化系肿瘤发生中可能存在一种新的肿瘤遗传途径,即错构瘤-腺瘤-结肠癌途径。甚至有作者认为PJS不是良性疾病^[22]。近3年我们收治的20余例中,有的患者初次就诊,即发现小肠癌合并腹腔和肝脏广泛转移,提醒我们应重视PJS的恶变问题。

3 治疗问题

首先对本病要有充分认识,积极治疗。治疗的主要是:处理胃肠道息肉发生的并发症;并发的恶性肿瘤;摘除小息肉;防止息肉增大或恶变。目前国内部分医院,纤维结肠镜,胃镜,尤其是近些年引进的双气囊电子小肠镜,是由消化内科医生掌握,胃肠外科应该和消化内科医生密切合作,达到较好的治疗效果。

3.1 双气囊电子小肠镜 双气囊电子小肠镜(double-balloon enteroscopy, DBE)于2001年由日本Yamamoto *et al*首次介绍^[23],2003年正式在临床上推广应用,可以观察全部小肠,既可诊断,也可治疗,并发症少,比较安全,还可结合胶囊内镜,CT/MRI等检查,用于小肠疾病的检查和治疗具有广泛前景^[24]。小息肉可以通过内镜摘除,5 cm以上较大息肉也可通过内镜摘除^[25]。而腹腔镜结合双气囊小肠镜治疗小肠多发息肉是最近的进展之一^[26]。

我院于2003年引进Fujinon EN450 P-5型DBE,目前完成检查治疗各种小肠疾病300余例次。对PJS较大息肉采用分次圈套电灼,摘除最大息肉直径达8 cm,一次摘除息肉最多44枚,取得了较好的效果^[27]。由于引进了小肠镜,我院收治的小肠疾病明显增加,近3年来,收治PJS患者20余例,出现一种少见疾病陡然增多的现象。

3.2 内镜配合手术治疗 对不能在内镜下处理的息肉或已经发生肠梗阻, 肠套叠, 肠出血, 癌变等并发症者应手术治疗. 手术治疗需要内镜配合. 分为术前、术中和术后检查三个阶段.

术前内镜检查目的是了解息肉的范围, 大小, 是否需要外科处理做出初步的评价. 对于较小的肠道息肉予以电灼, 较大的息肉予以分次圈套电灼. 如果不是广基息肉或息肉癌变或已经发生并发症, 经内镜摘除息肉, 有可能避免手术.

术中内镜检查可了解外科手术探查的“盲区”, 如十二指肠的水平部有无息肉, 能否造成肠道梗阻, 局部是否有癌变(通过肉眼观察和活检); 对确定肠管切开部位进行指导; 对小息肉进行镜下处理(但可能延长手术时间). 术中内镜检查采用传统的纤维结肠镜即可, 将预定检查肠管两端夹住, 做荷包缝合, 充气后检查, 操作时可由台上手术医生协作. 操作时注意无菌操作. 术后内镜检查一般在术后3-6 mo内进行, 对手术时未能处理的小息肉进一步处理, 了解有无新发病灶并及时处理.

3.3 手术要点 手术主要是针对小肠息肉导致的并发症, 如肠梗阻, 肠套叠, 肠出血, 癌变等. 对合并肠套叠的处理, 不能强拉硬拽, 防止肠管破裂, 逐步将套叠的肠管从套叠的鞘中挤出, 可以减少肠管的切除, 最大可能保留肠管的长度. 针对小肠息肉多发的特点, 要有计划的做切口, 尽可能减少肠道切口, 小肠切口需要及时修补, 不能遗漏, 以免造成肠痿. 由于小肠息肉大多有蒂, 距离切口10-15 cm的范围的息肉, 都可从一个切口拉出. 小肠切口要小, 较大的息肉完全从小切口中挤出. 对于病变密集的肠段, 可选择小肠部分切除. 已经发生恶变的肿瘤, 按照恶性肿瘤的原则进行处理.

4 随访

对PJS患者, 无论其有无家族史, 对患者本人和其家族成员, 都应该进行积极的随访, 以发现家族中新出现的患者, 达到早诊断, 早治疗, 及早发现和处理好胃肠道和其他部位的恶性肿瘤. 负责随访的医生应熟悉PJS, 制定一个完整的方案, 除一般常规检查外, 随访应包括胃镜和肠镜检查, 女性患者应包括乳腺检查, 宫颈涂片和腹部B超检查等.

5 结论

近年来PJS的基础研究, 临床诊断治疗都取得了

一些进展. 但就胃肠道息肉而言, 无论采取内镜治疗或手术治疗, 都是一种被动的治疗手段. 因此, 近几年来, 一些研究者不断积极探索预防PJS胃肠道息肉的发生和发展的方法. 环氧化酶2(COX-2)及其抑制剂是近几年研究的重点之一.

Rossi *et al*^[28]通过动物实验发现, LKB1失活的鼠可发生类似人PJS胃肠道息肉, 其COX-2表达增高. Wei *et al*^[29]研究了9个PJS家系11例患者的胃肠道息肉, 发现82%的PJS息肉和所有癌肿均有COX-2的过度表达. Wendy *et al*^[30]也有类似发现. 这些研究者认为, 如采用非甾体抗炎药或COX-2抑制剂, 有可能预防PJS错构瘤性息肉的发生.

但是, 目前尚未见到应用COX-2抑制剂治疗PJS的大宗报道, 这可能和PJS属于少见疾病, 不易进行大组随机对照研究有关. 解决这一问题可考虑进行多中心实验研究, 是否可以参考非甾体抗炎药阿斯匹林预防大肠腺瘤随机对照研究的经验和COX-2抑制剂塞来昔布抑制FAP和HNPCC胃肠息肉生长的经验等^[31-34].

预防PJS胃肠道息肉的发生另一动向是雷帕霉素(Rapamycin), 雷帕霉素又称瑞帕霉素(Sirolimus), 商品名为Rapamune, 是由Wyeth-Ayest公司研究并开发的新型大环内酯类抗真菌药, 并可作为免疫抑制剂, 目前正处于III期临床阶段. 最近Wei *et al*通过动物实验发现^[35], PJS的mTOR增强, 雷帕霉素(Rapamycin)具有特异性抑制哺乳动物Rapamycin靶信号作用(mTOR), 能有效抑制实验鼠PJS息肉, 可能具有PJS靶向治疗作用, 也许将为PJS的预防和治疗带来新的希望.

6 参考文献

- 1 de Leng WW, Jansen M, Carvalho R, Polak M, Musler AR, Milne AN, Keller JJ, Menko FH, de Rooij FW, Iacobuzio-Donahue CA, Giardiello FM, Weterman MA, Offerhaus GJ. Genetic defects underlying Peutz-Jeghers syndrome (PJS) and exclusion of the polarity-associated MARK/Par1 gene family as potential PJS candidates. *Clin Genet* 2007; 72: 568-573
- 2 Mehenni H, Resta N, Guanti G, Mota-Vieira L, Lerner A, Peyman M, Chong KA, Aissa L, Ince A, Cosme A, Costanza MC, Rossier C, Radhakrishna U, Burt RW, Picard D. Molecular and clinical characteristics in 46 families affected with Peutz-Jeghers syndrome. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1924-1933
- 3 全国遗传性大肠癌协作组. 中国人遗传性大肠癌筛查标准的实施方案. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 191-192
- 4 Rautou PE, Hammel P, Couvelard A, Rivet P, Aubert A, Lévy P, Ruszniewski P. [Suspected malignant cancer of the pancreas associated with pseudo-invasive duodenal hamartomas in a patient

■应用要点

本文着重从临床实用的角度上阐述了PJS的诊断和治疗问题和新动向, 使人们对PJS的临床诊治认识提高到一个新的水平, 同时也为将来临床使用药物治疗PJS提供了理论基础.

■名词解释

PJS: 又称黑斑息肉病, 是一种由 LKB1/STK11 突变而引起的常染色体显性遗传性疾病; 临床表现以皮肤黏膜色素斑, 胃肠道错构瘤和家族遗传性为三大特征。

- with Peutz-Jeghers syndrome] *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 547-551
- 5 de Leng WW, Westerman AM, Weterman MA, Jansen M, van Dekken H, Giardiello FM, de Rooij FW, Paul Wilson JH, Offerhaus GJ, Keller JJ. Nasal polyposis in Peutz-Jeghers syndrome: a distinct histopathological and molecular genetic entity. *J Clin Pathol* 2007; 60: 392-396
- 6 Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJ, Rooij FW, Wilson JH, Hansmann A, Möslin G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RK, Spigelman AD, Houlston RS. STK11 status and intussusception risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 2006; 43: e41
- 7 Zbuk KM, Eng C. Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 492-502
- 8 Lynch HT, Boland CR, Rodriguez-Bigas MA, Amos C, Lynch JF, Lynch PM. Who should be sent for genetic testing in hereditary colorectal cancer syndromes? *J Clin Oncol* 2007; 25: 3534-3542
- 9 杨斌, 赵博, 王振军. 黑斑息肉病的临床特点和治疗策略. *大肠肛门病外科杂志* 2004; 10: 271-273
- 10 Burkart AL, Sheridan T, Lewin M, Fenton H, Ali NJ, Montgomery E. Do sporadic Peutz-Jeghers polyps exist? Experience of a large teaching hospital. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1209-1214
- 11 May A, Nachbar L, Pohl J, Ell C. Endoscopic interventions in the small bowel using double balloon enteroscopy: feasibility and limitations. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 527-535
- 12 Terauchi S, Snowberger N, Demarco D. Double-balloon endoscopy and Peutz-Jeghers syndrome: a new look at an old disease. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2006; 19: 335-337
- 13 Li XB, Ge ZZ, Dai J, Gao YJ, Liu WZ, Hu YB, Xiao SD. The role of capsule endoscopy combined with double-balloon enteroscopy in diagnosis of small bowel diseases. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 30-35
- 14 Pasha SF, Leighton JA, Das A, Harrison ME, Decker GA, Fleischer DE, Sharma VK. Double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy have comparable diagnostic yield in small-bowel disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 671-676
- 15 Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 1997; 34: 1007-1011
- 16 Bartosova Z, Zavodna K, Krivulcik T, Usak J, Milkva I, Kruzliak T, Hromec J, Usakova V, Kopecka I, Veres P, Bartosova Z, Bujalkova M. STK11/LKB1 germline mutations in the first Peutz-Jeghers syndrome patients identified in Slovakia. *Neoplasma* 2007; 54: 101-107
- 17 Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Hansmann A, Möslin G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RK, Spigelman AD, Houlston RS. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3209-3215
- 18 Kilic-Okman T, Yardim T, Gücer F, Altaner S, Yuca MA. Breast cancer, ovarian gonadoblastoma and cervical cancer in a patient with Peutz-Jeghers Syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 278: 75-77
- 19 Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Intratubular large cell hyalinizing sertoli cell neoplasia of the testis: a report of 8 cases of a distinctive lesion of the Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 827-835
- 20 Resta N, Lauriola L, Puca A, Susca FC, Albanese A, Sabatino G, Di Giacomo MC, Gessi M, Guanti G. Ganglioglioma arising in a Peutz-Jeghers patient: a case report with molecular implications. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 106-111
- 21 王振军, 严仲瑜, 万远廉, 刘玉村, 吕有勇, 徐文怀, 黄廷庭. 黑斑息肉病LKB1基因胚系突变和肿瘤易感性研究. *中国胃肠外科杂志* 2000; 3: 82-84
- 22 Sarlós P, Király A, Nagy L. [Family study in Peutz-Jeghers syndrome] *Orv Hetil* 2007; 148: 255-258
- 23 Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, Higashizawa T, Miyata T, Iino S, Ido K, Sugano K. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 216-220
- 24 Heine GD, Al-Toma A, Mulder CJ, Jacobs MA. Milestone in gastrointestinal endoscopy: double-balloon enteroscopy of the small bowel. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006; 32-38
- 25 Plum N, May AD, Manner H, Ell C. [Peutz-Jeghers syndrome: endoscopic detection and treatment of small bowel polyps by double-balloon enteroscopy] *Z Gastroenterol* 2007; 45: 1049-1055
- 26 Ross AS, Dye C, Prachand VN. Laparoscopic-assisted double-balloon enteroscopy for small-bowel polyp surveillance and treatment in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 984-988
- 27 毛高平, 宁守斌, 白莉, 曹传平, 杨春敏, 唐杰, 陈英. 双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断与治疗中的应用研究. *中国消化内镜* 2007; 1: 28-31
- 28 Rossi DJ, Ylikorkala A, Korsisaari N, Salovaara R, Luukko K, Launonen V, Henkemeyer M, Ristimäki A, Aaltonen LA, Makela TP. Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12327-12332
- 29 Wei C, Amos CI, Rashid A, Sabripour M, Nations L, McGarrity TJ, Frazier ML. Correlation of staining for LKB1 and COX-2 in hamartomatous polyps and carcinomas from patients with Peutz-Jeghers syndrome. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1665-1672
- 30 De Leng WW, Westerman AM, Weterman MA, De Rooij FW, Dekken Hv H, De Goeij AF, Gruber SB, Wilson JH, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Keller JJ. Cyclooxygenase 2 expression and molecular alterations in Peutz-Jeghers hamartomas and carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3065-3072
- 31 Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 883-890
- 32 Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JJ, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized

- trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348: 891-899
- 33 Sheng JQ, Li SR, Yang XY, Zhang YH, Su H, Yu DL, Yan W, Geng HG. [Clinical management of adenomatous polyposis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2006; 86: 526-529
- 34 Kurland JE, Beck SE, Solomon CJ, Brann OS, Carethers JM, Huang SC. Cyclooxygenase-2 expression in polyps from a patient with juvenile polyposis syndrome with mutant BMPR1A. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 318-325
- 35 Wei C, Amos CI, Zhang N, Wang X, Rashid A, Walker CL, Behringer RR, Frazier ML. Suppression of Peutz-Jeghers polyposis by targeting mammalian target of rapamycin signaling. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1167-1171

■同行评价

本文紧密结合临床实践, 论述诊断和治疗问题比较全面, 对临床实践有很好的指导意义。

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, 所有作者均同意该代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)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 2008-07-28)

炎症性肠病与肿瘤坏死因子基因多态性的研究进展

周国胜, 吴正祥

■背景资料

TNF为多功能性细胞因子, 包括TNF- α 型与TNF- β 型, 其基因多态性主要有微卫星多态性及单核苷酸多态性, 与许多疾病的发病密切相关, 影响TNF转录, 并通过TNF进一步影响疾病的发展与转归。

周国胜, 吴正祥, 安徽医科大学附属医院消化内科 安徽省合肥市 230001

通讯作者: 吴正祥, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属医院消化内科. zxiangwu@126.com
电话: 0551-2283380

收稿日期: 2008-05-09 修回日期: 2008-06-03

接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-07-28

Advance in the relationship between inflammatory bowel disease and tumor necrosis factor polymorphisms

Guo-Sheng Zhou, Zheng-Xiang Wu

Guo-Sheng Zhou, Zheng-Xiang Wu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China
Correspondence to: Zheng-Xiang Wu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. zxiangwu@126.com
Received: 2008-05-09 Revised: 2008-06-03
Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-07-28

Abstract

The pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), including ulcerative and Crohn's disease, is still not entirely clarified till today, and it is probably associated with tumor necrosis factor (TNF), which is influenced by its polymorphisms. The allele frequency, genotype frequency and carrier frequency of TNF affect the susceptibility and clinical manifestation of IBD, presenting differences in ethnics and regions, and produce significant effect on the development and prognosis of disease.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Tumor necrosis factor; Gene polymorphism

Zhou GS, Wu ZX. Advance in the relationship between inflammatory bowel disease and tumor necrosis factor polymorphisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2390-2394

摘要

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎与克罗恩病, 病因至今未明, 可能与肿瘤坏死因子相关, 后者

受其基因多态性影响. 肿瘤坏死因子的等位基因频率, 基因型频率和基因携带率影响炎症性肠病的疾病易感性与临床表现, 存在种族与区域差异, 对疾病的发展和预后产生重要作用。

关键词: 炎症性肠病; 肿瘤坏死因子; 基因多态性

周国胜, 吴正祥. 炎症性肠病与肿瘤坏死因子基因多态性的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2390-2394
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2390.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)基因与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因紧密连锁, α 型基因定位于6号染色体的6p21.3-21.1, β 型基因定位于6号染色体的6p23-q12, α 型包含于人类主要组织相容性复合物中, 与 β 型紧密相连位于HLA-DR和HLA-A或HLA-DP的着丝点的染色体片段内. TNF主要由活化的炎性细胞产生, 在炎症应答中发挥重要作用, 如诱导IL-1 β 、IL-6和急性期反应蛋白的表达, 是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病的关键细胞因子, 调节肠道黏膜炎性免疫反应, IBD患者的体液、大便及结肠组织TNF浓度高于正常人, 可能是其基因多态性影响了TNF的转录。

1 TNF

依据细胞来源和分子结构的不同分为 α 型和 β 型(LT), 分别由激活的单核/巨噬细胞, T淋巴细胞产生, 两型在基因和蛋白分子结构以及生物学功能上都有许多相似之处, 约有28%的氨基酸序列同源性, 结合相同的受体, 与其膜受体结合以后, 活性被启动而发挥作用. TNF- α 为炎性因子, 触发中性粒细胞和单核细胞的趋化, 增加内皮细胞黏附分子的表达^[1], 促使其他细胞因子释放, 形成细胞因子网络, 扩大炎症连锁反应, 活化内皮细胞, 改变其细胞表面整合素的表达, 增加钙离子的浓度, 促进白细胞、血小板与内皮细胞黏附, 提高血管通透性, 减少血栓调节素的释放, 激活组织

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

因子促进血栓形成同时抑制纤溶酶原激活抑制剂-1的合成而导致机体处于促凝血状态, 形成微血栓造成肠组织微循环障碍^[2], 释放血小板活化因子, 生成白三烯和氧自由基, 诱导一氧化氮合酶产生大量一氧化氮引起细胞损伤, 破坏肠黏膜^[3], TNF- β 主要参与炎症反应, 免疫系统的发育和免疫调节等。

2 TNF基因多态性

TNF基因位于第6号染色体上, 存在于HLA-B I与HLA-DR II型之间的MHC类基因区内^[4], 分TNF- α 与TNF- β , 两者均存在G/A多态性, 由A替代G, 引起限制性内切酶Nco I识别位点的缺失, 使被A替代的核苷酸序列不能被Nco I识别并切断, TNF- α 基因在转录起始位点上游308(-308), G存在的基因称TNF1(TNF- α 1/1), A替代的基因为TNF2(TNF- α 2/2), TNF- β 基因在转录起始位点下游252(+252), G存在的基因称TNF β -1(TNF- β B1/B1), A替代的基因称TNF β -2(TNF- β B2/B2). TNF基因族有单个核苷酸多态(SNP)和微卫星多态等, SNP中TNF- α 基因多态: -308, -376, -380, -244与-238的G $\rightarrow$ A突变; +69与+70的G $\rightarrow$ C突变; -863的C $\rightarrow$ A突变; -1031与-856的T $\rightarrow$ C突变; -1030, -857与-850的C $\rightarrow$ T突变; -574, -375, -307, -243, -237的A $\rightarrow$ G突变; -862的A $\rightarrow$ C突变, TNF- β 基因多态包括5'非翻译区的一个多态性残基和3'非翻译区的一个EcoR I的限制性片段长度多态性。有5种微卫星多态: TNFa, TNFb, TNFc、TNFd和TNFe分别含有13、7、2、6和3种等位基因, 可产生3276种不同单倍体, TNFa为CA重复序列, 后4种为CT重复序列, 另有一种微卫星多态位于LT- β 基因的上游, 为TG/CA双核苷酸重复, 微卫星等位基因与人类MHC I和II位点间均存在强连锁不平衡, 且相互影响。

3 TNF基因多态性与IBD

IBD中TNF受其基因多态性影响, CD患者TNF2和LT- α -2的单倍体与TNF- α 高产生相关, UC患者TNF4单倍体与TNF- α 低表达相关^[5], 携带TNF- α -308A的CD患者TNF- α 血清浓度显著高于TNF- α -308G携带者^[6], TNF- α 多态性与CARD15结合引起不同的TNF- α 转录水平, 影响胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)诱导TNF- α 的产生^[7]。

3.1 TNF基因型频率和等位基因频率与IBD的相关性 采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性技术分析, UC患者TNF- α -308基因型频率为

15.5%, 显著高于正常人基因型频率(4.1%), 而在CD中却无显著差异性, TNF- β +252基因型频率与正常组相比提示无统计学意义, 二者等位基因频率在UC与CD中也可见类似结果^[8], 通过对6个TNF基因多态性的检测, 发现TNF- α -308A与UC密切相关, 等位基因频率在UC中为14.6%, 健康者为8.9%, P 值为0.02, 而TNF- α -857T无显著差异性^[9], 符合Cucchiara *et al*^[10]的研究, 认为TNF- α 2和TNF1/2是UC患者的额外基因标志物^[11]。有学者的研究与上述报道相左, 对CD患者TNF- α 5'端的-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A和-238G/A的分析, 其变种与CD无关^[12], 研究表明^[13]UC与CD的TNF1和TNF2分别与对照组比较, $P>0.05$, 应用卡方及精确概率法检验, TNF- α 的基因型频率和等位基因频率与正常组比较均无统计学意义^[14], 总体上TNF- α 基因多态性与IBD无相关性, 可能与其相邻的其他基因与IBD存在关联性。

3.2 基因多态性与疾病易感性 等位基因频率和基因型频率与疾病易感性相关, UC患者TNF- α -308的基因型频率和等位基因频率明显高于健康组, 可能与UC易感性有关, 宋瑛 *et al*^[8], 曹倩 *et al*^[9], Cucchiara *et al*^[10]的研究支持这一结论, 有学者报道与此相矛盾, 项利鹃 *et al*^[13], Zipperlen *et al*^[12], 袁岸龙 *et al*^[14]的研究不支持TNF- α -308与IBD发病有关。目前认为, TNF- α -308基因频率虽在UC中升高, 仍不应轻率地将其认为是疾病的易感基因, 而仅是UC易感性的遗传标志物, 可能与其他疾病或易感基因连锁, 可能通过或协同其他基因发挥作用或本身单独发挥作用。一般认为TNF- α -C857T位点等位基因与疾病易感性并无相关, 曹倩 *et al*^[9]等研究发现, 其携带率在UC中为17.3%, 健康组为12.2%, 两者间差异无统计学意义, 犹太人群也未发现UC或CD的TNF-857基因携带率和等位基因频率与健康组相比有明显的不同之处^[15], 表明TNF- α -C857T与UC和CD发病无显著关联, 而在日本有学者报道CD患者TNF-857等位基因频率增高。曾报道THFSF15基因变种与日本和高加索人群的IBD有易感性^[16], 分析TNFSF15高危险性和低危险性单倍体, 危险性单倍体与UC或CD无关, 保护性单倍体在非犹太人健康组中高于UC和CD患者, 认为TNFSF15是IBD的易感基因^[17]。

3.3 基因多态性与IBD临床表现 研究表明TNF基因多态性与IBD的临床表现并不密切, 临床显

■研发前沿

目前研究的热点主要集中于TNF基因多态性在恶性肿瘤、胃肠道疾病、肝脏相关病变、呼吸系统、自身免疫性疾病、肾脏疾病及感染等研究。

■相关报道

TNF mAb治疗炎症性肠病的疗效报道不一, 与基因多态性有关, 如Ozeki *et al*的报道TNF- α -857位点的变异影响英夫利昔单抗的治疗作用, 很可能与其结合的位点密切相关。

■创新盘点

本文从等位基因频率、基因型频率及基因携带率这一角度分析综述TNF基因多态性对炎症性肠病的疾病易感性和临床表现的影响以及存在种族与区域的差异性。

型没有受到TNF基因多态性的影响, TNF- α -308和TNF- β -252位点与IBD患者的年龄、性别、疾病持续时间、疾病活动性以及发病部位均无关^[8], 经分层、逻辑及多元统计分析, 卡方及双侧Fisher精确检验, 未见TNF- α 多态性分布在UC或CD中有显著的不同以及对类固醇激素依赖型IBD的影响, TNF- α -308AA/AG与伴关节炎的CD有关联, 但未达到显著性水平^[18], Yamamoto-Furusho *et al*^[11]证实TNF- α -238和-308多态性与IBD的病变程度、肠外表现以及手术治疗无关, 有别于既往女性IBD广泛病变TNF2等位基因频率增高的报道。Fidder *et al*^[15]的研究显示TNF-857基因型没有影响到胃肠道疾病分布与疾病活动程度(炎症、透壁性或狭窄性病变), 与年龄和肛周病变以及肠外表现均无显著差异, 而另有报道TNF- α -857基因型与CD的临床表现密切相关, 单变量分析突出显示TNF- α -857CC与CD的狭窄及透壁性病变显著相关(69%), 且与家族性CD发病有关, 其作用可能是单独的, 也可能与IL10-1082GG协同, 影响CD发病^[19]。未成年CD患者表现为体质量增长不足和身材矮小, TNF-238G/A影响线性生长, 多变量分析显示TNF-238G/A对身高滞后起保护作用, 对体质量滞后不起保护作用, TNF- α -857C/T与疾病严重性弱相关, 显示保护作用, 而TNF- α -308G/A与疾病严重程度强相关, 趋向于疾病严重性^[20]。

3.4 基因多态性与IBD临床表现亚型 虽然TNF- α 多态性可能与IBD的总体关系并不明显, 但与IBD临床表现亚型却有直接联系。TNF2等位基因频率及基因携带率在类固醇激素依赖型CD患者明显高于非依赖型(28.1% *vs* 10.3%, 43.8% *vs* 19.3%), 伴有瘘口的CD中TNF2高于伴有狭窄的CD, 结肠中的TNF2高于小肠^[21], 女性UC患者广泛性结肠炎TNF2单倍体等位基因频率明显比远端结肠炎者高(31% *vs* 12%, $P = 0.028$), 结合LT- α -2分析, 其关联性更强, 表明TNF2与LT- α -2有着强连锁不平衡关系^[5]。关节炎是CD患者最常见的肠外表现之一, 逻辑回归分析显示TNF-308A增加了CD患者关节炎发病的危险性, TNF-308A的携带者患关节炎的频率明显高于TNF-308G的携带者, 伴有关节炎的CD患者有高浓度的TNF- α 产生, 表明TNF-308A对关节炎易感性的影响可能是通过直接或间接增加TNF- α 来发挥作用的^[6]。英夫利昔单抗与TNF- α 有高度亲和性, 其作用的发挥可能受TNF- α 多态性影响, 难治性CD患者, 除了TNF2在无应答

的CD中轻微增高外, TNF- α -308的基因型频率和等位基因频率对英夫利昔单抗有无应答表现无显著不同^[22], TNF- α -857影响着TNF- α 的产生, 当TNF- α -857位点的核苷酸为T时, Oct-1与其结合, TNF- α 的浓度显著升高, 影响英夫利昔单抗作用的充分发挥, 当核苷酸为C时, Oct-1不识别此位点, TNF- α 的含量减少, 表明TNF- α -857的C $\rightarrow$ T的转变可能影响英夫利昔单抗的治疗作用^[23]。外周型抗中性粒细胞胞质抗体(periphery antineutrophil cytoplasmic antibodies, pANCA)和抗酿酒酵母抗体(antisaccharomyces cerevisiae antibodies, ASCA)在IBD中增高, 二者分布与CD患者的小肠及大肠的病变存在一定相关性, pANCA和ASCA与细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)基因多态性有关, 而ICAM-1的上调表达受TNF- α 的影响, 在使用Alicaforsen治疗的CD患者中发现有三个独特的TNF- α SNP位点(290, -2735, -3090)与克隆恩病活动指数(crohn's disease activity index, CDAI)的减少显著相关, 支持在ASCA+/pANCA_患者依赖ICAM-1/TNF α 的克隆病亚型, 可能预示肯定的治疗作用^[24]。抗嗜中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)阳性的IBD患者TNF- α -308A等位基因频率显著高于ANCA阴性的IBD患者^[25], Castro-Santos *et al*^[26]进一步研究证实, TNF- α -308A*等位基因和TNF- α -308AA/AGTNF- α 基因型与ANCA阳性表达明显相联($P = 0.004$, $P = 0.007$), 认为UC患者IL-10低表达与TNF- α 高表达影响ANCA的产生。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)增高是IBD活动期的标志, CRP表达的调节主要在转录及转录后水平, IL-6能诱导CRP基因的转录调节, TNF- α 能加强IL-6的表达, 引起CRP产生增多, 含有TNFA2等位基因的个体中血清高敏度的CRP(hs-CRP)浓度有增高的趋势, 方差分析显示hs-CRP与TNFA2等位基因有显著的相关性($P = 0.01$), 特别在年龄组中, TNFA2与四分位数的hs-CRP浓度相关($P < 0.05$, $OR = 5.1$), 表明TNF- α 的功能性遗传变异与hs-CRP浓度有着相关性^[27], 符合Jeanmonod *et al*^[28]的研究, A等位基因携带者与CRP呈剂量-反应关系, 纯合子的G等位基因携带者却无此联系, 携带TNF-308A基因的IBD患者, 活动期的CRP浓度显著高于非活动期的浓度, 纯合子的TNF-308GG患者中却无此表现, 表明TNF2显著影响疾病过程^[29]。

3.5 种族与地区差异性 不同地区和种族TNF基

因多态性存在差异, 陕西地区IBD患者TNF- α -308的基因型频率及等位基因频率有显著差异性^[8], 而对浙江地区的IBD患者研究与上述结果不符^[13], Yamamoto-Furusho *et al*^[11]对墨西哥UC患者的研究, 认为TNF- α 2和TNF1/2是UC患者的额外基因标志物, 对爱尔兰人TNF- α -308A位点多态性研究发现, UC中A等位基因频率为28%, 低于健康组(40%, $P = 0.02$)^[30], 印度人群, 与健康组(4.3%)相比, CD患者TNF- α -308的AA基因型频率(9.1%)有逐渐增高的趋势, 而UC(4.3%)中无此现象^[31], 荷兰高加索人TNF- α -308等位基因多态性与CD临床表现关系并不密切, 与IBD炎症和非炎症部位的基质金属蛋白酶(MMPs)或基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的浓度高低无相关性^[32], Zipperlen *et al*^[12]认为加拿大纽芬兰地区的CD患者TNF- α 的变种与CD无联系, 说明TNF基因多态性在IBD中不同表现很可能受地理环境等因素的影响. 种族间的分布也存在差别, 日本的大样本研究提示, 日本UC发生与TNF-308A密切相关, 与欧洲的研究结果不符, 提示TNF基因多态性与UC的相关性可能有种族差异. TNF的基因多态性对不同种族与地区人群的IBD发病易感性的影响不同, 显示了基因多态性作为疾病易感性遗传标志的复杂性.

4 结论

IBD是肠道慢性炎症性疾病, 与TNF及其遗传基因密切相关, TNF影响着IBD的发病, TNF基因多态性影响着IBD的易感性和临床表现, 表现为种族与地区差异. 研究TNF基因多态性对认识疾病易感性, 评价疾病严重程度及预后, 阐明发病机制并进行治疗和干预都具有重要意义, 为生命医学领域发展的方向之一. 大样本, TNF多位点的基因多态性与IBD关系的研究有待今后逐步深入开展.

5 参考文献

- 1 Watanabe C, Miura S, Hokari R, Teramoto K, Ogino T, Komoto S, Hara Y, Koseki S, Tsuzuki Y, Nagata H, Granger DN, Ishii H. Spatial heterogeneity of TNF- α -induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MAdCAM-1 and VCAM-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1379-G1387
- 2 张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵. 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2375-2378
- 3 余万桂, 张恒文, 胡承明, 张道明, 梅林. DNCB所致结肠炎小鼠血清中细胞因子的活性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2762-2765
- 4 Baena A, Leung JY, Sullivan AD, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J, Fraser PA, Uko GP, Delgado JC, Clavijo OP, Thim S, Meshnick SR, Nyirenda T, Yunis EJ, Goldfeld AE. TNF- α promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes Immun* 2002; 3: 482-487
- 5 Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF α , LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185-190
- 6 González S, Rodrigo L, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Fuentes D, Niño P, Cadahía V, Saro C, Dieguez MA, López-Larrea C. TNF- α -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- α production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101-1106
- 7 Linderson Y, Bresso F, Buentke E, Pettersson S, D'Amato M. Functional interaction of CARD15/NOD2 and Crohn's disease-associated TNF α polymorphisms. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 305-311
- 8 宋瑛, 吴开春, 张沂, 郝志明, 李红涛, 张玲霞, 乔泰东, 李彩宁, 樊代明. 肿瘤坏死因子基因多态性与炎症性肠病的相关性分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 202-206
- 9 曹倩, 高敏, 周刚, 朱琴, 吴敏良, 胡伟玲, 似健敏. 肿瘤坏死因子基因多态性与溃疡性结肠炎相关性研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 460-463
- 10 Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, Guagnozzi D, Bascietto C, Miele E, Valvano MR, Bossa F, Annese V. Polymorphisms of tumor necrosis factor- α but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 171-179
- 11 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez JM, Zuñiga J, Granados J. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor α (TNF- α) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2004; 95: 31-35
- 12 Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P. Association of TNF- α polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol* 2005; 66: 56-59
- 13 项利鹏, 陈春晓. 肿瘤坏死因子 α 基因多态性与炎症性肠病的关系. *浙江医学* 2006; 28: 261-263
- 14 袁岸龙, 夏冰, 侯炜, 余玉红, 毛琳. 肿瘤坏死因子- α 基因多态性与炎症性肠病的相关性研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 243-244
- 15 Fidler HH, Heijmans R, Chowers Y, Bar-Meir S, Avidan B, Pena AS, Crusius JB. TNF-857 polymorphism in Israeli Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet* 2006; 33: 81-85
- 16 Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D, Cardon L, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Lathrop M, Nakamura Y. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3499-3506
- 17 Picornell Y, Mei L, Taylor K, Yang H, Targan SR, Rotter JI. TNFSF15 is an ethnic-specific IBD gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1333-1338
- 18 Castro-Santos P, Suarez A, López-Rivas L,

■应用要点

研究TNF基因多态性对认识疾病易感性, 评价疾病严重程度及预后, 阐明发病机制并进行治疗和干预都具有重要意义, 为生命医学领域发展的方向之一.

■同行评价

本研究内容较全面, 论述条理, 具有一定学术价值.

- Mozo L, Gutierrez C. TNFalpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1039-1047
- 19 Fowler EV, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, Templeton D, Radford-Smith GL. TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *J Med Genet* 2005; 42: 523-528
- 20 Levine A, Shamir R, Wine E, Weiss B, Karban A, Shaoul RR, Reif SS, Yakir B, Friedlander M, Kaniel Y, Leshinsky-Silver E. TNF promoter polymorphisms and modulation of growth retardation and disease severity in pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1598-1604
- 21 Louis E, Peeters M, Franchimont D, Seidel L, Fontaine F, Demolin G, Croes F, Dupont P, Davin L, Omri S, Rutgeerts P, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 64-68
- 22 Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Reynaert H, D'Haens G, Malaise M, Belaiche J. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 818-824
- 23 Ozeki T, Furuya Y, Nagano C, Matsui C, Takayanagi R, Yokoyama H, Yamada Y. Analysis of linkage between lymphotoxin alpha haplotype and polymorphisms in 5'-flanking region of tumor necrosis factor alpha gene associated with efficacy of infliximab for Crohn's disease patients. *Mutat Res* 2006; 602: 170-174
- 24 Yacyshyn BR, Schievella A, Sewell KL, Tami JA. Gene polymorphisms and serological markers of patients with active Crohn's disease in a clinical trial of antisense to ICAM-1. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 141-147
- 25 Kim TH, Kim BG, Shin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, Jung HC, Song IS. [Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease] *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 377-386
- 26 Castro-Santos P, Suarez A, Mozo L, Gutierrez C. Association of IL-10 and TNFalpha genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007; 122: 108-114
- 27 Araújo F, Pereira AC, Mota GF, Latorre Mdo R, Krieger JE, Mansur AJ. The influence of tumor necrosis factor -308 and C-reactive protein G1059C gene variants on serum concentration of C-reactive protein: evidence for an age-dependent association. *Clin Chim Acta* 2004; 349: 129-134
- 28 Jeanmonod P, von Känel R, Maly FE, Fischer JE. Elevated Plasma C-reactive protein in chronically distressed subjects who carry the A allele of the TNF-alpha -308 G/A polymorphism. *Psychosom Med* 2004; 66: 501-506
- 29 Vatay A, Bene L, Kovács A, Prohászka Z, Szalai C, Romics L, Fekete B, Karádi I, Füst G. Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 2003; 55: 247-252
- 30 Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, Smith OP. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 181-187
- 31 Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 920-924
- 32 Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2960-2966

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 《世界华人消化杂志》不设置共同第一作者和共同通信作者. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)

人BRAF野生型及V600E突变型真核表达载体的构建及表达

程张军, 石欣, 汤永辉, 高乃荣

程张军, 石欣, 汤永辉, 高乃荣, 东南大学附属中大医院普外科 江苏省南京市 210009

国家自然科学基金面上项目, No. 30500491

作者贡献分布: 此课题由石欣与程张军设计; 研究过程由程张军与汤永辉操作完成; 全程由石欣与高乃荣指导; 本论文写作由程张军, 石欣及汤永辉完成。

通讯作者: 石欣, 210009, 江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, 东南大学附属中大医院普外一科. shixinied@hotmail.com
电话: 025-83272195

收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-15

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-28

Construction and expression of eukaryotic expression vector for human wild-type and V600E mutant BRAF gene

Zhang-Jun Cheng, Xin Shi, Yong-Hui Tang, Nai-Rong Gao

Zhang-Jun Cheng, Xin Shi, Yong-Hui Tang, Nai-Rong Gao, Department of General Surgery, Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500491

Correspondence to: Xin Shi, Department of General Surgery, Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. shixinied@hotmail.com

Received: 2008-04-07 Revised: 2008-05-15

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To construct eukaryotic expression vectors for human wild-type and V600E mutant BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) gene respectively, and to provide suitable cell models for evaluating the potential role of BRAF V600E in pancreatic carcinoma.

METHODS: Human full-length BRAF and BRAF V600E cDNA were subcloned to pCMV-Myc to construct recombinant eukaryotic expression vectors pCMV-Myc-BRAF^W and pCMV-Myc-BRAF^{V600E}. The recombinant plasmids were transfected into Panc-1 cells by lipofectamin method and the positive cell clones were screened with G418. The expression of human wild-type and V600E mutant BRAF gene in Panc-1 cells was tested by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot.

RESULTS: Enzyme digestion and sequencing analysis showed that the target gene was cloned into recombinant vectors successfully, and the expression of human wild-type and V600E BRAF gene was identified in the transfected Panc-1 cells by RT-PCR and Western blot.

CONCLUSION: The eukaryotic expression vectors containing human wild-type and V600E mutant BRAF gene are successfully constructed. The positive Panc-1 cell clones expressing human wild-type and V600E-mutant BRAF gene stably are obtained.

Key Words: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; Pancreatic carcinoma; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Western blot; Gene cloning; Eukaryotic expression

Cheng ZJ, Shi X, Tang YH, Gao NR. Construction and expression of eukaryotic expression vector for human wild-type and V600E mutant BRAF gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2395-2398

摘要

目的: 构建BRAF野生型和V600E突变型真核表达载体; 转染并筛选稳定表达BRAF的胰腺癌细胞株, 为探讨BRAF V600E突变在胰腺癌发生发展中的作用提供合适的细胞模型。

方法: 将BRAF野生型及V600E突变型cDNA克隆于真核表达载体pCMV-Myc中, 构建pCMV-Myc-BRAF^W及pCMV-Myc-BRAF^{V600E}重组质粒, 酶切鉴定、测序证实序列正确后, 利用脂质体将重组质粒转染胰腺癌细胞Panc-1, 经G418培养筛选获得抗性细胞克隆, 用RT-PCR和Western blot鉴定野生型和V600E突变型BRAF基因在Panc-1细胞中的表达。

结果: 酶切鉴定和序列分析证实, 重组克隆pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}序列正确, RT-PCR和Western blot结果显示G418筛选获得的转基因Panc-1细胞稳定表达BRAF和BRAF V600E。

结论: 成功构建了pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}真核表达载体, 建立了

■背景资料

胰腺癌的早期表现不典型, 目前用于诊断的CT、MRI等影像学技术以及CA19-9、CEA等肿瘤标志物血清学检查, 其准确性和灵敏性尚难满足临床要求, 难以做到早期诊断。因此, 寻找早期诊断方法已成为当前胰腺癌研究的重点和热点。研究表明, BRAF突变状态与多种肿瘤的发生、发展及临床结局有关, 可能是一种新的恶性肿瘤相关基因、一个新的基因治疗靶点。对BRAF突变与胰腺癌发生和发展的关系进行深入研究, 可望为发现一条新的胰腺癌诊断和治疗途径提供理论基础。

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科; 谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

■研发前沿

目前国内外对胰腺癌中BRAF基因突变情况研究较少, BRAF突变对胰腺癌发生、发展的作用尚未见报道。

稳定表达BRAF和BRAF V600E的胰腺癌细胞株。

关键词: BRAF; 胰腺癌; 逆转录聚合酶链式反应; Western blot; 克隆; 真核表达

程张军, 石欣, 汤永辉, 高乃荣. 人BRAF野生型及V600E突变型真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2395-2398

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2395.asp>

0 引言

在多种恶性肿瘤中, 存在BRAF(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)突变, 其中约80%位于第1799核苷酸上, T突变为A(T1799A), 导致其编码的谷氨酸由缬氨酸取代(V600E), V600E突变能使BRAF激酶活性及NIH3T3细胞转化能力提高^[1]. 但是BRAF基因突变在胰腺癌的发生和发展中的作用尚不清楚. 本研究拟构建野生型和V600E突变型人BRAF基因真核表达载体; 转染并筛选稳定表达BRAF V600E的胰腺癌细胞株, 为探讨BRAF V600E突变在胰腺癌发生和发展中的作用提供合适的细胞模型。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒、菌株、细胞株和抗体 克隆质粒pUC m-T/BRAF-1(含BRAF基因1-508 bp片段)、pUCm-T/BRAF-2(含BRAF基因508-2301 bp片段)、pUCm-T/BRAF-3(含V600E突变型BRAF基因508-2301bp片段)由本课题组先期合成; 真核表达载体pCMV-Myc(美国Clonetech公司); 感受态大肠杆菌DH5 α (TaKaRa公司); 胰腺癌细胞株Panc-1(美国ATCC公司); 鼠抗人c-Myc mAb、HRP标记羊抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz公司). Pfu DNA Polymerase(华美生物工程公司); 限制性内切酶、T4 DNA Ligase(SibEnzyme公司); DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒(Qiagen公司); 质粒小量抽提试剂盒(Omega公司); DMEM培养液(美国Gibco公司); G418、Lipofectamin2000转染试剂盒、TRIzol、逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司); 蛋白质抽提试剂盒、蛋白定量试剂盒(上海康成生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 BRAF野生型及V600E突变型真核表达载体的构建: pCMV-Myc载体用EcoR I 和Sal I 双酶切, 胶回收试剂盒回收3800 kb的载体DNA片段; EcoR I /Kpn I 双酶切pUCm-T/BRAF-1质

粒, 胶回收试剂盒回收508 bp DNA片段; Kpn I /Sal I 双酶切pUCm-T/BRAF-2质粒, 胶回收试剂盒回收1800 bp DNA片段; T4 DNA Ligase将3个片段14℃连接过夜, 连接产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 筛选阳性克隆, 抽质粒, 酶切鉴定、测序, 正确克隆定义为pCMV-Myc-BRAF^W. 同样方法构建V600E突变型真核表达载体(所不同的是将pUCm-T/BRAF-2质粒换为pUCm-T/BRAF-3质粒), 正确克隆定义为pCMV-Myc-BRAF^{V600E}.

1.2.2 G418浓度梯度试验: 胰酶消化Panc-1细胞成细胞悬液, 稀释至10⁸ cell/L, 24孔板中取20个孔, 每孔加入100 μ L的细胞悬液及无双抗的培养基900 μ L. 将每孔中的G418浓度稀释至0、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 mg/L等10个级别. 每3-5 d换液, 培养10 d, 记录细胞全部死亡的最低浓度. 以细胞全部死亡的最低浓度加一个级别为筛选浓度。

1.2.3 转染Panc-1细胞: 接种Panc-1细胞2 $\times$ 10⁴/孔于96孔板, pCMV-Myc-BRAF^W、pCMV-Myc-BRAF^{V600E}、pCMV-Myc每种质粒准备转染2个孔, 同时设立对照细胞2孔. 接种后24h观察细胞浓度达70%-90%, 按Lipofectamin2000操作手册进行转染实验, 转染后6 h换新鲜培养液, 转染24 h后将转染了质粒的细胞和对照细胞移到24孔板中, 培养过夜. 转染48 h后换含有G418的选择培养液, 继续培养细胞, 2-3 d更换选择培养液, 直至对照细胞全部死亡, 以维持量的G418(浓度减半)继续培养2 wk筛选得到阳性细胞克隆。

1.2.4 阳性细胞克隆的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测: 收集分别转染pCMV-Myc、pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}后筛选获得的Panc-1细胞各约5 $\times$ 10⁶, TRIzol法抽提总RNA, 按试剂盒说明进行逆转录和PCR反应: BRAF上游引物: 5'-ACG GGA CTC GAG TGA TGA TTG G-3', 下游引物: 5'-TGA AGG CTT GTA ACT GCT GAG GTG-3', 预计扩增产物167 bp; 内参 β -actin上游引物: 5'-CTG GAC GAA TGG AGA AAA-3', 下游引物: 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3', 预计扩增产物564 bp. PCR反应体系50 μ L, 反应条件: 94℃预变性2 min; 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 30个循环; 72℃延伸5 min. PCR产物进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 阳性细胞克隆的Western blot分析: 收集分别转染pCMV-Myc、pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}后筛选获得的Panc-1细胞

■相关报道

K-ras及其下游的RAF-MEK-ERK-MAPK信号通路被认为与胰腺癌的发生显著相关. 最近的两项研究发现, 在胰腺癌临床标本和胰腺癌细胞株COLO357中均能检测到BRAF V600E突变, 且在同一肿瘤组织中, BRAF和K-ras突变具有互相排斥的性质, 这提示两者对与细胞生长有关的胞间信号转导系统的激活可能相互独立, 是启动肿瘤细胞增殖的两个独立因素。

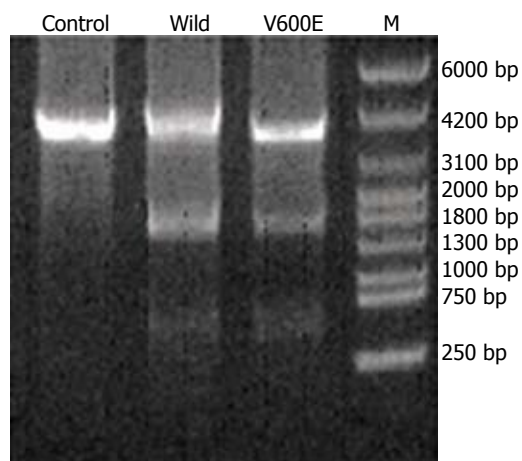


图1 pCMV-Myc重组载体双酶切电泳结果. M: DNA marker; Control: control plasmid; Wild: pCMV-Myc-BRAF^W; V600E: pCMV-Myc-BRAF^{V600E}.

各约 5×10^6 , 按试剂盒说明进行蛋白质抽提和定量. 20 μ g蛋白作100 g/L SDS-PAGE电泳, 转至Immunoblot-P转移膜, 用5%脱脂奶粉封闭, 分别与1:1000鼠抗c-Myc一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗孵育, 对反应好的膜进行化学发光, X光片曝光、显影、定影.

2 结果

2.1 重组载体酶切鉴定 野生型和突变型重组载体在600、1700和3800 bp左右处均出现相应的条带(图1), 表明目的基因已成功连入pCMV-Myc表达载体.

2.2 重组载体测序验证 通过对重组载体的DNA测序证实, 所插入的BRAF基因碱基序列与GenBank(登录号: NM004333)中公布的序列完全一致, 而V600E突变型也含有需要的T→A突变(图2).

2.3 细胞克隆 以500 mg/L的G418浓度培养, Panc-1细胞在10 d时间细胞全部死亡, 600 mg/L应为Panc-1细胞合适的筛选浓度. 转染细胞经筛选, 2 wk后得到抗G418的阳性细胞克隆, 未转染的细胞则在G418培养液中逐渐死亡, 初步表明BRAF基因转染成功.

2.4 RT-PCR产物电泳鉴定 转染了野生型和突变型BRAF的Panc-1细胞在170 bp处均出现了目的条带, 而转染空载体的则未出现(图3).

2.5 Western blot分析 转染了野生型和突变型BRAF的Panc-1均检出了目的蛋白的表达, 而转染空白对照载体的Panc-1细胞则未检出(图4).

3 讨论

BRAF基因编码一种丝/苏氨酸特异性激酶

(serine/threonine-specific kinase), 是RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK通路重要的转导因子, 参与调控细胞内多种生物学事件, 如细胞生长、分化和凋亡等^[2]. 在绝大多数组织和细胞类型中, BRAF是MEK/ERK最为关键的激活因子^[3-5]. BRAF V600E突变能模拟T598和S601两个位点的磷酸化作用, 使BRAF蛋白激活. Smalley *et al*报道, BRAF激活后, 相应激活MEK和ERK, ERK活性增加可促进细胞增殖和侵袭、改变整合素的表达、降低E-钙黏素表达以及增加基质金属蛋白酶(MMP)分泌^[6]. Houben *et al*^[7]的研究还发现, BRAF的突变状态与恶性黑色素瘤的预后有关, 存在BRAF突变者预后不良. 还有报道证实, BRAF突变与甲状腺乳头状癌淋巴结转移显著相关^[8]. 由此可见, BRAFV600E突变对于肿瘤的发生、发展有关键性作用, 进一步研究BRAF突变的生物学意义有助于丰富对胰腺癌的分子机制的认识和发现新的胰腺癌临床干预措施.

pCMV-Myc是一种哺乳动物细胞表达载体, 属于氨苄青霉素抗性选择系统, 带有氨苄青霉素抗性基因Amp^r, 在SV40启动子驱动下可在真核细胞中表达, 其编码产物能使氨苄青霉素类似物G418失活, 故用G418筛选可获得导入有表达载体的阳性细胞克隆; 在pCMV-Myc质粒的多克隆位点上游有一个PCMV启动子, 插入到多克隆位点的外源性基因在该启动子的驱动下可以得到有效表达; 另外该质粒还含有一个N端C-Myc尾, 非常方便用于免疫反应的检测以及作为诱饵蛋白检测酵母双杂交结果. 因此, 该载体非常方便用于筛选和鉴定.

本实验中, 我们将目的基因亚克隆到pCMV-Myc表达载体, 对重组质粒进行双酶切电泳鉴定, 结果显示BRAF野生型和V600E突变型重组载体在600, 1700和3800 bp左右处均出现相应的目的条带, 而空白对照载体则仅在3800bp左右处出现相应的条带, 表明目的基因已成功导入pCMV-Myc表达载体, 进一步测序证实, 本实验中克隆的人野生型BRAF cDNA序列是完全正确的, V600E突变型cDNA序列也含有必要的T→A突变. 证明本研究已正确构建了pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}真核表达载体.

我们在实验中通过RT-PCR反应鉴定外源性BRAF基因在转基因Panc-1细胞中的表达, 结果证实, 具有G418抗性的转染重组载体pCMV-Myc-BRAF^W和pCMV-Myc-BRAF^{V600E}

■创新盘点

本研究通过构建BRAF野生型和V600E突变型真核表达载体; 转染并筛选稳定表达BRAF的胰腺癌细胞株, 为探讨BRAF V600E突变在胰腺癌发生和发展中的作用提供合适的细胞模型.

■应用要点

本研究介绍了BRAF V600E突变体真核表达载体的构建和表达方法, 为进一步研究BRAF V600E突变的功能和在胰腺癌发生、发展中的作用奠定了良好的基础.

同行评价

本文选题较新颖, 总体思路清晰, 表达准确, 有一定的实用价值。

A 48T_BRAF6-9CMV-F.abi(l>587) → AATTCGGATGGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGGAGCCGGGCCAGGCTCTGTCAACGG
human Brf.seq(l>2301) → atggcggcgctgagcggtggcggtggcgcgcgagccgggagcggctgttcaacgg
B human Brf.seq(l>2301) → aacacccatccaggcaggggatatggtgcgtttcctgtccactga
64T_BRAF6-9_CMV-R.abi(l>532) ← AACACCCATCCAGGCAGGGGATATGGTGC GTTTCCTGTCCACTGATCTAGAGTCGACCCGAGATC
C human Brf.seq(l>2301) → tgattttggtctagctacagtgaatctcgtatggagtggtggccatcagtttgaacagttgtctg
27T_BRAF6-9_SEQ4.abi(l>480) ← TGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTG

图2 重组载体的DNA测序证实, 所插入的BRAF基因碱基序列正确。A: 含克隆位点EcoR I和BRAF基因的起始密码ATG及N端相邻序列; B: 含BRAF基因C端相邻序列, 终止TGA位点和克隆位点Sal I; C: 含有需要的V600E的T→A突变。

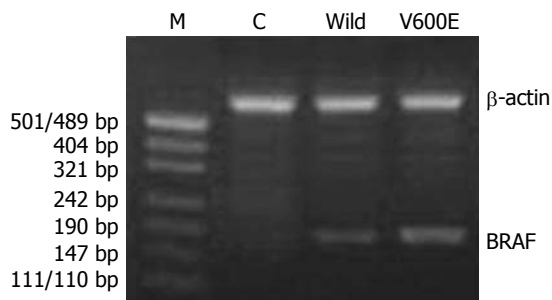


图3 转染Panc-1细胞的RT-PCR检测。M: DNA marker; C: control plasmid; Wild: pCMV-Myc-BRAF^W; V600E: pCMV-Myc-BRAF^{V600E}。

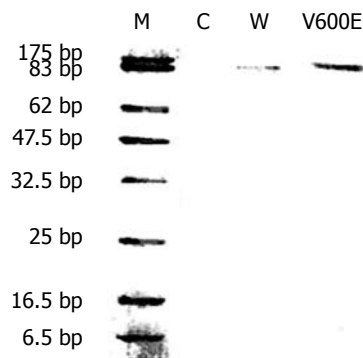


图4 转染Panc-1细胞裂解物的Western blot检测。M: DNA marker; C: control plasmid; W: pCMV-Myc-BRAF^W; V600E: pCMV-Myc-BRAF^{V600E}。

的Panc-1细胞克隆中有人BRAF基因的mRNA水平的表达。同时, 我们又对这些转基因细胞进行了Western blot检测, 结果显示转染了野生型和突变型BRAF基因的Panc-1均检出了目的蛋白c-Myc的表达, 说明这些细胞中能表达人BRAF蛋白。

本实验成功建立了稳定表达人野生型和V600E突变型BRAF基因的Panc-1细胞株, 这为我们进一步研究BRAF V600E突变的功能和在

胰腺癌发生、发展中的作用奠定了良好的基础。

参考文献

- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954
- Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Tanaka Y, Imamura J, Imamura T, Ohta M, Ijichi H, Tateishi K, Kawakami T, Aragaki J, Matsumura M, Kawabe T, Omata M. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 8132-8137
- Wojnowski L, Stancato LF, Larner AC, Rapp UR, Zimmer A. Overlapping and specific functions of Raf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000; 91: 97-104
- Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R, Pritchard C. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 2001; 20: 1940-1951
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Rütth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* 2001; 20: 1952-1962
- Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003; 104: 527-532
- Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Bröcker EB, Goetz R, Rapp UR. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 2004; 3: 6
- Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004; 45: 818-821

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

食管鳞状细胞癌中PTTG和bFGF的表达与临床病理因素的关系

林称意, 郭家龙, 左顺庆, 张军, 谢斌生

林称意, 郭家龙, 左顺庆, 张军, 谢斌生, 鄱阳医学院附属太和医院胸心外科 湖北省十堰市 442000
湖北省科技攻关资助项目, No. 2004AA301C97
作者贡献分布: 林称意与郭家龙对此文所作贡献均等; 此课题由林称意, 郭家龙及左顺庆设计; 免疫组化操作由林称意与郭家龙操作完成; 临床资料收集与处理由张军与谢斌生完成, 数据分析由林称意, 郭家龙及左顺庆完成; 本论文写作由林称意与郭家龙完成。
通讯作者: 郭家龙, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院胸心外科, gjl9988@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-04-16 修回日期: 2008-06-14
接收日期: 2008-06-19 在线出版日期: 2008-07-28

Correlation of pituitary tumor transforming gene and basic fibroblast growth factor expression with clinicopathologic factors in esophageal squamous cell carcinoma

Cheng-Yi Lin, Jia-Long Guo, Shun-Qing Zuo, Jun Zhang, Bin-Sheng Xie

Cheng-Yi Lin, Jia-Long Guo, Shun-Qing Zuo, Jun Zhang, Bin-Sheng Xie, Department of Cardiothoracic Surgery, Taihe Hospital Affiliated to Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Supported by: the Hubei Province Science and Technique Foundation, No. 2004AA301C97
Correspondence to: Jia-Long Guo, Department of Cardiothoracic Surgery, Taihe Hospital Affiliated to YunYang Medical College, ShiYan 442000, Hubei Province, China. gjl9988@yahoo.com.cn
Received: 2008-04-16 Revised: 2008-06-14
Accepted: 2008-06-19 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and their correlations with the clinical pathological features in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Immunohistochemical S-P method was used to detect the expression of PTTG and bFGF proteins in 48 ESCC tissues and the corresponding para-cancerous normal tissues.

RESULTS: The positive rates of PTTG and bFGF expression were significantly higher in ESCC tissues than that in the para-cancerous tissues (68.8% vs 9.1%; 70.8% vs 14.3%; $P = 0.023$, 0.018). The expression levels of PTTG and bFGF were correlated with lymph node metastasis and TNM staging, but not with the age and sex of patients, tumor size and histological grades. Meanwhile, there was a positive correlation between PTTG and bFGF expression ($r = 0.627$, $P = 0.012$).

CONCLUSION: PTTG and bFGF expression have close relations with the clinical pathophysiological characteristics in ESCC. Detection of PTTG and bFGF may be valuable for diagnosing ESCC and evaluating its malignant extent and prognosis.

Key Words: Esophageal neoplasm; Immunohistochemistry; Pituitary tumor transforming gene; Basic fibroblast growth factor

Lin CY, Guo JL, Zuo SQ, Zhang J, Xie BS. Correlation of pituitary tumor transforming gene and basic fibroblast growth factor expression with clinicopathologic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2399-2403

摘要

目的: 探讨食管鳞状细胞癌组织中垂体肿瘤转化基因(PTTG)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达和相关性。

方法: 采用免疫组化S-P法检测PTTG和bFGF在48例食管鳞状细胞癌组织和癌旁正常食管组织中的表达情况。

结果: 48例食管癌组织中PTTG和bFGF的阳性表达率显著高于癌旁正常食管组织中的表达(68.8% vs 9.1%, 70.8% vs 14.3%, $P = 0.023$, 0.018), PTTG和bFGF的表达均与淋巴结转移、TNM分期显著相关, 与患者年龄、性别、瘤体大小和肿瘤组织分化程度无相关性; PTTG和bFGF的表达呈正相关($r = 0.627$, $P = 0.012$)。

■背景资料

食管癌为我国最常见的恶性肿瘤之一, 在某些地区位于发病率和死亡率的首位。垂体肿瘤转化基因(PTTG)是新近发现的一种癌基因, 可通过多条途径参与肿瘤的病理过程, 与多种肿瘤的发生、迁移与转移均有关系, 是一种强有力的肿瘤转化基因。

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室; 阎晓初, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院病理研究所

■研究前沿

有关PTTG与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在食管癌组织中的表达,及其与食管癌生物学特征的相关性至今报道较少。

结论: PTTG和bFGF的表达与食管癌的临床病理学特征密切相关,二者的检测将有助于食管癌的诊断、评估食管癌患者的恶性程度和预后。

关键词: 食管癌;免疫组织化学;垂体肿瘤转化基因;碱性成纤维细胞生长因子

林称意,郭家龙,左顺庆,张军,谢斌生.食管鳞状细胞癌中PTTG和bFGF的表达与临床病理因素的关系.世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2399-2403

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2399.asp>

0 引言

食管癌为我国最常见的恶性肿瘤之一,在某些地区位于发病率和死亡率的首位^[1-2]。垂体肿瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene, PTTG)是新近发现的一种癌基因,可通过多条途径参与肿瘤的病理过程,与多种肿瘤的发生、迁移与转移均有关系^[3-6],是一种强有力的肿瘤转化基因^[7-10]。血管新生是肿瘤生长和转移过程中一个关键限速步骤,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)作为一种细胞丝裂原和促血管生成因子,是发动肿瘤血管新生的主要活化因子之一,在许多肿瘤的生长中起着重要的作用^[11-16]。有关PTTG与bFGF在食管癌组织中的表达,及其与食管癌生物学特征的相关性至今报道较少。为此,我们应用免疫组化S-P法对组织中PTTG、bFGF两种蛋白进行检测和分析,探讨二者的相关性及其与食管癌临床病理特征的联系,以期对临床工作有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2004-2005年病理科存档的48例手术切除的食管癌组织标本,同时边缘有癌旁正常食管组织,所有标本均为100 g/L甲醛固定,石蜡包埋,有完整的临床资料。其中男性30例,女性18例,年龄60岁以下22例,60岁以上(含60岁)26例。瘤体直径<5者31例,≥5者17例。分化程度包括高分化、中分化33例,低分化15例。16例证明有淋巴结转移,32例没有转移。所有病例均按照国际抗癌联盟(UICC)的标准(1987)进行病理分期,包括I期、II期33例,III期15例。所有患者术前均未接受化疗、放疗及其他特殊治疗。兔抗人PTTG多克隆抗体和兔抗人bFGF多克隆抗体、SP试剂盒及DAB显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司(原北京中山生物技术

有限公司)。即用型S-P试剂盒(北京中杉生物公司),DAB染色试剂盒(北京博奥森生物公司)等。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法: 采用免疫组化法检测PTTG和bFGF在食管癌及癌旁正常食管组织中的表达情况。具体操作步骤简述如下:标本蜡块重新制备成4 μm连续切片,微波修复抗原,二甲苯去蜡10 min(2次),梯度酒精逐级水化。柠檬酸缓冲液(pH6.0)95℃修复10 min: 3% H₂O₂室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加非免疫性动物血清室温孵育15 min,加一抗(抗PTTG抗体1:100,抗bFGF抗体1:100),4℃孵育过夜;PBS冲洗后滴加生物素标记二抗37℃孵育10 min,辣根过氧化物酶标记抗生物素三抗37℃孵育15 min, PBS冲洗后DAB显色,冲洗,苏木精复染,封片,显微镜观察并拍照。免疫组化染色程序严格按照试剂盒说明书进行操作,用已知的阳性垂体瘤切片为阳性对照,用PBS液(0.01 mol/L, pH7.4)代替一抗作阴性对照。

1.2.2 结果判定: 参照Bresalier *et al*^[17]半定量法判断食管癌组织中PTTG和bFGF的表达情况。出现棕黄色颗粒为阳性表达。在光学显微镜下每张切片随机选取5个视野(×400),每个视野计数100个细胞,计算各个视野中的阳性细胞的平均百分率作为该切片阳性细胞的百分率,然后打分:0分为阴性,1分为阳性细胞<30%,2分为30%-70%,3分为>70%。同时染色强度亦进行打分,以多数呈现的染色特征为计分标准:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。最后以阳性细胞百分率计分和染色强度计分相加所得的总分进行结果判定:0分为阴性,1-6分为阳性。

统计学处理 应用SPSS13.0软件包进行统计学分析,两样本比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用Spearman等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTTG和bFGF在食管癌组织中的表达 PTTG和bFGF阳性表达均主要定位于肿瘤细胞的胞质,呈弥漫性全胞质分布,偶见胞核表达。食管癌灶中为弥漫性或灶性分布,肿瘤间质及炎症细胞少见不规则弱阳性分布(图1)。食管癌组织中PTTG表达阳性率为68.8%(33/48),bFGF表达阳性率为70.8%(34/48),在癌旁正常食管组织中阳性表达率分别为9.1%和14.3%,两组比较差异

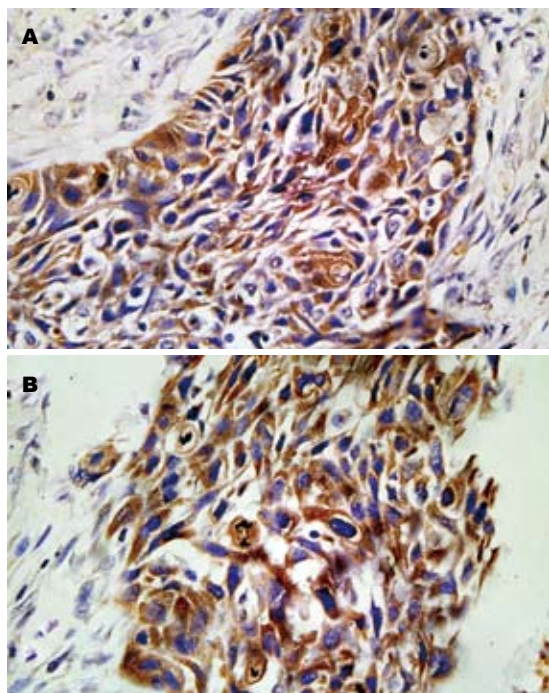


图 1 PTTG和bFGF蛋白在食管癌组织中的表达(S-P × 400). A: PTTG; B: bFGF.

表 1 食管癌组织和癌旁正常食管组织中PTTG和bFGF的表达差异的比较 ($n = 48$)

类型	PTTG		P	bFGF		P
	+	-		+	-	
癌组织	33	15	0.023	34	14	0.018
正常组织	4	44		6	42	

均有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

2.2 PTTG, bFGF的表达与食管癌临床和病理因素的关系 PTTG和bFGF的表达与淋巴结转移和TNM分期有关, 而与患者年龄、性别、肿瘤大小、组织学分化程度无关. 即有淋巴结转移和III期的食管癌组织中, PTTG和bFGF的阳性表达率明显高于无淋巴结转移和I、II期的食管癌组织($P < 0.05$, 表2).

2.3 食管癌组织中PTTG表达和bFGF表达的关系 在27例食管癌组织中PTTG和bFGF均被检测到, 7例只检测到bFGF, 6例只检测到PTTG, 有8例癌组织中二者均未检出. PTTG和bFGF的表达经 χ^2 检验, 有相关关系($\chi^2 = 7.582$, $r = 0.627$, $P = 0.012$, 表3).

3 讨论

PTTG是由Pei *et al*^[18]在1997年从大鼠GH4垂体瘤中分离出的新的原癌基因, 定位于染色体5q33, 含有5个外显子和个内含子, 编码一个含202个氨

表 2 PTTG, bFGF的表达与食管癌临床病理因素的关系

病理因素	PTTG		P	bFGF		P
	+	-		+	-	
年龄			0.845			0.817
<60	15	7		16	6	
≥60	18	8		18	8	
性别			0.537			0.401
男	23	9		24	8	
女	10	6		10	6	
瘤体大小(cm)			0.624			0.736
<5	21	10		23	8	
≥5	12	5		11	6	
组织分化程度			0.358			0.425
高、中分化	21	10		22	9	
低分化	12	5		12	5	
淋巴结转移			0.015			0.018
+	14	2		15	1	
-	19	13		19	13	
TNM分期			0.028			0.022
I、II期	20	13		21	12	
III期	13	2		13	2	

表 3 PTTG, bFGF的表达的关系

PTTG	bFGF		χ^2
	-	+	
-	8	7	7.582
+	6	27	

基酸残基、相对分子质量为 22×10^3 的蛋白质, 以细胞周期依赖性方式表达, 在有丝分裂期(特别是G₂/M期)表达水平最高. 在大多数正常人体组织如结肠、胰腺、卵巢、大脑等, PTTG只有弱表达甚至检测不到, 但在多种增生活跃的组织, 如胚胎肝、脾脏、睾丸等存在PTTG的表达, 在肿瘤细胞中如肺癌、膀胱癌、肝癌、垂体瘤、白血病、甲状腺癌等中高表达^[19-22]. PTTG可通过多条途径参与肿瘤的病理过程, 如诱导细胞转化, 促进其他原癌基因及促瘤因子的表达, 干扰姊妹染色单体分离, 促进bFGF参与的肿瘤血管生成等^[1]. 众多研究发现, PTTG是一个强有力的细胞转化基因, 在无其他辅助癌基因的参与下即能引起细胞转化, 与肿瘤的侵袭性、恶性程度、细胞分化程度及预后密切相关^[23-24]. 本实验研究结果表明, 在食管癌组织中PTTG表达水平显著高于癌旁正常食管组织($P < 0.05$). PTTG表达与患者年龄、性别、瘤体大小和肿瘤组织分化程度无相关性: 与有无淋巴结转移、TNM

■相关报道

Ishikawa *et al*发现转染PTTG的NIH3T3细胞的培养液中b-FGF表达增加, 这种培养液在体外能诱导人奇静脉内皮细胞增生、迁移和毛细血管管腔形成.

■应用要点

本实验证实了PTTG和bFGF在食管癌中的表达情况及二者的相关性。这将为食管癌的基因治疗以及开发新的药物治疗提供新的思路。

分期显著相关,患者有淋巴结转移时TNM分期越晚,PTTG阳性表达率也越高,这表明PTTG基因的阳性表达与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关:这与金中元 *et al*^[4]对原发性肝细胞癌的报道相一致。

肿瘤新生血管的形成在肿瘤的生长、侵袭、转移中起到重要的作用,bFGF是一种具有广泛生物活性的肽类物质,是调节血管生成的重要因子,bFGF对新生血管形成过程中的各个环节均有促进作用,可趋化血管内膜的各类细胞,并诱导这些细胞表达胶原酶、蛋白水解酶等,这些酶类可以促使血管内皮降解和刺激内膜各类细胞的增殖,诱导血管内皮细胞长入胶原基质形成管腔,促进新生血管生长。通过自分泌或旁分泌的形式促进细胞分裂增殖并强烈刺激肿瘤的血管生成,在多种肿瘤中过度表达^[25]。

PTTG可促进c-Myc和bFGF等其他促瘤因子的表达,其中PTTG与bFGF的关系最为密切,有学者认为PTTG的某些生物学作用通过bFGF实现^[26-27]。研究表明,肿瘤细胞内过度表达的PTTG蛋白通过其反式激活作用激活bFGF的分泌,同时,bFGF可促进IV型胶原酶的分泌,后者降解间质亦为癌细胞的转移提供了基础。体外实验表明,PTTG与b-FGF可相互诱导,形成自分泌与旁分泌的反馈环路^[28]。Ishikawa *et al*^[25]发现转染PTTG的NIH3T3细胞的培养液中b-FGF表达增加,这种培养液在体外能诱导人奇静脉内皮细胞增生、迁移和毛细血管管腔形成。在体内,可诱导鸡绒毛膜、尿囊膜呈轮辐状排列,后者为血管新生的表现。Tfelt-Hansen *et al*^[29]发现PTTG的过度表达可显著上调bFGF的表达,并促进肿瘤的血管形成。本研究发现b-FGF表达水平与患者年龄、性别、瘤体大小和肿瘤组织分化程度无相关性:而与有无淋巴结转移、TNM分期显著相关。b-FGF在III期食管癌中阳性率明显高于I+II期,说明b-FGF的表达与肿瘤的进展有关。b-FGF的阳性表达亦与淋巴结转移密切相关,表明其与肿瘤浸润转移有关($P<0.05$)。近期研究表明,b-FGF与多种恶性肿瘤的发生、发展有关,且其表达与肿瘤的预后相关^[14-17]。

本实验结果表明,PTTG和b-FGF在食管癌中具有高表达,并且二者表达均与肿瘤有无淋巴结转移、TNM分期显著相关,这与Shibata *et al*^[30]的研究结果相一致。同时,PTTG和bFGF的二者的表达呈显著正相关,这表明二者在肿瘤细胞的发生和发展中可能起一种协同作用。因

此我们认为PTTG可能通过提高bFGF的表达促进肿瘤新生血管的形成而促进肿瘤的生长及向恶性转化。

总之,本实验证实了PTTG和bFGF在食管癌中的表达情况及二者的相关性。这将为食管癌的基因治疗以及开发新的药物治疗提供新的思路。

4 参考文献

- 1 Yu R, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene: an update. *Front Horm Res* 2004; 32: 175-185
- 2 Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 2000; 248: 41-50
- 3 Yu R, Ren SG, Horwitz GA, Wang Z, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival: evidence from live cell imaging. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1137-1146
- 4 金中元,程瑞雪,郑长黎,郑晖. 原发性肝细胞癌中PTTG和c-myc基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1677-1681
- 5 Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJ, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JA. Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2341-2347
- 6 Meten-Mucha G. [Molecular aspects of pituitary tumors] *Endokrynol Pol* 2005; 56: 333-338
- 7 Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, Moore JS, Young LS, Gittoes NJ, Franklyn JA, Melmed S, McCabe CJ. PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 663-677
- 8 McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4238-4244
- 9 Yu R, Melmed S. Oncogene activation in pituitary tumors. *Brain Pathol* 2001; 11: 328-341
- 10 McCabe CJ, Gittoes NJ. PTTG--a new pituitary tumour transforming gene. *J Endocrinol* 1999; 162: 163-166
- 11 Ma EL, Li YC, Tsuneki H, Xiao JF, Xia MY, Wang MW, Kimura I. Beta-eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation. *J Asian Nat Prod Res* 2008; 10: 159-167
- 12 林瑶光, 韦良宏. 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和BFGF表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2199-2202
- 13 周颖, 王桂玲. bFGF促进人大肠癌LoVo细胞增殖的信号转导机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 34-38
- 14 Bilgic I, Ozalp N, Tez M, Koc M. Serum bFGF concentrations in gastric cancer patients. *Bratisl Lek Listy* 2008; 109: 8-9
- 15 Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Muller G. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via

- induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 2001; 59: 579-592
- 16 Smolej L, Andrys C, Krejsek J, Belada DZ, Zak P, Siroky O, Maly J. [Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment] *Vnitr Lek* 2007; 53: 1171-1176
- 17 Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1354-1367
- 18 Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1997; 11: 433-441
- 19 Stratford AL, Boelaert K, Tannahill LA, Kim DS, Warfield A, Eggo MC, Gittoes NJ, Young LS, Franklyn JA, McCabe CJ. Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4341-4349
- 20 Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, Perrin G, Fevre-Montange M, Rey C, Figarella-Branger D, Raverot G, Belin MF, Lachuer J, Trouillas J. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 887-900
- 21 Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2006; 17: 143-153
- 22 Bradshaw C, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene: an important gene in normal cellular functions and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2007; 22: 219-226
- 23 Mu YM, Oba K, Yanase T, Ito T, Ashida K, Goto K, Morinaga H, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H. Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A549 cell growth through activation of p21(WAF1/CIP1). *Endocr J* 2003; 50: 771-781
- 24 杨竹林, 苗雄鹰, 钟德珩, 黄生福, 梁珊, 付汐. 胰腺癌和慢性胰腺炎组织中垂体肿瘤转化基因mRNA和脆性组氨酸三联体表达研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 423-424
- 25 Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 867-874
- 26 Cong J, Wang HY, Zhang CL. [Expression and clinical significance of PTTG and b-FGF in acute leukemia] *Zhongguo Shiyan Xuetexue Zazhi* 2005; 13: 951-953
- 27 Wang YK, Cui N, Li J, Luo B. [Expression of pituitary tumor-transforming gene in endometrial carcinoma] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2004; 39: 538-542
- 28 McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 141-150
- 29 Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res* 2006; 4: 130-137
- 30 Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, Nishiwaki T, Kato J, Shinoda N, Sato A, Kimura M, Koyama H, Toyama T, Ishiguro H, Kudo J, Terashita Y, Konishi S, Fujii Y. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 233-237

■同行评价

本文内容新颖, 写作规范, 具有一定的临床指导意义。

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 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)

胃癌淋巴结转移灶与原发灶P-糖蛋白的表达及意义

李勇莉, 李红军, 张敏, 高建凯, 高福莲

■背景资料

在我国胃癌发病率和死亡率均居恶性肿瘤首位, 且呈上升趋势。多药耐药(MDR)严重影响胃癌患者的化疗效果和生存质量。mdr1编码的P-gp过度表达是引起MDR的主要机制。恶性肿瘤转移灶中肿瘤细胞MDR的异质性是影响化疗效果的主要障碍。

李勇莉, 高建凯, 高福莲, 新乡医学院组织胚胎学教研室 河南省新乡市 453003

李红军, 新乡医学院第一附属医院内科 河南省卫辉市 453100

新乡医学院大学生科研课题资助项目, No. 2005-14

作者贡献分布: 李勇莉与李红军对此文所作贡献均等; 此课题由李勇莉, 李红军及高福莲设计; 研究过程由李勇莉, 李红军, 张敏, 高建凯及高福莲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由高福莲提供; 数据分析由李勇莉, 张敏及高福莲完成; 本论文写作由李勇莉, 李红军及高福莲完成。

通讯作者: 高福莲, 453003, 河南省新乡市, 新乡医学院组织胚胎学教研室。gfl@xxmc.edu.cn

电话: 0373-3029126

收稿日期: 2008-04-09 修回日期: 2008-06-13

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-28

Expression of P-glycoprotein and its significance in metastatic lymph nodes and primary lesions of gastric carcinoma

Yong-Li Li, Hong-Jun Li, Min Zhang, Jian-Kai Gao, Fu-Lian Gao

Yong-Li Li, Min Zhang, Jian-Kai Gao, Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Hong-Jun Li, Department of Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, Henan Province, China

Supported by: the Students Scientific Research Project of Xinxiang Medical College, No. 2005-14

Correspondence to: Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China. gfl@xxmc.edu.cn

Received: 2008-04-09 Revised: 2008-06-13

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the different levels of P-glycoprotein (P-gp) expression in metastatic lymph nodes and primary lesions of gastric carcinoma and its relation with the biological behaviors of gastric cancer.

METHODS: Tissue specimens from 19 cases of gastric carcinoma with lymph node metastases were collected. The expression of P-gp was examined by immunohistochemistry in tissues of metastatic lymph nodes, primary lesions and normal gastric mucosa.

RESULTS: P-gp expression in metastatic lymph nodes was higher than that in the primary cancers (84.20% vs 52.63%, $P < 0.05$). The expression of P-gp in lymph node metastatic tissues had no significant association with the sex and age of patients, gastric carcinoma differentiation and infiltration, but P-gp expression in primary tumors was markedly associated with cancer differentiation degree and infiltration depth ($P < 0.05$). The positive rate of P-gp expression in patients without serosal invasion or with high and moderate differentiation was higher than that in those with serosal invasion or with low differentiation ($P < 0.05$).

CONCLUSION: P-gp expression in metastatic lymph nodes is higher than that in primary gastric cancers. The relation of P-gp expression with the biological behaviors is different between metastatic lymph nodes and primary lesions of gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; Lymph nodes; Metastasis; Multidrug resistance; P-glycoprotein

Li YL, Li HJ, Zhang M, Gao JK, Gao FL. Expression of P-glycoprotein and its significance in metastatic lymph nodes and primary lesions of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2404-2407

摘要

目的: 探讨P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在胃癌淋巴结转移灶与原发灶表达水平的差异及其与胃癌临床病理特征的关系。

方法: 应用免疫组化的方法检测19例伴有淋巴结转移的胃癌患者的淋巴结转移灶、胃癌原发灶和正常胃黏膜的P-gp表达。

结果: 淋巴结转移灶P-gp表达的阳性率高于原发灶(84.20% vs 52.63%, $P < 0.05$); 淋巴结转移灶P-gp表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度和浸润深度无关; 胃癌原发灶P-gp的表达与胃癌组织分化程度和浸润深度有关($P < 0.05$), 与性别和年龄无关。P-gp表达阳性率在高、中分化者较低分化者高, 肿瘤浸润未达浆膜者高。

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

于已穿越浆膜者。

结论: 胃癌淋巴结转移灶的P-gp表达高于原发灶, 淋巴结转移灶与原发灶P-gp表达和胃癌临床病理特征的关系不同。

关键词: 胃癌; 淋巴结; 转移; 多药耐药; P-糖蛋白

李勇莉, 李红军, 张敏, 高建凯, 高福莲. 胃癌淋巴结转移灶与原发灶P-糖蛋白的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2404-2407

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2404.asp>

0 引言

在胃癌化疗过程中, 多药耐药(multidrug resistance, MDR)严重影响患者的疗效和生存质量. MDR是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性同时, 对结构和作用机制完全不同的其他抗肿瘤药物也出现耐药性. 多药耐药基因1(multidrug resistance gene1, mdr1)编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)^[1]过度表达是引起MDR的主要机制. 恶性肿瘤转移灶中肿瘤细胞MDR的异质性是影响化疗效果的主要障碍^[2-3], 淋巴结是胃癌重要的转移途径, 目前对胃癌P-gp表达水平的研究多限于原发灶, 较少涉及淋巴结转移灶与原发灶比较, 对比研究胃癌淋巴结转移灶和原发灶P-gp表达的差异, 可为胃癌的化疗提供理论依据. 本研究应用免疫组化的方法检测同一患者的淋巴结转移灶、胃癌原发灶及正常胃黏膜的P-gp表达, 共19例, 探讨胃癌发生和转移中P-gp表达的变化及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-02/2006-08新乡医学院第一附属医院手术治疗的胃癌患者中, 病理确诊为胃腺癌、均伴有淋巴结转移、手术标本的切缘组织为正常胃黏膜的部分, 共19例. 其中男性12例, 女性7例; 年龄35-84岁. 患者术前未接受放、化疗以及非甾体类抗炎药治疗. 一抗为兔抗人P-gp多克隆抗体(Mdr(H-241): sc-8313), 购自Santa Cruz公司; 即用型SABC免疫组化染色试剂盒和DAB显色试剂盒购自武汉Boster公司。

1.2 方法 取手术标本的切缘组织、胃癌原发灶和转移淋巴结标本分别设为正常胃黏膜、胃癌原发和淋巴结转移三组, 经中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片. 采用SABC法对组织切片进行P-gp免疫组织化学染色, SABC包含有辣根过氧化物酶, 底物选择DAB. 染色步骤严格按试剂盒

表 1 胃癌转移淋巴结、原发灶和正常胃黏膜P-gp的表达 (n = 19, %)

临床病理特征	阳性	阴性
正常胃黏膜	4(21.10)	15(78.90)
胃癌原发灶	10(52.63)	9(47.37)
转移淋巴结	16(84.20)	3(15.80)

说明书进行. 由两位病理医师双盲法对正常胃黏膜、胃癌原发灶及相应转移淋巴结切片进行观察. 每种切片随机取5个($\times 400$)高倍视野, 每视野计数100个细胞. 以细胞膜及(或)细胞质呈棕黄色为P-gp阳性细胞, 阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为P-gp表达阳性。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行处理. 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 胃癌淋巴结转移灶、原发灶及正常胃黏膜的P-gp表达 P-gp在胃癌淋巴结转移灶、原发灶及正常胃黏膜均有不同水平表达(图1), 表达强度由高到低依次为淋巴结转移灶、原发灶及正常胃黏膜($P < 0.05$, 表1)。

2.2 胃癌转移淋巴结灶P-gp表达与临床病理特征的关系 转移淋巴结P-gp表达与胃癌患者的性别、年龄以及肿瘤分化程度和浸润深度均无关($P > 0.05$, 表2)。

2.3 胃癌原发灶P-gp表达与胃癌临床病理特征的关系 胃癌原发灶P-gp的表达与肿瘤分化程度和浸润深度有关, 高、中分化胃癌的P-gp阳性率高于低分化胃癌; 肿瘤浸润未达浆膜者高于已穿越浆膜者($P < 0.05$, 表2); 而与性别和年龄无关。

3 讨论

胃癌是我国十大恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率均居恶性肿瘤首位, 且呈上升趋势^[4]. 化疗仍是胃癌治疗的主要手段, 在胃癌的原发MDR中有P-gp参与. P-gp是具有转运功能的跨膜糖蛋白, 其疏水区结合药物, 能量依赖性地将药物泵出细胞外, 使细胞内药物蓄积减少导致MDR^[5]. 本研究结果显示, P-gp在正常胃黏膜、胃癌原发灶及相应淋巴结转移灶的表达率分别是21.10%、52.63%、84.20%. P-gp在正常胃黏膜和胃癌原发灶的表达率, 文献报告相差悬殊^[6-7], 造成不同结果的原因可能与应用的检测方法及技术不同有关; 关于胃癌淋巴结转移灶的表达率未见报道. P-gp在正常胃黏膜、

■ 研发前沿

目前对胃癌P-gp表达的研究多限于原发灶以及原发灶与正常胃黏膜P-gp表达的比较, 较少涉及淋巴结转移灶. 针对胃癌原发灶P-gp表达与临床病理特征关系的报道较多, 胃癌淋巴结转移灶P-gp表达与临床病理特征的关系尚未见报道。

■相关报道

高福莲 *et al* 针对胃癌组织P-gp表达与胃癌临床病理特征的关系的众多研究进行统计和分析, 得出胃癌的mdr1表达和胃癌对抗肿瘤药物敏感性、患者的生存期、生存率呈负相关; 和组织分化程度、肿瘤浸润程度、肿瘤分期及转移状况的关系不肯定性; 和肿瘤发生部位、大小、组织类型、患者年龄、性别无相关性。

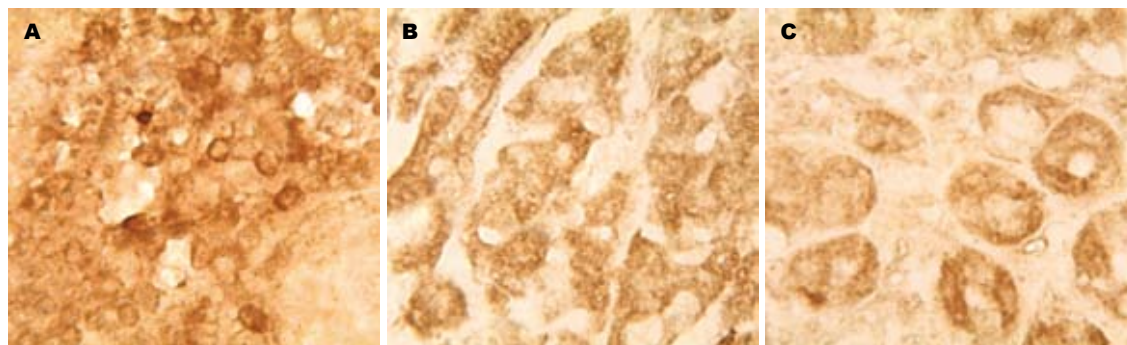


图1 胃癌淋巴结转移灶、原发灶和正常胃黏膜P-gp表达($\times 400$). A: 淋巴结转移灶; B: 原发灶; C: 正常胃黏膜。

表2 转移淋巴结和胃癌原发灶P-gp表达与临床病理特征的关系(%)

临床病理特征	n	转移淋巴结		P值	胃癌原发灶		P值
		阳性	阴性		阳性	阴性	
性别							
男	12	10(83.30)	2(16.70)	7(58.33)	5(41.67)	0.526	0.891
女	7	6(85.70)	1(14.30)	3(42.86)	4(57.14)		
年龄							
≤ 50 岁	7	5(71.40)	2(28.60)	4(57.10)	3(42.90)	0.770	0.256
> 50 岁	12	11(91.70)	1(8.30)	6(50.00)	6(50.00)		
肿瘤分化程度							
高、中分化	11	9(81.80)	2(18.20)	8(72.70)	3(27.30)	0.045	0.737
低分化	8	7(87.50)	1(12.50)	2(25.00)	6(75.00)		
浸润深度							
浆膜内	7	6(85.70)	1(14.30)	6(85.70)	1(14.30)	0.032	0.891
浆膜及浆膜外	12	10(83.30)	2(16.70)	4(33.30)	8(66.70)		

胃癌原发灶及相应淋巴结转移灶表达差异有统计学意义, 淋巴结转移灶中P-gp表达阳性率最高。韩杰 *et al* 对消化系肿瘤包括胃癌和大肠癌的淋巴结转移灶与原发灶的P-gp表达进行了研究, 在淋巴结转移灶与原发灶的P-gp表达与我们的结果一致^[8-9]。高福莲 *et al*^[10]对胃上皮永生化细胞ges-1、来自胃腺癌原发灶和淋巴结转移灶的胃癌细胞系BGC823和SGC7901的P-gp表达研究显示, P-gp表达在胃上皮永生化细胞ges-1就存在, BGC823增强, SGC7901介于二者之间, 但SGC7901少数细胞P-gp表达极强; P-gp表达在胃上皮永生化细胞ges-1和来自胃腺癌原发灶BGC823的变化趋势与本研究的正常胃黏膜和胃癌原发灶的结果一致, 但来自胃腺癌原发灶和淋巴结转移灶的胃癌细胞BGC823和SGC7901的P-gp表达变化趋势方面与本研究胃癌原发灶和淋巴结转移灶的结果不同, 这种不同可能为高福莲 *et al*使用的是建系细胞, 在肿瘤细胞演进中, P-gp表达极强的肿瘤细胞可能生命力更强, 形成了高表达P-gp的转移灶, 本实验的

淋巴结转移灶P-gp表达检测只是肿瘤转移灶生长的某个时段, 难反应肿瘤转移灶P-gp表达的发展过程。

胃癌淋巴结转移灶P-gp表达与临床病理特征的关系研究尚未见报道, 针对胃癌原发灶P-gp表达与临床病理特征关系的报道较多。本实验结果表明, 胃癌原发灶P-gp表达与性别和年龄无关, 与肿瘤分化程度和浸润深度有关, 在肿瘤分化程度、浸润深度以及性别和年龄等方面与高福莲 *et al*^[11]综述众多研究的如下结果一致: 原发灶mdr1表达和肿瘤分化程度、浸润程度关系不肯定性; 和患者性别、年龄无相关性。高中分化胃癌的P-gp阳性率高于低分化胃癌, 与Choi *et al*^[12]研究结果一致, 肿瘤浸润未达浆膜者高于已穿越浆膜者, 与刘忠民 *et al*^[13]的研究结果一致。

恶性肿瘤尽管由一个发生恶性转化的细胞单克隆增殖而来, 但在其演进过程中可能出现基因或大分子的改变, 表现为有各自特性的“亚克隆”, 对抗癌药敏感性等方面呈现异质性。本研究P-gp表达在正常胃黏膜、胃癌原发灶

和淋巴结转移灶有差异, 淋巴结转移灶中P-gp表达阳性率高于原发灶, 说明正常胃黏膜具有抵抗药物的特性, 肿瘤细胞只是增加了这种抗药性呈现原发耐药, 淋巴结转移灶的耐药性有异质性变化, 原发灶P-gp表达水平难反映淋巴结转移灶的P-gp参与的MDR, 检测淋巴结转移灶和胃癌原发灶P-gp表达对于指导临床制定合理的化疗方案有重要参考价值, P-gp表达主要对生物碱类、蒽环类和鬼臼类耐药, 对烷化剂较敏感, 临床上可根据肿瘤P-gp表达结果来选择化疗方案, 尽量避免使用与P-gp相关的药物以提高化疗效果; 化疗时应将转移灶与肿瘤原发灶区别对待, 尤其肿瘤切除术后的患者, 针对淋巴结转移灶化疗将提高综合治疗效果具有重要的临床意义。

本研究显示胃癌原发灶P-gp表达与否和临床病理特征的关系与淋巴结转移灶P-gp表达与否与临床病理特征关系不同, 也是胃癌淋巴结转移灶发生异质性的佐证。由于本研究涉及病例较少, 胃癌淋巴结转移灶和原发灶P-gp表达其能否成为预后指标尚需商榷, 有待于进一步扩大样本例数进行深入研究。

4 参考文献

- 1 Haus-Cohen M, Assaraf YG, Binyamin L, Benhar I, Reiter Y. Disruption of P-glycoprotein anticancer drug efflux activity by a small recombinant single-chain Fv antibody fragment targeted to an extracellular epitope. *Int J Cancer* 2004; 109: 750-758
- 2 Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 872-877
- 3 Bähr O, Rieger J, Duffner F, Meyermann R, Weller M, Wick W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells. *Brain Pathol* 2003; 13: 482-494
- 4 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 4-9
- 5 Lacueva FJ, Calpena R, Medrano J, Teruel A, Mayol MJ, Graells ML, Camarasa MV, Perez-Vazquez MT, Ferragut JA. Changes in P-glycoprotein expression in gastric carcinoma with respect to distant gastric mucosa may be influenced by p53. *Cancer* 2000; 89: 21-28
- 6 黄爱民, 刘景丰. 胃癌多药耐药基因的表达及其意义. *第四军医大学学报* 2002; 23: 1952-1954
- 7 Lacueva J, Perez-Ramos M, Soto JL, Oliver I, Andrada E, Medrano J, Perez-Vazquez T, Arroyo A, Carrato A, Ferragut JA, Calpena R. Multidrug resistance-associated protein (MRP1) gene is strongly expressed in gastric carcinomas. Analysis by immunohistochemistry and real-time quantitative RT-PCR. *Histopathology* 2005; 46: 389-395
- 8 韩杰, 吕炳蓉, 檀碧波, 何春年, 吕柏楠, 赵建辉. 消化系统肿瘤淋巴结转移灶多药耐药性的变化及其意义. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 1495-1496
- 9 檀碧波, 韩杰, 吕炳蓉, 吕柏楠, 何春年, 赵建辉, 耿伟. 消化系统肿瘤原发灶、淋巴结转移灶中p53、P-糖蛋白的表达及意义. *山东医药* 2007; 47: 83
- 10 高福莲, 岳保红, 马开颜, 乐晓萍, 张钦宪. 胃上皮永生细胞、胃腺癌细胞和胃腺癌淋巴结转移细胞多耐药基因1和P-糖蛋白的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 514-517
- 11 高福莲, 王永霞, 张钦宪. 胃癌多药耐药基因1表达及其与生物学行为的关系. *新乡医学院学报* 2006; 23: 305-306
- 12 Choi JH, Lim HY, Joo HJ, Kim HS, Yi JW, Kim HC, Cho YK, Kim MW, Lee KB. Expression of multidrug resistance-associated protein1, P-glycoprotein, and thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *Br J Cancer* 2002; 86: 1578-1585
- 13 刘忠民, 寿楠海. 胃癌组织mdr1基因表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 145-146

■同行评价

本文分析了P-糖蛋白在胃癌淋巴结转移灶与原发灶表达水平的差异及其与胃癌临床病理特征的关系, 具有一定的新意和临床应用价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

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://wcjd.wjgnet.com> /在线提交未成功, 请通过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 2008-07-28)

重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的动态变化及其与预后的关系

时红波, 陈煜, 韩大康, 赵军, 武志明, 段钟平

■背景资料

重型肝炎病情发展迅速, 预后凶险, 其病死率为60%-90%, 是严重威胁肝病患者生命的内科急重症。据文献报道, 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平明显升高, 这是肝细胞再生的反映, 同时也是肝纤维化形成的标志。如果在促进肝细胞再生的同时并阻止肝纤维化进展, 既能保持患者肝功能稳定在正常范围, 又能预防肝硬化的发生, 对于患者的预后将有积极的意义。

时红波, 武志明, 北京市卫生局肝炎研究所 北京市 100069
陈煜, 韩大康, 赵军, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069
国家重点基础研究发展计划(973)资助项目, No. 2007CB512801
中国肝炎防治基金会王宝恩肝纤维化研究基金资助项目, No. 20070025
作者贡献分布: 此课题由陈煜与段钟平设计; 研究过程由时红波、陈煜、韩大康及赵军操作完成; 研究所用试剂及分析工具由武志明提供; 数据分析由时红波完成; 本论文写作由时红波与陈煜完成。
通讯作者: 陈煜, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心。chybeyond@163.com
电话: 010-83997427
收稿日期: 2008-03-20 修回日期: 2008-04-16
接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-28

Dynamic changes of serum fibrosis indices and alpha fetoprotein and their relations with prognosis of patients with severe hepatitis

Hong-Bo Shi, Yu Chen, Da-Kang Han, Jun Zhao, Zhi-Ming Wu, Zhong-Ping Duan

Hong-Bo Shi, Zhi-Ming Wu, Beijing Municipal Hepatitis Institute, Beijing 100069, China
Yu Chen, Da-Kang Han, Jun Zhao, Zhong-Ping Duan, Center of Bioartificial Liver, Beijing You'an Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China
Supported by: the State Key Development Program for Basic Research of China, No. 2007CB512801, and the "Wang Bao-En Liver Fibrosis Research Foundation" from Chinese Foundation for Hepatitis Prevention and Control, No. 20070025
Correspondence to: Yu Chen, Center of Bioartificial Liver, Beijing You'an Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China. chybeyond@163.com
Received: 2008-03-20 Revised: 2008-04-16
Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the correlation between dynamic changes of serum fibrosis indices and alpha fetoprotein (AFP) and the prognosis of patients with severe hepatitis (SH).

METHODS: Based on the comparison of serum fibrosis indices and alpha fetoprotein in 89 patients with viral hepatitis, their dynamic changes

in different periods were studied dominantly in 39 SH patients.

RESULTS: The levels of HA, PIIIP and AFP in SH patients were higher than those in chronic hepatitis (CH) patients and normal individuals (3273.19 ± 2060.83 vs 127.63 ± 110.63 , 35.50 ± 18.59 ; 2.13 ± 1.20 vs 1.18 ± 0.43 , 0.80 ± 0.18 ; 130.98 ± 244.51 vs 20.40 ± 12.68 , 7.50 ± 1.23 ; all $P < 0.05$). The level of LN in SH patients was higher than that in normal individuals (148.95 ± 54.47 vs 120.70 ± 18.35 , $P < 0.05$). The levels of HA, PIIIP and LN tended to decrease in the living patients and to increase in the dead patients. The AFP level was elevated first and then reduced in the living patients, but showed a marked decreased trend in the dead patients. The serum levels of HA, PIIIP, LN and AFP in the subacute group were lower than those in the chronic group. In SH patients, HA level was significantly correlated with PTA, ALB and TBIL levels ($r = -0.372$, -0.395 , 0.344 , respectively; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: It is definitely valuable to dynamically inspect serum HA, PIIIP, LN and AFP level for the prognosis of SH patients.

Key Words: Severe hepatitis; Serum fibrosis index; Alpha fetoprotein; Dynamic changes

Shi HB, Chen Y, Han DK, Zhao J, Wu ZM, Duan ZP. Dynamic changes of serum fibrosis indices and alpha fetoprotein and their relations with prognosis of patients with severe hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2408-2411

摘要

目的: 初步探讨重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白(AFP)水平的动态变化及其与预后的关系。

方法: 在比较89例病毒性肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平的基础上, 着重研究其中39例重型肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平在不同时期的动态变化规律。

■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

结果: 重型肝炎患者血清透明质酸(HA)、Ⅲ型胶原氨基末端肽(PⅢP)和AFP水平高于慢性肝炎患者及正常人(3273.19 ± 2060.83 vs 127.63 ± 110.63 , 35.50 ± 18.59 ; 2.13 ± 1.20 vs 1.18 ± 0.43 , 0.80 ± 0.18 ; 130.98 ± 244.51 vs 20.40 ± 12.68 , 7.50 ± 1.23 , 均 $P < 0.05$), 重型肝炎患者血清LN水平仅高于正常人(148.95 ± 54.47 vs 120.70 ± 18.35 , $P < 0.05$); HA、PⅢP和LN在生存组总体呈现下降趋势, 死亡组呈现上升趋势, AFP水平在生存组呈现先升后降趋势, 在死亡组急剧下降; 血清HA、PⅢP、LN和AFP水平在亚急性组低于慢性组; 重型肝炎患者HA与PTA、ALB、TBIL有较好的相关性($r = -0.372, -0.395, 0.344$, 均 $P < 0.05$).

结论: 动态监测血清HA、PⅢP、LN和AFP水平对重型肝炎患者的预后判断有一定意义.

关键词: 重型肝炎; 肝纤维化指标; 甲胎蛋白; 动态变化

时红波, 陈煜, 韩大康, 赵军, 武志明, 段钟平. 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的动态变化及其与预后的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2408-2411
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2408.asp>

0 引言

重型肝炎病情发展迅速, 预后凶险, 其病死率为60%-90%, 是严重威胁肝病患者的内科急重症^[1]. 据文献报道, 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白(AFP)水平明显升高^[2-5]. 本研究在证实重型肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平升高的基础上, 动态观察重型肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平在不同时期的变化规律, 期望为重型肝炎患者的预后判断提供参考依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-06/2003-09北京佑安医院收治的病毒性肝炎患者89例, 其中慢性肝炎患者50例, 重型肝炎患者39例, 诊断依据2000年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[6]. 39例重型肝炎患者中, 亚急性11例, 慢性28例, 男30例, 女9例, 年龄20-65(平均40.2)岁, 分为生存组($n = 22$)和死亡组($n = 17$). 30例正常对照组血清标本采自健康献血员.

1.2 方法 重型肝炎患者入院确诊后, 分别在刚入院时、入院1 wk、入院2 wk采血. 离心, 分离血清, -80°C 冰箱冻存备用. 血清冻存标本待病例收集齐后, 一并解冻, 采用同一批试剂测定肝

纤维化指标: 透明质酸(HA)、Ⅲ型胶原氨基末端肽(PⅢP)及层连蛋白(LN). PⅢP检测采用放射免疫分析法, 试剂盒购自法国CIS国际生物公司; HA、LN检测采用酶联免疫吸附分析法, HA和LN试剂盒购自上海海军医学研究所. HA、PⅢP、LN的正常值(试剂盒附及临床验证)分别为45、0.8、126 $\mu\text{g/L}$ 以下. AFP用电化学发光酶免分析仪进行测定, 正常参考值为8.1 $\mu\text{g/L}$. 凝血酶原活动度(PTA)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)由本院临检中心检测.

统计学处理 计量资料显著性检验采用 t 检验, 相关分析采用Pearson相关分析, 采用SPSS10.0统计学软件进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 各组血清肝纤维化指标及AFP水平 血清HA、PⅢP、AFP水平在正常组、慢性肝炎组、重型肝炎组之间呈逐渐升高趋势, 各组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$). 血清LN水平在慢性肝炎组和重型肝炎组高于正常组($P < 0.05$), 但在慢性肝炎组和重型肝炎组之间无显著性差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 重型肝炎患者生存组和死亡组血清肝纤维化指标及AFP水平动态趋势 HA、PⅢP和LN在生存组总体呈现下降趋势, 死亡组呈现上升趋势, HA水平在各时间点生存组与死亡组之间有显著差异($P < 0.05$), PⅢP和LN水平在入院第1周生存组与死亡组之间差异没有统计学意义($P > 0.05$), 在其他时间点生存组与死亡组之间有显著差异($P < 0.05$). AFP水平在生存组呈现先升后降趋势, 在死亡组急剧下降, AFP水平在刚入院时生存组与死亡组之间差异没有统计学意义($P > 0.05$), 在其他时间点生存组与死亡组之间有显著差异($P < 0.05$, 图1). 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平与肝功能指标的关系见表2.

2.3 亚急性及慢性重型肝炎患者血清肝纤维化指标及AFP水平动态比较 HA和AFP水平在入院第2周亚急性组低于慢性组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在其他时间点亚急性组和慢性组之间差异没有统计学意义($P > 0.05$). PⅢP水平在各时间点亚急性组低于慢性组, 差异有统计学意义($P < 0.05$). LN水平在各时间点亚急性组低于慢性组, 在刚入院和入院第1周差异有统计学意义($P < 0.05$), 在入院第2周差异没有统计学意义($P > 0.05$, 图2).

■研究前沿

有关重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的研究很多, 但未见将两者结合起来进行研究的报道; 目前虽然有学者认识到动态监测重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的重要性, 但相关报道还很少.

■相关报道

据文献报道, 重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平明显高于正常水平.

■应用要点

在动态监测重型肝炎患者血清肝纤维化指标及甲胎蛋白水平的基础上,如能结合患者更多临床资料进行相关分析,对于患者病情评估、疗效考核、预后判断都将有积极的意义。

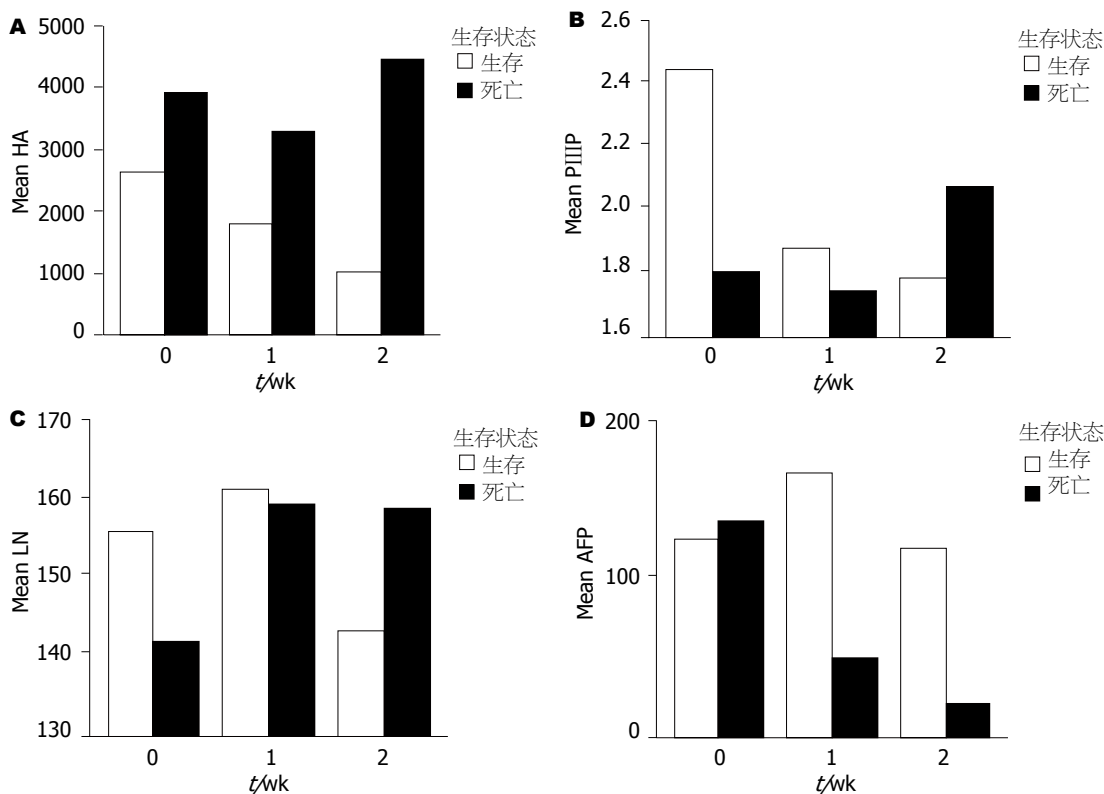


图1 生存组和死亡组各血清指标的动态变化. A: HA; B: P III P; C: LN; D: AFP.

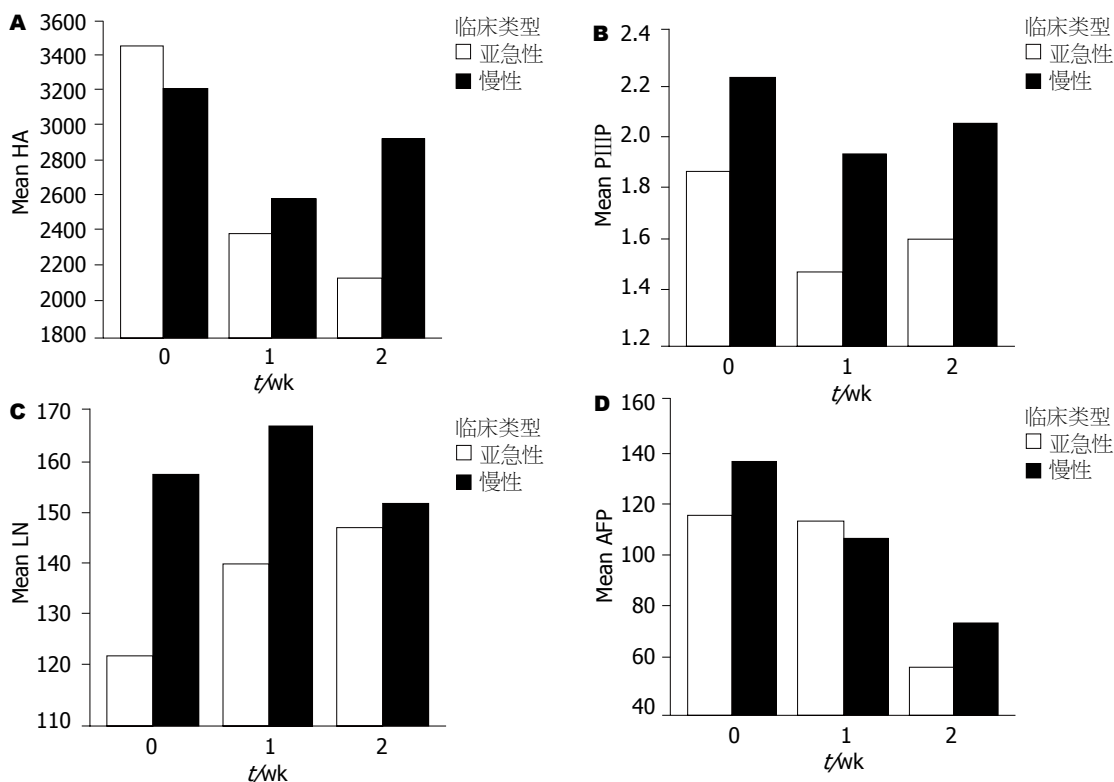


图2 亚急性组和慢性组各血清指标的动态比较. A: HA; B: P III P; C: LN; D: AFP.

3 讨论

重型肝炎发生后,首先是各种因素引起的肝细胞损伤,肝细胞坏死,随后发生肝细胞再生及肝纤维化.肝细胞再生和肝纤维化同是肝脏对各

种原因所致肝损伤的修复反应^[7],不同的是,肝细胞再生是正常的修复反应,而肝纤维化是异常的修复反应,如持续发展将导致肝硬化的发生,从长远来看,对机体十分不利。

表 1 各组HA、PIIIP、LN和AFP比较 (mean ± SD, μg/L)

分组	n	HA	PIIIP	LN	AFP
正常组	30	35.50 ± 18.59	0.80 ± 0.18	120.70 ± 18.35	7.50 ± 1.23
慢性肝炎组	50	127.63 ± 110.63	1.18 ± 0.43	149.62 ± 42.29	20.40 ± 12.68
重型肝炎组	39	3273.19 ± 2060.83	2.13 ± 1.20	148.95 ± 54.47	130.98 ± 244.51

表 2 HA、PIIIP、LN、AFP与PTA、ALB、TBIL的相关性分析

	HA	PIIIP	LN	AFP
PTA	-0.372 ^a	-0.166	-0.111	0.124
ALB	-0.395 ^a	-0.022	-0.020	-0.111
TBIL	0.344 ^a	0.014	0.010	-0.168

^aP<0.05.

重型肝炎患者大都有出血倾向, 肝穿虽是诊断肝纤维化的金标准, 但并不适用于重型肝炎患者. 近年来血清肝纤维化指标成为诊断肝纤维化的较好参数. HA、PIIIP和LN与肝纤维化有较好的相关性, 其中HA和PIIIP可反映活动性肝纤维化, 是动态监测抗纤维化药物疗效的较好指标^[8]. AFP过去被认为是诊断原发性肝癌的指标, 但在临床中, 经常看到肝炎患者AFP升高, 说明AFP升高不是诊断肝癌的特异性指标^[9], 目前认为AFP是表达肝细胞再生的指标^[10]. 肝细胞再生与肝纤维化同是肝损伤后的修复反应, 其发生机制似有一些共同的调节因素^[11], 决定着肝损伤后肝脏修复的发展方向.

本研究证实重型肝炎患者血清HA、PIIIP、LN和AFP水平高于正常水平, 与大多数文献报道结果一致^[2-5]. 生存组AFP水平呈现先升后降的变化趋势, 结合HA、PIIIP和LN总体下降趋势, 说明生存组在促进肝细胞再生的同时并有效阻止肝纤维化进程^[12], 预后较好. 死亡组AFP水平急剧下降, 结合HA、PIIIP和LN总体上升趋势, 说明死亡组肝细胞再生差, 肝纤维化继续进展, 总体预后较差. 血清HA、PIIIP、LN和AFP水平在亚急性组低于慢性组, 一方面说明亚急性组肝纤维化程度要低于慢性组, 这与亚急性组病程短, 损伤的肝细胞尚未发生明显的肝纤维化有关; 另一方面说明亚急性组肝细胞再生低于慢性组, 这与慢性组病程较长, 更能争取时间进行肝细胞再生有关; 总体看来, 随着病程进展, 慢性组肝细胞再生与纤维化要强于亚急性组. 重型肝炎患者肝纤维化指标中HA与PTA、ALB、TBIL有

较好的相关性, PTA、ALB、TBIL均可反映肝细胞损伤及严重程度^[13-14], 提示肝纤维化的发生可能与肝细胞损伤有直接关系.

重型肝炎后, 血清肝纤维化指标及甲胎蛋白处于高位水平, 这是肝细胞再生的反映, 同时也是肝纤维化形成的标志. 如果在促进肝细胞再生的同时并阻止肝纤维化进展, 就既能保持患者肝功能稳定在正常范围, 又能预防肝硬化的发生. 重型肝炎后极易发展为肝纤维化或者肝硬化, 早期进行抗肝纤维化治疗, 将有望逆转、阻止或延缓本病患者肝纤维化进程^[15], 将可能提高重型肝炎患者的寿命和生存质量.

4 参考文献

- 1 聂青和. 重型肝炎综合治疗进展的临床教学实践及体会. 实用肝脏病杂志 2006; 9: 104-106
- 2 李国钦, 高碧华, 叶报春. 甲胎蛋白在重型肝炎中改变的分析. 中西医结合肝病杂志 2007; 14: 198-199
- 3 王思奎, 刘凤华. 重型肝炎甲胎蛋白动态分析. 山东医药 2004; 44: 45
- 4 蔡洁毅, 吴一平, 邓芝禾. 血清肝纤维化指标在肝病中的临床分析. 河北医学 2006; 12: 1128-1130
- 5 袁和俊, 胡德昌, 翟为溶, 王吉耀, 刘厚钊. 血清HA、PCⅢ和PCⅣ联合检测评估肝纤维化的临床病理价值. 复旦学报(医学科学版) 2001; 28: 119-123
- 6 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. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 7 王志华. 扶正化癥法为主治疗慢性重型肝炎后肝纤维化的临床观察. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 647-648
- 8 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 522-526
- 9 王嘉倌, 刘连新. 肝细胞癌生物标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2251-2256
- 10 Schmidt LE, Dalhoff K. Alpha-fetoprotein is a predictor of outcome in acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2005; 41: 26-31
- 11 Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Hepatic regeneration. The role of regeneration in pathogenesis of chronic liver diseases. *Clin Lab Med* 1996; 16: 325-339
- 12 俞海英, 杨毅军, 刘新钰, 陈彦, 方之勋. 血液滤过对重型肝炎患者血小板衍生生长因子及Ⅲ型前胶原肽、层粘蛋白、透明质酸影响的研究. 江苏医药 2004; 3: 436-437
- 13 周友乾, 尹凤鸣. 浅谈重型肝炎预后与血清学指标的关系. 临床肝胆病杂志 2007; 23: 63-66
- 14 罗亚文, 罗军敏, 林世德, 易学东. 重型乙型肝炎患者血清IP-10的动态观察及临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2648-2651
- 15 徐列明. 重视肝纤维化的治疗. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1649-1653

编辑 李军亮 电编 郭海丽

■同行评价

本文科学性 & 实用性尚可, 具有一定的临床参考价值, 但创新性不足.

基于常规实验室检查的肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者住院期间死亡预测模型的建立

方念, 张焜和, 张慧卿, 谭新颖, 朱萱, 吕农华

■背景资料

肝硬化食管静脉曲张破裂出血(CEVB)是常见临床急重症, 死亡率高, 需要及时而准确地评估病情, 以制定最佳的个体化救治方案。目前尚无专门的CEVB病情评估模型, 临床常用的Child-Pugh肝功能分级、终末期肝病模型和Rockall评分系统用于CEVB的病情评估均有不足之处。建立简便易行CEVB死亡预测模型, 及时对病情作出客观评估, 对指导临床救治具有重要价值。

方念, 张焜和, 张慧卿, 谭新颖, 朱萱, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化内科; 江西省消化疾病研究重点实验室 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本文由张焜和, 方念, 朱萱及吕农华设计; 资料收集由方念, 张慧卿及谭新颖完成; 数据分析由方念, 张焜和及张慧卿完成; 本论文写作由方念与张焜和完成。

通讯作者: 张焜和, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科。yfyzk@sina.com

电话: 0791-8692507

收稿日期: 2008-04-08 修回日期: 2008-05-15

接受日期: 2008-05-20 在线出版日期: 2008-07-28

Predictive model of death for hospitalized patients with esophageal varices bleeding due to liver cirrhosis based on routine laboratory results

Nian Fang, Kun-He Zhang, Hui-Qing Zhang, Xin-Ying Tan, Xuan Zhu, Nong-Hua Lv

Nian Fang, Kun-He Zhang, Hui-Qing Zhang, Xin-Ying Tan, Xuan Zhu, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University; Jiangxi Key Laboratory for Digestive Diseases Research, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzk@sina.com

Received: 2008-04-08 Revised: 2008-05-15

Accepted: 2008-05-20 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To analyze the relationship between routine laboratory results and death risk in patients with cirrhotic esophageal variceal bleeding (CEVB), and to create a simple and timely predictive model of death for the patients.

METHODS: The medical documents of CEVB patients were reviewed retrospectively and the data were collected. Univariate and multivariate Logistic regression analyses were performed, in which the discharged results (survival or death) as dependent variables and the results of liver function, kidney function, serum electrolytes and blood cell analysis as independent variables were included. The multivariate regression

equation was as the model for the prediction of patient outcome and its predictive performance was evaluated.

RESULTS: In univariate regression, the significant positive variables for death outcome were DBIL, AKP, K, WBC, PLT, and the negative variables were TP, AP, A/G, Na, Cl, Ca. The variables entered the multivariate regression included ALT, TBIL, DBIL, GP, A/G, Cr, Na, Cl, Ca, WBC, Hb, PLT. The sensitivity, specificity and accuracy of the regression equation for predicting death of CEVB patients were 97.1%, 95.1% and 95.8%.

CONCLUSION: The liver function, kidney function, serum electrolytes and blood cell count are generally independent factors for death risk of CEVB patients, especially DBIL, A/G and Ca. The created regression model shows good prediction performance.

Key Words: Liver cirrhosis; Esophageal varices bleeding; Logistic regression; Death risk prediction

Fang N, Zhang KH, Zhang HQ, Tan XY, Zhu X, Lv NH. Predictive model of death for hospitalized patients with esophageal varices bleeding due to liver cirrhosis based on routine laboratory results. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2412-2416

摘要

目的: 探讨常规实验室检查与肝硬化食管静脉曲张破裂出血(CEVB)住院期间死亡风险的关系, 建立简便易行的死亡预测模型。

方法: 回顾性分析CEVB患者的临床资料, 以患者出院时生存或死亡为结果变量, 以肝功能、肾功能、血电解质和血常规4项常规实验室检查结果为自变量, 进行单因素和多因素Logistic回归分析, 以多元回归方程为数学模型, 预测患者的临床结局, 并评价其预测效率。

结果: 单因素分析显示有统计学意义且与患者的死亡风险正相关的指标有DBIL、AKP、

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

K、WBC和PLT, 与患者的死亡风险负相关的指标有TP、AP、A/G、Na、Cl和Ca; 多因素分析进入回归方程的指标有ALT、TBIL、DBIL、GP、A/G、Cr、Na、Cl、Ca、WBC、Hb和PLT; 回归方程对CEVB患者死亡预测的敏感度为97.1%, 特异度为95.1%, 准确度为95.8%。

结论: 肝功能、肾功能、血电解质和血常规总体上均是与CEVB患者死亡风险相关的独立因素, 其中最为密切的指标是DBIL、A/G和Ca; 所建立的预测模型具有良好死亡风险预测价值。

关键词: 肝硬化; 食管静脉曲张破裂出血; Logistic回归分析; 死亡风险预测

方念, 张焜和, 张慧卿, 谭新颖, 朱萱, 吕农华. 基于常规实验室检查的肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者住院期间死亡预测模型的建立. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2412-2416
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2412.asp>

0 引言

肝硬化食管静脉曲张破裂出血(cirrhosis esophageal varices bleeding, CEVB)是常见的消化科急重症, 死亡率高, 及时而有效的救治是降低死亡率的关键。CEVB的主要治疗方法有药物、三腔二囊管压迫、内镜下治疗和手术等^[1], 治疗方法不同, 费用差异悬殊^[2], 成本-效益比也不相同^[3-4]。因此, 面对一个新入院的CEVB患者时, 如果能及时而准确地评估其病情, 将为制定最佳的个体化救治方案奠定基础, 达到既能保证疗效, 又能降低费用的目的。目前尚无专门的CEVB病情评估模型, 临床常用Child-Pugh肝功能分级和终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)进行病情评估, 因他们都是针对肝硬化建立的病情评估系统, 并不一定适用于CEVB的病情评估: MELD评分在有并发症和没有并发症的肝硬化患者间差异无统计学意义^[5], 而Child-Pugh肝功能分级采用了主观指标, 且较为笼统。Rockall评分系统被认为对CEVB患者的预后评估有价值^[6], 但其需要内镜资料及完善的诊断结果^[7], 临床应用受到限制。为了能在CEVB患者入院后短期内对病情作出客观评价, 本研究以患者出院时生存或死亡为结果变量, 以肝功能、肾功能、血电解质和血细胞分析4项常规实验室检查结果为自变量, 建立Logistic回归方程, 预测患者住院期间的临床结局(生存或死亡), 获得良好的预测效果, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-2007年南昌大学第一附属医院的CEVB患者95例, 其中男81例, 女14例, 年龄21-72(平均48.3)岁。61例(64.21%)经抢救出血停止, 病情稳定, 存活出院, 归为存活组; 34例(35.79%)抢救无效, 住院期间死亡, 归到死亡组。死因主要包括失血性休克、肝肾综合征、肝性脑病、感染(原发性腹膜炎)。病例的诊断参考2000年西安第十次中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的肝硬化诊断标准, 依据肝功能不全的临床表现、门脉高压症的表现、肝功能损害的实验室依据、影像学检查显示肝硬化征象作出肝硬化诊断, 食管静脉曲张破裂出血的诊断依据有黑便和/或呕血症状且大便隐血试验阳性、急诊胃镜检查发现食管胃底静脉曲张且有活动性出血或近期出血征象、或三腔二囊管压迫后胃腔内无血性液体抽出(未行胃镜检查者)。所有病例参照国内有关规范^[1], 进行内科综合治疗, 包括药物治疗、三腔囊管压迫和/或内镜治疗等, 手术治疗的病例未纳入本研究。

1.2 方法 采用回顾性调查方法, 查阅近3年的CEVB患者的病案资料, 对资料完整者依上述诊断标准进一步核实诊断, 对符合要求的患者收集其入院后首次检查的实验室检查结果: (1)肝功能, 包括谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、结合胆红素(DBIL)、碱性磷酸酶(AKP)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、总蛋白(TP)、白蛋白(AP)、球蛋白(GP)、白蛋白与球蛋白比值(A/G); (2)肾功能, 包括血肌酐(Cr)、血尿素氮(BUN); (3)血电解质, 包括钾(K)、钠(Na)、氯(Cl)、钙(Ca); (4)血细胞分析, 包括白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(Hb)、血小板计数(PLT)。各项数据存入Excel电子表格。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行数据统计分析^[8-9]。以患者的临床结局为因变量(存活编码为0, 死亡为1), 以上述常规实验室检查的各项数据为自变量, 先进行单因素二值Logistic回归分析, 明确各项检查中各单项与患者死亡风险的关系; 然后进行多因素后向逐步二值Logistic回归分析, 得到多元Logistic回归方程(数学模型)及其对每个病例的类别概率预测值, 根据后者绘制受试者工作特征(ROC)曲线, 以求得最适判别界值, 并以此界值得到所建数学模型对全组病例临床结局的最佳预测结果。根据预测结果计算所建数学模型对CEVB患者死亡结局预测的敏感度、特异度、准确度、阳性预测

■研发前沿

对于病情程度的评估一般是筛选主要相关因素, 量化后建立综合评分系统, 以分值高低反应病情程度, 如Child-Pugh肝功能分级; 目前多采用多因素Logistic回归分析建立数学模型进行评估, 如MELD模型。选用指标尽量以客观指标为主, 以提高可靠性和实用价值。

■相关报道

国内外仅有关于CEVB患者预后影响因素的研究报道, 但患者住院期间死亡风险预测模型尚未见报道。在CEVB患者预后影响因素的研究中, 主要涉及不同治疗方法对预后的影响、再出血的危险因素或评估现有模型或评分系统的预测价值。

■创新亮点

本研究从一个独特的视角对CEVB患者住院期间的死亡风险进行探讨,挖掘临床上最常用的4项常规实验室指标所蕴含的预后评估价值,建立简便易行的数学预测模型,思路新颖。

表 1 常规实验室检查指标与CEVB患者死亡关系的单因素Logistic回归分析结果

指标	回归系数	标准误	Wald值	P值	OR值(95% CI)
ALT	0.004	0.004	1.058	0.304	1.004(0.996-1.011)
AST	0.001	0.001	0.761	0.383	1.001(0.999-1.002)
TBIL	0.015	0.009	2.564	0.109	1.015(0.997-1.034)
DBIL	0.138	0.038	13.238	0.000	1.148(1.066-1.237)
AKP	0.010	0.004	8.528	0.003	1.010(1.003-1.017)
GGT	0.001	0.002	0.078	0.780	1.001(0.997-1.004)
TP	-0.077	0.032	5.564	0.018	0.926(0.869-0.987)
AP	-0.230	0.059	15.365	0.000	0.794(0.708-0.891)
GP	0.002	0.032	0.006	0.938	1.002(0.942-1.066)
A/G	-1.846	0.778	5.634	0.018	0.158(0.034-0.725)
Cr	0.011	0.007	2.478	0.115	1.011(0.997-1.026)
BUN	-0.030	0.063	0.224	0.636	0.971(0.859-1.097)
K	1.313	0.415	10.012	0.002	3.718(1.648-8.386)
Na	-0.101	0.040	6.496	0.011	0.904(0.837-0.977)
Cl	-0.124	0.034	13.377	0.000	0.883(0.827-0.944)
Ca	-6.283	1.518	17.138	0.000	0.002(0.000-0.037)
WBC	0.238	0.064	14.036	0.000	1.269(1.120-1.437)
RBC	-0.406	0.345	1.384	0.239	0.666(0.338-1.311)
Hb	0.011	0.010	1.125	0.289	1.011(0.991-1.031)
PLT	0.007	0.003	4.637	0.031	1.007(1.001-1.014)

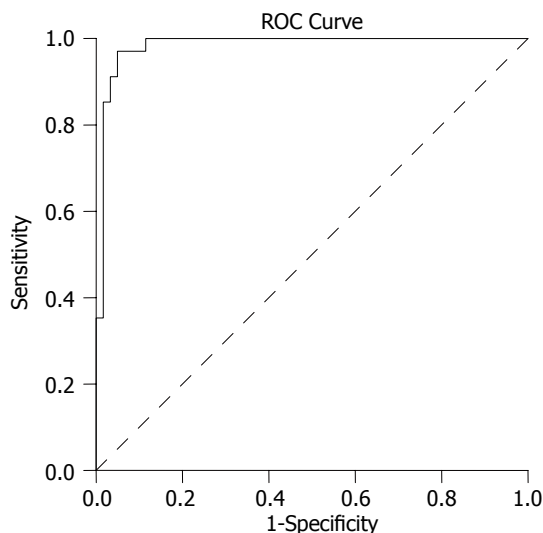


图 1 所建立的Logistic回归模型预测CEVB死亡的ROC曲线图。

值、阴性预测值,以评价模型的预测价值。

2 结果

2.1 单因素Logistic回归分析 有统计学意义且系数为正值指标有DBIL、AKP、K、WBC、PLT,与患者的死亡风险正相关;有统计学意义且系数为负值的指标有TP、AP、A/G、Na、Cl、Ca,与患者的死亡风险负相关;其余指标与死亡结局均无统计学意义(表1)。OR值较大或较小的指标有

A/G、K、Ca,对死亡风险的预测价值较大。

2.2 多因素Logistic回归分析 进入回归方程的指标有ALT、TBIL、DBIL、GP、A/G、Cr、Na、Cl、Ca、WBC、Hb、PLT(表2),其中DBIL、Cr、Cl、Hb等4项指标的系数为正值,与CEVB患者的死亡风险正相关,ALT、TBIL、GP、A/G、Ca等5项指标的系数为负值,与患者的死亡风险负相关,而Na、WBC和PLT无统计学意义。OR值较大或较小的3项指标是DBIL、A/G和Ca。求得的Logistic回归方程为: $\text{Logit}(P) = -17.969 - 0.019\text{ALT} - 0.224\text{TBIL} + 0.697\text{DBIL} - 0.458\text{GP} - 12.865\text{A/G} + 0.057\text{Cr} + 0.161\text{Na} + 0.166\text{Cl} - 5.634\text{Ca} + 0.210\text{WBC} + 0.085\text{Hb} + 0.010\text{PLT}$ 。

2.3 回归方程对患者临床结局的预测效率 将所建立的回归方程变形为求概率值的表达式,回代计算各例的生死概率预测值,绘出ROC曲线(图1),求得最适的生存与死亡预测界值为0.45,大于或等于该界值的病例预测为死亡,否则预测为生存。依据该界值,生存组61例中58例判断正确,3例判断错误,死亡组34例中33例判断正确,1例判断错误。回归方程对CEVB患者死亡预测的敏感度为97.1%,特异度为95.1%,准确度为95.8%,阳性预测值为91.7%,阴性预测值为98.3%,阳性似然比为19.74,阴性似然比为0.03。

表 2 常规实验室检查指标与CEVB患者死亡关系的多因素Logistic回归分析结果

指标	回归系数	标准误	Wald值	P值	OR值(95% CI)
ALT	-0.019	0.008	6.305	0.012	0.981(0.966-0.996)
TBIL	-0.224	0.083	7.235	0.007	0.799(0.679-0.941)
DBIL	0.697	0.234	8.894	0.003	2.007(1.270-3.173)
GP	-0.458	0.188	5.949	0.015	0.632(0.438-0.914)
A/G	-12.865	5.323	5.841	0.016	0.000(0.000-0.088)
Cr	0.057	0.024	5.553	0.018	1.059(1.010-1.111)
Na	0.161	0.116	1.938	0.164	1.175(0.936-1.474)
Cl	0.166	0.094	3.105	0.078	1.181(0.982-1.420)
Ca	-5.634	2.885	3.813	0.051	0.004(0.000-1.021)
WBC	0.210	0.125	2.804	0.094	1.234(0.965-1.578)
Hb	0.085	0.031	7.689	0.006	1.088(1.025-1.156)
PLT	0.010	0.010	1.105	0.293	1.011(0.991-1.030)

■应用要点

本研究所建立的CEVB患者住院期间死亡预测模型, 预测效果良好, 可及时指导临床诊疗。模型所用指标为常规实验室指标, 包括基层医院在内的各级医院均很容易使用, 适用性广。

3 讨论

国内已有关于CEVB患者预后因素的研究^[10-12], 但对患者住院期间的死亡预测尚未见报道。本研究对95例CEVB患者的4项常规实验室检查结果进行了单因素和多因素Logistic回归分析, 观察了各单项指标对CEVB患者住院期间死亡的风险评估价值, 所建立的数学模型对患者生存或和死亡预测的准确度达到95.8%, 效果良好, 与国外学者以肝性脑病、凝血酶原时间和72 h内的输血单位数量为指标所建立的模型预测效果(95.6%)类似^[13], 但本模型所用指标均为客观指标, 不含治疗相关指标。

单因素Logistic回归分析显示, DBIL、AKP、K、WBC、PLT等5项指标与CEVB患者死亡风险呈正相关。其中比较突出的是K($OR = 3.718$)和WBC($OR = 1.269$), 其他几项 OR 值只稍大于1(1.007-1.148)。CEVB患者因失血或并发肝肾综合征, 尿量减少, 排钾功能障碍, 也可因合并严重感染、酸中毒使血钾升高。因此, 血钾升高, 提示病情严重, 死亡风险大。而直接反映肾功能的指标Cr和BUN均无统计学意义, 提示他们似乎不是敏感的CEVB患者死亡风险指标。

在单因素Logistic回归分析中, 还有TP、AP、A/G、Na、Cl、Ca等6项指标与CEVB患者死亡风险呈负相关。其中比较突出的是Ca($OR = 0.002$)和A/G($OR = 0.158$), 其他几项 OR 值只稍小于1(0.794-0.926)。A/G是人们熟知的反映慢性肝功能损害的指标, 其比值越低, 死亡风险越大, 容易理解。但血清钙有如此强烈的死亡风险相关性, 则往往不被人们认识。肝脏对钙调激素的调节代谢过程有重要的作用, 严重肝病时, 维生素D₃在肝细胞内羟化减少, 钙摄入不足和肠道

钙吸收减少, 维生素D缺乏及血浆蛋白下降, 都可引起血钙降低。肝功能障碍越严重, 血钙水平越低, 两者具有一致性^[14]。另有报道, 肝硬化合并感染时, 血清降钙素原检测阳性率达95.8%(非感染时为14.0%)^[15]。因此, 血钙水平具有反映肝功能损害和并发感染的双重功效, 因而具有重要的死亡风险预测价值, 其预后评判价值应在临床上更受重视。

在多因素Logistic回归分析中, 4项常规检查中均有指标进入方程, 包括肝功能中的ALT、TBIL、DBIL、GP和A/G, 肾功能中的Cr, 电解质中的Na、Cl和Ca, 血常规中的WBC、Hb和PLT。因此, 从总体上看, 4项常规检查均是与CEVB患者死亡风险相关的独立因素, 可作为简便有效的预后评价指标。

单因素与多因素Logistic回归分析均显示与CEVB患者死亡风险密切相关的指标有DBIL、A/G和Ca。与TBIL相比, DBIL对CEVB患者的死亡风险预测价值更大。TBIL在多因素分析中虽进入方程, 但在单因素分析中无统计学意义。血白蛋白水平是反映肝脏蛋白代谢功能的常用指标, 但在本研究中也未进入回归方程, 取而代之的是A/G, 相比之下, 后者对患者的死亡预测更有价值。血钙水平在本研究显示对CEVB患者死亡风险预测的作用最为显著, 在单、多因素分析中 OR 值分别仅为0.002和0.004, 如果将其从回归方程中剔除, 预测的准确性就由95.8%降为90.5%。

在MELD模型和Child-Pugh分级中, 采用的指标有TBIL、AP、Cr等, 这些指标在我们的模型中都不重要, 是否提示MELD模型和Child-Pugh分级并不适合CEVB患者病情严重程度的

■同行评价

本文研究内容较全面,论述条理,对临床有一定的参考价值.

评估,或我国的肝硬化患者有自身特点,尚有待进一步研究.

本研究借助数理统计分析,综合分析4种常规实验室指标,建立数学模型,无需复杂和昂贵的检测技术,即可对CEVB患者住院期间的死亡风险作出良好的预测.因这4种常规检查在基层医院都能开展,因而模型具有广泛的适用性.因为模型的所用指标在CEVB患者入院后第2天就能获得,可迅速对病情严重程度作出评估.当一个CEVB患者入院后经本模型预测有死亡风险时,意味着诊断与治疗工作应该更为积极和细致.尽管本模型变量数达9项,临床应用有其不便之处,但对于计算机无处不在的当今社会,并不是问题.不过,本研究样本量还不够大,模型的可靠性还有待更多病例的验证.

4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学分会.食管胃静脉曲张内镜下诊断和治疗规范试行方案(2003年).中华消化内镜杂志 2004; 21: 149-151
- 2 Thabut D, Hammer M, Cai Y, Carbonell N. Cost of treatment of oesophageal variceal bleeding in patients with cirrhosis in France: results of a French survey. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 679-686
- 3 黄林, 曾华. 奥曲肽与垂体后叶素治疗食管静脉曲张破裂出血的成本-效果分析. *四川医学* 2007; 28: 507-508
- 4 张颖, 陈世耀, 于晓峰, 赵尚敏, 王一倩. 急诊内镜套扎联合奥曲肽治疗食管静脉曲张出血的成本-效果分析.

- 中华流行病学杂志 2006; 27: 433-436
- 5 Huo TI, Lin HC, Wu JC, Hou MC, Lee FY, Lee PC, Chang FY, Lee SD. Limitation of the model for end-stage liver disease for outcome prediction in patients with cirrhosis-related complications. *Clin Transplant* 2006; 20: 188-194
- 6 Sanders DS, Carter MJ, Goodchap RJ, Cross SS, Gleeson DC, Lobo AJ. Prospective validation of the Rockall risk scoring system for upper GI hemorrhage in subgroups of patients with varices and peptic ulcers. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 630-635
- 7 Rockall TA, Logan RF, Devlin HB, Northfield TC. Risk assessment after acute upper gastrointestinal haemorrhage. *Gut* 1996; 38: 316-321
- 8 林爱华. 医院资料如何应用SPSS软件包进行Logistic回归分析. *中国医院统计* 2003; 10: 57-59
- 9 刘润幸. 使用SPSS作多变量观察值的ROC曲线分析. *中国公共卫生* 2003; 19: 1511-1512
- 10 蒋晓渠, 王吉耀, 陈世耀. 食管胃底静脉曲张破裂出血预后的队列研究. *中华医学杂志* 2001; 81: 515-519
- 11 陈红, 张照如, 刘秩群. 43例乙型肝炎肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血患者的预后分析. *实用肝脏病杂志* 2007; 10: 335-336
- 12 赵超, 陈少波, 周建平, 肖文, 范汉恭, 吴学威, 冯干忻, 何维雄. 影响肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血预后的分析. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 466-467
- 13 Le Moine O, Adler M, Bourgeois N, Delhaye M, Devière J, Gelin M, Vandermeeren A, Van Gossum A, Vereerstraeten A, Vereerstraeten P. Factors related to early mortality in cirrhotic patients bleeding from varices and treated by urgent sclerotherapy. *Gut* 1992; 33: 1381-1385
- 14 房淑华, 苏彤春. 肝硬化和肝癌患者80例血清钙测定及意义. *中国实用内科杂志* 2003; 23: 694
- 15 郑宇, 张雪青, 吴金明, 李骥, 阮冰. 肝硬化合并细菌感染患者血清降钙素原和C-反应蛋白水平的研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 701-702

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(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录.(常务副总编辑:张海宁 2008-07-28)

GADD45 β 在肝癌中的异常表达

杨娟, 杨玉秀, 韩双印, 白阳秋, 张立达

杨娟, 杨玉秀, 韩双印, 白阳秋, 张立达, 河南省人民医院消化内科 河南省郑州市 450003

河南省医学创新基金资助项目, No. 20050080

作者贡献分布: 此课题由杨玉秀与杨娟设计; 论文由杨玉秀与韩双印审核; 研究所用分析工具由张立达提供; 研究过程由杨娟与白阳秋操作完成; 数据分析由杨娟与白阳秋完成; 本论文写作由杨娟完成。

通讯作者: 杨玉秀, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院消化内科. yangyuxiu55@126.com

电话: 0371-65580344

收稿日期: 2008-03-02 修回日期: 2008-04-09

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-28

Abnormal expression of growth arrest and DNA-damage inducible gene β in hepatocellular carcinoma

Juan Yang, Yu-Xiu Yang, Shuang-Yin Han, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang

Juan Yang, Yu-Xiu Yang, Shuang-Yin Han, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Supported by: the Medical Innovation Foundation of Henan Province, No. 20050080

Correspondence to: Yu-Xiu Yang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. yangyuxiu55@126.com

Received: 2008-03-02 Revised: 2008-04-09

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between the expression of growth arrest and DNA-damage inducible gene β (GADD45 β) and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Using oligonucleotide chip, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, the expression of GADD45 β was detected in tissues of normal human liver, liver cirrhosis and HCC. We also analyzed the relationship between GADD45 β expression and the clinicopathological characteristics of HCC. Furthermore, the possible molecular mechanism of its abnormal expression was investigated.

RESULTS: The positive rates of GADD45 β

mRNA expression were 80%, 60% and 26% in normal liver, liver cirrhosis and HCC, respectively, and there was a significant difference between normal liver and HCC ($\chi^2 = 15.128$, $P < 0.01$). The positive rates of GADD45 β protein were 85%, 70% and 31% in normal liver, liver cirrhosis and HCC, respectively, and there was also a significant difference between normal liver and HCC ($\chi^2 = 24.619$, $P < 0.01$). Meanwhile, the deletion of GADD45 β was significantly correlated with the pathological grading of HCC.

CONCLUSION: GADD45 β , as tumor suppressor gene, plays an important role in the carcinogenesis of HCC, and its expression is intimately correlated with tumor differentiation.

Key Words: Oligonucleotidechip; Reverse transcriptional polymerase chain reaction; Immunohistochemistry; Hepatocellular carcinoma; Growth arrest and DNA-damage inducible gene β ; Down-regulated expression

Yang J, Yang YX, Han SY, Bai YQ, Zhang LD. Abnormal expression of growth arrest and DNA-damage inducible gene β in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2417-2422

摘要

目的: 探讨生长抑制DNA损伤诱导因子 β (GADD45 β)与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生、发展的关系。

方法: 应用寡核苷酸基因芯片、反转录PCR(RT-PCR)、免疫组织化学技术检测GADD45 β 在人正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中的异常表达, 分析GADD45 β 与临床病理学特征的关系及其异常表达的可能分子生物学机制。

结果: 正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中GADD45 β mRNA的阳性表达率分别为80%、60%和26%, 肝癌组织与正常肝组织间有非常统计学差异($\chi^2 = 15.128$, $P < 0.01$); GADD45 β 蛋白的阳性表达率在正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中分别为85%、70%和31%, 有显著统计学差异($\chi^2 = 24.619$,

■背景资料

GADD45 β 是DNA损伤修复基因, 具有调节控制细胞的增生、监测细胞周期、诱导细胞凋亡、调控细胞的负性生长等功能。目前, 有关GADD45 β 在肝癌中的生物学作用和临床价值尚不甚明了, 研究其异常表达机制及与临床病理特征之间的关系, 有望为肝癌的早期诊断和靶向治疗提供潜在的途径。

■同行评议者

季国忠, 副教授, 南京医科大学第二附属医院消化科

■研发前沿

GADD45 β 与其他蛋白如PCNA, p21、核组蛋白、MTK1/MEKK4激酶以及Cdk1等的相互作用是多年来研究的热点,而近年研究热点主要集中于GADD45 β 参与多种信号通路如NF- κ B、p38/JNK、Foxo等的调节,以调控细胞负性生长。

$P<0.01$). GADD45 β 在肝癌组织中的表达缺失与病理学分级显著相关($P<0.01$).

结论: GADD45 β 作为抑癌基因在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用,且与肿瘤分化程度密切相关。

关键词: 寡核苷酸芯片; 反转录聚合酶链式反应; 免疫组织化学; 肝细胞癌, GADD45 β ; 低表达

杨娟, 杨玉秀, 韩双印, 白阳秋, 张立达. GADD45 β 在肝癌中的异常表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2417-2422

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2417.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)简称肝癌,是临床上最常见的恶性肿瘤之一,是由病毒、化学致癌物等多病因作用的多环节、多步骤的复杂过程,常伴随着癌基因突变、抑癌基因缺失以及DNA修复基因的异常表达等。其中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌发生的主要原因^[1],在这一过程中涉及多种基因的异常表达。生长抑制DNA损伤诱导因子 β (growth arrest and DNA-damage inducible gene β , GADD45 β)是细胞和DNA损伤的应激基因,主要调节控制细胞的增生、监测细胞周期、诱导细胞凋亡、调控细胞的负性生长等^[2]。目前,有关GADD45 β 在肝癌中的生物学作用和临床价值尚不甚明了。本研究通过应用寡核苷酸基因芯片、反转录PCR(RT-PCR)及免疫组织化学技术检测GADD45 β 在人正常肝、肝硬化、肝癌组织中的异常表达,探讨GADD45 β 在肝癌演进过程中的作用,及其与临床病理特征之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-03/2006-04收取正常肝组织9例,肝硬化组织6例,肝癌组织15例,用于寡核苷酸基因芯片研究; 2007-03/2007-05收取正常肝组织20例,肝硬化组织10例,肝癌组织35例,用于反转录PCR及免疫组织化学研究。肝硬化、肝癌组织标本HBsAg均阳性,正常肝组织HBsAg阴性。疾病诊断均经病理证实。标本取出后迅速置于液氮冷冻,后转移至-80℃冰箱冻存待用。标本选取随机,均取自河南省人民医院肝脏手术切除组织。其中正常肝组织取自肝血管瘤手术切除病变部位的周围组织,肝硬化组织取自门脉高压行贲门周围血管离断术要求行病理检查的肝脏组织,肝癌组

织取自肝癌手术切除组织,所取组织新鲜,并经过患者知情同意。兔抗人GADD45 β 多克隆抗体(sc-33172)购自美国Santa Cruz公司, PV-6001羊抗兔免疫组织化学试剂盒及DAB显色剂均购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸基因芯片: 总RNA提取, cDNA合成、芯片杂交和检测, 数据分析, 方法见文献[3]。

1.2.2 反转录PCR: (1)抽提总RNA: 用TRIzol试剂(Qiagen公司)分别抽提正常肝组织、肝硬化和肝癌组织总RNA。(2)内参基因GAPDH上游引物: 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', 下游引物: 5'-CTCCATGGTGGTGAAGAC-3'; 扩增片段长度309 bp。目的基因GADD45 β 上游引物: 5'-CAGAAGATGCAGACGGTGAC-3', 下游引物: 5'-AGGACTGGATGAGCGTGAAG-3'; 扩增片段长度202 bp。(3)GADD45 β -cDNA合成及PCR扩增: 按RT-PCR试剂盒(Promega公司提供)要求步骤进行反转录聚合酶链反应。先合成cDNA, 再进行PCR。扩增产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。(4)扩增产物图像分析: 通过对GADD45 β 扩增产物进行扫描和半定量分析, 结果用Syngene GeneGenius全自动凝胶成像系统(美国Syngene公司)检测图像灰度值。

1.2.3 免疫组织化学: (1)肝癌组织病理分型: 标本经过HE染色明确诊断并确定病理分型。肝癌病理分型参照Edmondson分级, 将肝癌分为4级: I级: 肿瘤细胞大小一致, 核浆比类似正常肝细胞, 瘤细胞呈细索状排列; II级: 核浆比较I级增大, 瘤细胞呈粗索状或腺管状排列; III级: 核浆比明显失调, 多形性明显, 索状排列紊乱, 无假腺管或胆栓形成; IV级: 核浆比严重失调细胞核大小不一, 胞质量少, 多呈实团状, 索状结构不明显。肿瘤分化介于II-III级或III-IV级之间者, 分别归入III或IV级。35例肝癌中, I级8例, II级9例, III级12例, IV级6例。(2)免疫组织化学检测GADD45 β : 肝组织经梯度解冻, 100 g/L的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4 μ m厚的石蜡切片, HE染色组织学观察。切片经高压热修复, 采用免疫组织化学PV法, DAB显色, 苏木素复染, 无水乙醇脱水, 中性树胶封片。以0.01 mol/L的PBS(pH值为7.5)代替第一抗体作为阴性对照, 以组织中显示棕黄色颗粒为GADD45 β 表达阳性。(3)GADD45 β 阳性判断标准: 以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 作为阳性判断标准, 根据阳性细胞百分率分为阴性(-): 阳性细胞不可见或阳性细胞不足5%;

■相关报道

Qiu *et al*研究发现, 在肝癌细胞株中GADD45 β 呈低表达, 而在正常肝细胞株中则无明显变化。并通过MSP方法检测到在肝癌组织中存在GADD45 β 高水平的甲基化, 而高甲基化状态可能与GADD45 β 的低表达有关。

表 1 部分肝癌中下调表达的基因

UniGene ID	Gene description	CL	Ratio
Hs.75678	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B, FOSB	19q13.32	0.067
Hs.110	solute carrier family 3 member 1, SLC3A1	2p16.3	0.102
Hs.82120	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, NR4A2	2q22-q23	0.198
Hs.25647	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, FOS	14q24.3	0.203
Hs.534337	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4, HLA-DRB4	6p21.3	0.250
Hs.332053	serum amyloid A1, SAA1	11p15.1	0.287
Hs.1395	early growth response 2, EGR2	10q21.1	0.330
Hs.388674	heart alpha-kinase, HAK	18q21.31	0.354
Hs.171695	dual specificity phosphatase 1, DUSP1	5q34	0.366
Hs.414795	serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E member 1, SERPINE1	7q21.3-q22	0.379
Hs.110571	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta GADD45 β	chr19p13.3	0.397
Hs.8364	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4, PDK4	7q21.3-q22.1	0.420
Hs.156637	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c, CBLC	19q13.2	0.435
Hs.177534	dual specificity phosphatase 10, DUSP10	1q41	0.451
Hs.9914	folliculin, FST	5q11.2	0.456
Hs.351344	transmembrane protein 25, TMEM25	11q23.3	0.467
Hs.249441	WEE1 homolog (S. pombe), WEE1	11p15.3-p15.1	0.483
Hs.376206	Kruppel-like factor 4 (gut), KLF4	9q31	0.483

表 2 正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中GADD45 β mRNA的表达

分组	阴性(n)	阳性(n)	阳性 表达率(%)
正常肝组织	4	16	80
肝硬化组织	4	6	60 ^a
肝癌组织	26	9	26 ^b

$\chi^2 = 4.114$, ^a $P < 0.05$ vs 肝癌组织; $\chi^2 = 15.128$, ^b $P < 0.01$ vs 正常肝组织。

弱阳性(+): 阳性细胞散在或为组织细胞的1/3以下; 中度阳性(++): 阳性细胞呈局灶分布, 占全组织细胞1/3-2/3; 强阳性(+++): 阳性细胞呈弥漫分布, 占全组织细胞2/3以上。

统计学处理 应用SPSS10.0进行成组设计资料的 t 检验、 χ^2 检验、fisher's精确检验和Kruskal-wallis非参数检验的统计学处理, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 寡核苷酸基因芯片分析 Affymetrix U133 Plus 2.0基因芯片含19378个已知基因信息, 完全符合质控标准, 通过对其进行生物信息学对比分析, 以正常肝组织为对照比较, 筛选出肝硬化、肝癌差异基因表达谱, 包括原癌基因、抑癌基因、DNA修复基因、细胞信号传导及细胞

■创新盘点

本研究从DNA、mRNA及蛋白水平上, 对正常肝组织、肝硬化组织、肝癌组织中GADD45 β 进行了全面系统的分析, 证明GADD45 β 在肝癌的发展进程中呈下调表达趋势, 并与肝癌的分化程度密切相关。

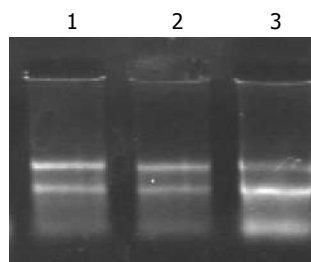


图 1 总RNA琼脂糖凝胶电泳图。

1: 正常肝组织; 2: 肝硬化组织; 3: 肝癌组织。

周期相关基因、代谢酶类相关基因、免疫相关基因、肿瘤相关抗原等。其中, GADD45 β 在肝癌差异基因表达谱中呈现明显下调表达(Ratio值 = 0.397 < 0.5), 而在肝硬化中下调表达则不明显(Ratio值 = 0.955 > 0.5)。部分肝癌下调表达基因见表1。

2.2 RT-PCR分析结果

2.2.1 总RNA提取结果: 正常肝组织、肝硬化组织、肝癌组织总RNA提取结果亦良好, 总RNA的吸光度 A_{260}/A_{280} 值均在1.9-2.0, 电泳结果证实已抽提高纯度的RNA(图1)。

2.2.2 PCR扩增结果: GADD45 β RT-PCR扩增产物电泳图谱显示在相当于202 bp处有DNA片段区带(图2)。内参基因扩增产物显示在309 bp处有DNA片段区带。

三种组织标本中GADD45 β mRNA定性及统计分析结果见表2。目的基因和内参基因同管扩增, 以GAPDH mRNA和GADD45 β mRNA的灰度比值作为统计对象, 进一步行GADD45 β

■应用要点

GADD45 β 在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用, GADD45 β 可以作为肝癌早期诊断的一个候选基因, 研究GADD45 β 下调表达的分子机制, 有望为肝癌提供一种潜在的靶向分子治疗途径。

表 3 正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中GADD45 β 蛋白的表达

标本	n	阳性(%)	GADD45 β 表达强度			
			-	+	++	+++
正常肝组织	20	17(85)	3	1	6	10
肝硬化组织	10	7(70) ^a	3	2	4	1
肝癌组织	35	11(31) ^b	24	7	3	1
合计	65	35	30	10	13	12

$\chi^2 = 4.821$, ^a $P < 0.05$, $\chi^2 = 14.615$, ^b $P < 0.01$ vs 肝癌组织; 三组间 $\chi^2 = 24.619$, $P < 0.01$.

表 4 GADD45 β 表达强度与肝癌组织分化及核分级的关系

分组	n	阳性(%)	Fisher's exact	GADD45 β 表达强度			
				-	+	++	+++
肝癌组织	35	11(31.4)		24	7	3	2
分化程度							
高分化	9	7(77.8)		2	3	3	1
中分化	14	2(14.3) ^b	0.004	12	2	0	0
低分化	12	2(16.7) ^b	0.008	10	2	0	0
Edmendsen分级							
I	8	7(87.5)		1	3	3	1
II	9	2(22.2) ^a	0.018	7	2	0	0
III	12	1(8.3) ^a	0.026	11	1	0	0
IV	6	1(17.0)	0.141	5	1	0	0

^a $P < 0.05$ vs I级; ^b $P < 0.01$ vs 高分化组; $\chi^2 = 13.973$, $P < 0.01$ 肝癌分化程度间比较; $\chi^2 = 17.596$, ^d $P < 0.01$ 肝癌各核分级间比较。

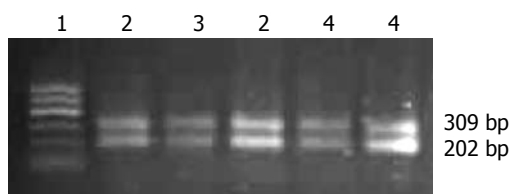


图 2 GADD45 β mRNA阳性表达RT-PCR产物电泳图。1: 100 bp DNA ladder(100–600 bp); 202 bp处为GADD45 β 扩增条带; 309 bp处为内参基因扩增条带; 2: 正常肝组织; 3: 肝硬化组织; 4: 肝癌组织。

mRNA半定量测定. 与正常肝组织相比, 肝硬化组织灰度比值没有明显差异(1.047 ± 0.221 vs 0.940 ± 0.230 , $t = 1.032$, $P > 0.05$), 肝癌组织中则明显下降(1.047 ± 0.221 vs 0.607 ± 0.223 , $t = 4.774$, $P < 0.01$), 肝硬化与肝癌组织相比, 差异亦有显著意义(0.940 ± 0.230 vs 0.607 ± 0.223 , $t = 2.898$, $P < 0.05$).

2.3 免疫组织化学分析

2.3.1 GADD45 β 的阳性表达: GADD45 β 阳性表达物呈棕黄色颗粒, 弥散分布于胞质, 少数细胞

出现胞核着色胞膜未见着色, 不同病例的阳性胞质着色颗粒的大小、分布密度及着色深浅亦有不同(图3). 统计分析显示, GADD45 β 在正常肝组织与肝硬化组织中表达无明显差异, 在肝癌组织中呈现明显低表达($P < 0.05$), 且在3种组织中GADD45 β 蛋白阳性表达程度有显著差异($P < 0.01$).

2.3.2 GADD45 β 表达强度与肝癌临床病理特征的关系: 35例肝癌组织中24例缺乏GADD45 β 表达, 其中22例为中、低分化肝癌, GADD45 β 在高分化肝癌组中的表达明显高于中、低分化组($P < 0.01$); 在核分级较高组亦缺乏GADD45 β 表达, Edmendsen II、III分级中GADD45 β 表达明显低于Edmendsen I级($P < 0.05$). 应用Kruskal-Wallis非参数检验方法显示, 不同分化程度以及不同核分级的肝癌组织GADD45 β 表达强度均有显著差异($P < 0.01$, 表4).

3 讨论

肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 位

居全球恶性肿瘤发病率第5位^[4], 死因第3位; 其发病率和死亡率有逐年上升趋势. 肝脏是机体重要的解毒器官, 肝细胞承受着来自化学物质、病毒感染及代谢废物的负荷, 很容易出现细胞增殖恶变, 虽然有关肝癌的发病机制研究取得了一些进展, 但有关DNA损伤及修复问题仍然有待进一步阐明.

GADD45是细胞和DNA损伤的应激基因, 与DNA损伤修复有重要相关, GADD45基因家族是P53、BRCA1调控的下游基因, 现已发现GADD45 α , GADD45 β /MYD118, GADD45 γ /OIG37/CR6/GRP17三个成员, 能够在多种DNA损伤因素包括电离辐射、紫外线、甲基甲磺酸(MMS)、羟基脲等作用下, 随着DNA修复途径的启动而诱导产生. GADD45 β 基因最初是通过IL-6对小鼠髓样细胞性白血病的细胞株M1终末分化诱导后所产生的髓样分化反应基因^[5], GADD45 β 具有GADD45基因家族的共有功能, 即主要调节控制细胞的增生、监测细胞周期、诱导细胞凋亡、调控细胞的负性生长^[2]. 研究发现GADD45 β 编码的核蛋白能与其他蛋白如PCNA, p21、核组蛋白、MTK1/MEKK4激酶以及Cdk1等相互作用^[6-7], 并参与多种信号通路的调节, 在NF- κ B^[8-9]、p38/JNK^[10-11]、Foxo^[12]等的通路中发挥作用, 通过信号通路间的交叉对话(cross talk)行使生物学功能, 参与DNA的损伤修复, 实现其负性生长调节.

我们应用含有19 378个已知基因的寡核苷酸芯片筛选出肝硬化及肝癌差异基因表达谱, 从中发现GADD45 β 在肝癌组织中是一个明显低表达基因. 通过GADD45 β mRNA定性、半定量以及蛋白测定证明正常肝与肝硬化组织中GADD45 β 表达阳性率无明显差异, 肝癌组织GADD45 β 表达明显降低($P<0.05$); 且其表达与肝癌的多种临床病理学特征相关($P<0.05$): 高分化组GADD45 β 蛋白表达明显强于中、低分化组; Edmendsen I级肝癌组织GADD45 β 蛋白表达较强; 核分级程度越高, GADD45 β 蛋白表达越弱. GADD45 β 的表达有随肿瘤分化程度降低和核分级增高而降低的趋势. RT-PCR和免疫组织化学二者相互印证, 并与基因芯片结果一致. 因此, GADD45 β 是与肝癌基因DNA损伤修复有着密切联系的特异分子标志, 与肝癌的发生发展密切相关.

本研究从mRNA及蛋白水平上, 对正常肝组织、肝硬化组织、肝癌组织中GADD45 β 进

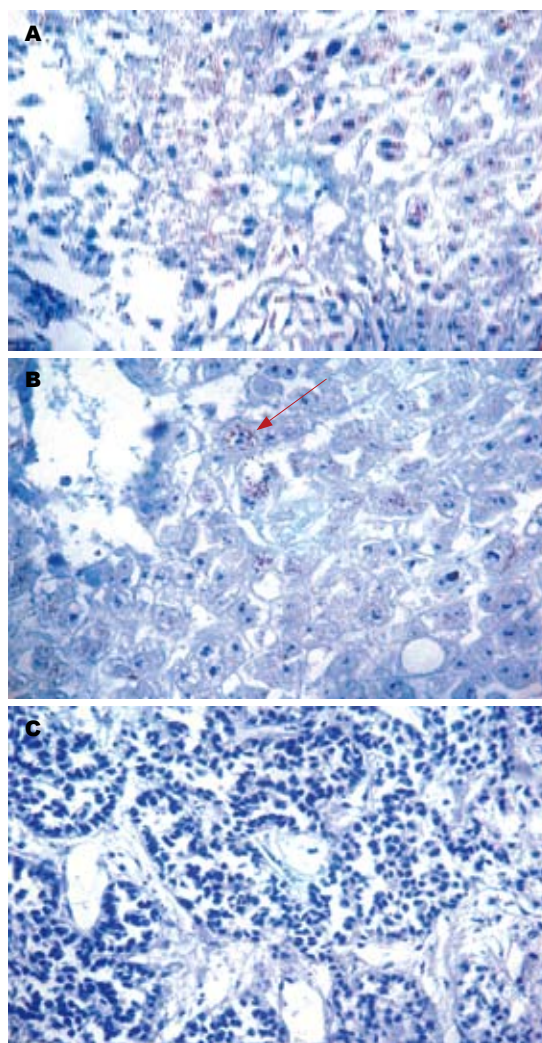


图3 肝组织GADD45 β 阳性细胞($\times 200$). A: 正常肝组织; B: 肝硬化组织; C: 肝癌组织.

行了全面系统的分析, 证明GADD45 β 在肝癌的发展进程中呈下调表达趋势, 并与肝癌的分化程度有密切的关系. Qiu *et al*^[13]利用基因芯片、定量PCR等多种实验方法研究发现, 在人类肝癌细胞株HepG2和Hep3B中GADD45 β 中低表达, 而在正常人肝细胞株CL-48中表达水平没有明显变化, 在结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤和平滑肌肉瘤等其他肿瘤中, GADD45 β 也无明显变化. 这与本研究结果基本相符, 说明GADD45 β 在肝癌中呈特异性缺失. GADD45 β 是一个损伤修复因子, 参与监测细胞周期和诱导凋亡, 其低表达意味着损伤修复功能的缺陷, 以及随之而来的对细胞生长不利的反常转录调节, 随着损伤修复缺陷的累积, 癌基因的高表达, 将会导致细胞增殖恶变.

Qiu *et al*^[14]通过MSP(methylation-specific PCR)方法, 检测到在肝细胞癌组织中存在

■名词解释

DNA甲基化(methylation): 哺乳动物基因组中5%的C为甲基化(mC), mC主要存在于CpG二核苷酸序列中; CpG二核苷酸序列常成簇聚集并零散地分布于人基因组中, 形成CpG岛(CpG islands), 人基因组中约每10 kb就有一个CpG岛, CpG岛常与基因相连(可作为寻找基因的标记). DNA甲基化有转录抑制作用, 基因表达与甲基化呈负相关.

■同行评价

本文提出GADD45 β 可以作为肝癌早期诊断的一个候选基因,并为肝癌提供一种潜在的靶向治疗途径,对于研究肝癌的发病机制有一定的理论价值。

GADD45 β 高水平的甲基化,而在CL-48正常细胞株中甲基化则不甚明显。在GADD45 β 启动子区富含CpG岛,存在高水平的甲基化,而基因表达与甲基化呈负相关,此高甲基化状态可能与GADD45 β 的低表达有关。DNA甲基化是一种酶相关性化学修饰,多发生在CpG二核苷酸中,GADD45 β 基因启动子区的甲基化会影响转录因子的结合,从而影响基因的正常转录,导致正常基因表达抑制。富含CpG岛的区域高甲基化可能会导致肿瘤发生过程中特异基因的失活^[15],甲基化状态异常在肿瘤发展中的作用已受到日益广泛的重视,这种异常主要包括抑癌基因高甲基化和癌基因的低甲基化,前者使抑癌基因表达受到抑制,而后者则使癌基因表达上调。作为抑癌基因,GADD45 β 的高甲基化显然也于肝癌的发生发展相关,这也是我们下一步要研究的问题之一。此外,许多研究表明,细胞内信息传递中的某些障碍与肿瘤发生有关,这些控制细胞增殖、分化的信息传递通路中某一环节的异常都可以引起细胞生长失控,最终导致肿瘤形成^[10]。GADD45 β 参与多种信号通路的调节,其表达缺失,很可能会造成信号通路异常,扰乱正常的细胞周期和细胞凋亡,从而导致肿瘤发生。

本研究提示GADD45 β 在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用,GADD45 β 可以作为肝癌早期诊断的一个候选基因,研究GADD45 β 下调表达的分子机制,有望为肝癌提供一种潜在的靶向分子治疗途径。

4 参考文献

- 1 Kao JH, Chen DS. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int* 2005; 25: 696-703
- 2 Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 146-153
- 3 Su LJ, Ding GW, Yang ZL, Zhang SB, Yang YX, Xu CS. Expression patterns and action analysis of genes associated with hepatitis virus infection during rat liver regeneration. *World J Gastroenterol*

- 2006; 12: 7626-7634
- 4 Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004; 23: 6329-6340
- 5 Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 1991; 6: 165-167
- 6 Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 1998; 95: 521-530
- 7 Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, Fornace AJ Jr. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3705-3714
- 8 Jin R, De Smaele E, Zazzeroni F, Nguyen DU, Papa S, Jones J, Cox C, Gelinas C, Franzoso G. Regulation of the gadd45beta promoter by NF-kappaB. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 491-503
- 9 Qiu W, Zhou B, Chu PG, Luh F, Yen Y. The induction of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 beta in human hepatoma cell lines by S-adenosylmethionine. *Am J Pathol* 2007; 171: 287-296
- 10 Gupta M, Gupta SK, Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem* 2006; 281: 17552-17558
- 11 Papa S, Zazzeroni F, Fu YX, Bubici C, Alvarez K, Dean K, Christiansen PA, Anders RA, Franzoso G. Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest* 2008; 118: 1911-1923
- 12 Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 2005; 16: 237-243
- 13 Qiu W, David D, Zhou B, Chu PG, Zhang B, Wu M, Xiao J, Han T, Zhu Z, Wang T, Liu X, Lopez R, Frankel P, Jong A, Yen Y. Down-regulation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45beta expression is associated with human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 162: 1961-1974
- 14 Qiu W, Zhou B, Zou H, Liu X, Chu PG, Lopez R, Shih J, Chung C, Yen Y. Hypermethylation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 beta promoter in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2004; 165: 1689-1699
- 15 Gupta M, Gupta SK, Balliet AG, Hollander MC, Fornace AJ, Hoffman B, Liebermann DA. Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; 24: 7170-7179

编辑 李军亮 电编 何基才

肝癌射频消融后针道出血防治21例

翟博, 徐爱民, 盛月红, 刘晟, 李晓燕, 陈夷

翟博, 盛月红, 刘晟, 李晓燕, 陈夷, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院超声介入科 上海市 200438
徐爱民, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院放射介入科 上海市 200438

通讯作者: 陈夷, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院超声介入科. chenys7@sina.com
电话: 021-25074927

收稿日期: 2008-02-12 修回日期: 2008-06-15

接受日期: 2008-06-22 在线出版日期: 2008-07-28

Prevention and treatment of needle-tract bleeding after percutaneous radiofrequency ablation for liver cancer: an analysis of 21 cases

Bo Zhai, Ai-Min Xu, Yue-Hong Sheng, Sheng Liu, Xiao-Yan Li, Yi Chen

Bo Zhai, Yue-Hong Sheng, Sheng Liu, Xiao-Yan Li, Yi Chen, Department of Ultrasonic Intervention, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China
Ai-Min Xu, Department of Radiation Intervention, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Correspondence to: Yi Chen, Department of Ultrasonic Intervention, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China. chenys7@sina.com

Received: 2008-02-12 Revised: 2008-06-15

Accepted: 2008-06-22 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To investigate the risk factors, prevention and treatment of needle-tract bleeding after percutaneous image-guided radiofrequency ablation (PRFA) for hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: A total of 1567 patients with liver cancer received PRFA therapy for 2035 sessions between December, 1999 and October, 2007. The data of patients suffered from needle-tract bleeding were recorded.

RESULTS: Needle-tract bleeding developed in 21 patients, who firstly received medicine therapy to control bleeding. Of 6 patients only used medicine therapy, 4 cases were successful and 2 cases died. In the other 15 patients, 3 cases

directly received surgery and 12 cases received transcatheter embolization. Thirteen patients were treated successfully and 2 cases died. The rate of success for controlling bleeding was 81.0% (17/21), and the rate of bleeding-induced death was 19.0% (4/21). The rate of needle-tract bleeding significantly correlated with the degree of liver cirrhosis, lower platelet count, obvious prolongation of prothrombin time and subcapsular HCC ($OR = 4.33, 6.31, 7.66, 7.91; P = 0.008, 0.32, 0.000, 0.027$).

CONCLUSION: This study demonstrates that obvious prolongation of prothrombin time, lower platelet count, subcapsular HCC and pattern of RF needle electrode influence the needle-tract bleeding after PRFA for HCC. The most effective method to control the bleeding is transcatheter embolization.

Key Words: Radiofrequency ablation; Hepatocellular carcinoma; Needle-tract bleeding; Prevention

Zhai B, Xu AM, Sheng YH, Liu S, Li XY, Chen Y. Prevention and treatment of needle-tract bleeding after percutaneous radiofrequency ablation for liver cancer: an analysis of 21 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2423-2427

摘要

目的: 探讨肝脏肿瘤射频消融后针道出血的影响因素、预防和处理方法。

方法: 回顾性总结1999-12/2007-10我院1567例肝癌患者2035次射频消融治疗资料, 分析射频消融后21例针道出血的原因。

结果: 21例针道出血患者中, 6例仅接受内科药物止血, 4例成功, 2例死亡。其余15例内科药物止血无效后3例直接行剖腹探查, 均成功止血; 12例经股动脉穿刺行肝动脉造影, 共13例存活, 2例死亡。治疗成功率81.0%(17/21), 出血所致死亡率19.0%(4/21)。射频前肝硬化重、血小板低于正常、PT明显延长以及位于包膜下者更容易发生射频后针道出血($OR = 4.33, 6.31, 7.66, 7.91; P = 0.008, 0.32, 0.000, 0.027$)。

■背景资料

目前, 射频消融等局部微创治疗某种程度上已成为原发性肝癌(尤其是小肝癌)患者外科手术的良好补充和替代。射频消融治疗疗效好、创伤小、并发症少而轻。尽管如此, 射频消融后仍常发生一些较严重并发症, 如针道出血。

■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院

■创新盘点

本文通过总结21例射频消融后发生针道出血的原发性或继发性肝癌患者的治疗资料,较系统地探讨了发生射频消融后针道出血的影响因素、预防和处理方法。

结论:对于存在严重肝硬化、凝血机制障碍、位于包膜下等针道出血高危因素者应严格把握适应证,射频后密切观察病情。DSA下血管封堵或外科手术止血是伴有肝硬化患者射频消融后针道出血安全而有效的方法。

关键词: 射频消融; 肝癌; 针道出血; 预防

翟博, 徐爱民, 盛月红, 刘晟, 李晓燕, 陈夷. 肝癌射频消融后针道出血防治21例. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2423-2427

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2423.asp>

0 引言

近年来,随着射频消融在肿瘤治疗中的广泛应用,有关术后并发症的报道越来越多。由于射频消融后针道出血等严重并发症可导致患者死亡,因此其预防和治疗非常重要。目前对肝脏肿瘤射频后针道出血的研究还比较肤浅,大都限于简单的病例报道,未能对其影响因素及预防和处理措施进行系统探讨^[1]。鉴于此,我们总结1999-12/2007-12我院1567例肝癌患者实施的2035次射频消融的治疗资料,分析21例射频消融后针道出血患者的发生原因,并总结预防和处

1 材料和方法

1.1 材料 1999-12/2007-12我院射频消融治疗肝癌患者1567例,年龄9-84(平均 53.7 ± 4.2)岁。先后或分别采用了RF2000型射频消融系统(Radiotherapeutic Corp, USA)、cool-tip射频消融系统(Valleylab Corp, USA)和HITT注水射频消融系统(Berchtold Corp, German)。不同射频消融系统配备相应射频电极针。

1.2 方法 3例为腹腔镜下穿刺,25例经开腹途径,5例采用CT引导下的经皮穿刺,其余病例均采用B超引导下的经皮途径。麻醉主要采用局麻(必要时加静脉麻醉剂),肿瘤较多、较大者可采用硬膜外麻醉,极少数患者采用全麻。麻醉前30 min静脉推注止血药和止吐药。取下列10个指标作为可能影响消融后针道出血的因素:性别、年龄、肝硬化程度、血小板数量、凝血酶原时间、肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤数目、射频次数以及应用的射频针类型。

统计学处理 采用SPSS14.0软件统计,配对资料应用 χ^2 检验行单因素分析,有统计学意义者进一步行Logistic多因素回归分析。 $P < 0.05$ 定义为相差显著。

2 结果

1567例肝癌患者实施2035次射频消融治疗,其中单次消融1221例,消融2次以上346例。原发性肝癌1203例1531次,转移性肝癌364例504次。肿瘤单发者1087例1447次,多发者480例588次,共消融肿瘤4245个肿瘤最大直径 $0.6-9.3$ (平均 4.6 ± 0.63) cm,患者详细资料见表1。

2.1 射频消融后出血的一般概况 2035次射频消融后共有23例患者发生出血,其中胃底食管下段曲张静脉破裂出血2例,与穿刺损伤有关的针道出血21例(胆道出血3例,腹腔内出血18例)。射频消融后出血总发生率为1.13%(21/2035),针道出血发生率1.03%(21/2035)。21例针道出血患者经治疗后17例恢复,4例死亡,治疗成功率81.0%(17/21),出血后死亡率为19%(4/21)。与针道出血有关的患者死亡率为0.19%(4/2035)。

2.2 针道出血的相关因素 对引起射频后针道出血的可能因素统计分析表明,射频前肝功能差、血小板低于正常、PT明显延长、位于包膜下及使用注水式射频电极者更容易发生射频后针道出血(分别为 $P = 0.029, 0.028, 0.003, 0.013$ 和 0.009 ,表1)。将上述5个影响因素进一步行Logistic多因素回归分析,显示血小板数量、凝血酶原时间、肝硬化程度和肿瘤部位为射频消融后针道出血的独立危险因素,分别为血小板数量($r = 6.31, P = 0.032$),凝血酶原时间($r = 7.66, P = 0.000$),肝硬化程度($r = 4.33, P = 0.008$)及肿瘤部位($r = 7.91, P = 0.027$,表2)。

2.3 针道出血的处理及结果 3例胆道出血患者首先接受内科处理,1例出血较轻者成功止血。另2例患者内科处理后仍反复出现鲜血便,生命体征不稳,即行经股动脉肝动脉穿刺造影,1例证实为消融灶内动脉血管破裂,予明胶海绵封堵后成功止血;另1例考虑小静脉破裂出血,继续保守处理后止血。18例腹腔内出血中,5例因各种原因仅接受内科保守处理,3例出血量程度较轻,内科处理后成功止血;2例肝硬化程度较重,出血迅猛,保守治疗后生命体征极差,合并多脏器功能衰竭死亡。18例腹腔出血中的3例内科处理后未能止血,直接行剖腹探查,2例缝扎止血,1例局部病灶切除,均恢复。18例腹腔出血中的10例内科处理无效后首先经股动脉穿刺行肝动脉造影,8例发现消融灶内动脉破裂点和/或针道出血点,给予明胶海绵封堵后成功止血,1例再次出血死亡;其余2例DSA下未见明显出血点,即行剖腹探查,1例发现出血位于膈下腹壁壁层,

表 1 射频消融后针道出血患者的临床资料

项目		<i>n</i>	出血患者	出血率(%)	χ^2	<i>P</i> 值
性别	男	1420	16	1.13	0.406	0.524
	女	615	5	0.81		
年龄	>60	489	7	1.43	0.983	0.321
	<60	1546	14	0.91		
肝功能分级	A	1840	15	0.82	8.497	0.004
	B	195	6	3.08		
肿瘤类型	原发性	1567	17	1.08	0.183	0.669
	继发性	468	4	0.85		
血小板数量	正常	872	4	0.46	4.816	0.028
	异常	1163	17	1.47		
PT	正常	955	3	0.32	8.901	0.003
	异常	1080	18	1.67		
肿瘤大小(cm)	<3	2874	15	0.52	0.440	0.802
	3-5	1296	6	0.46		
	>5	75	0	0.00		
肿瘤部位	肝实质内	1161	9	0.78	12.737	0.013
	空腔脏器附近	213	2	0.94		
	肝门部	371	2	0.54		
	包膜下	203	7	3.45		
	膈顶部	87	1	1.15		
肿瘤数目	单发	1447	14	0.97	0.199	0.655
	多发	588	7	1.19		
射频次数	首次	1221	15	1.23	1.132	0.287
	再次	814	6	0.74		
射频消融系统	Cool-tip	146	1	0.68	9.446	0.009
	RF2000	1475	10	0.68		
	HITT	414	10	2.42		

■应用要点

本研究总结了肝癌射频消融后发生针道出血的相关因素分别为严重肝硬化、凝血机制障碍和肿瘤位于包膜下等。针道出血高危因素者应严格把握适应症,射频后密切观察病情,DSA下血管封堵或外科手术止血是伴有肝硬化患者射频消融后针道出血安全而有效的方法,应作为止血的首选。对于存在较严重肝硬化者切忌过度依赖药物止血。

系穿刺损伤静脉所致,给予缝扎后止血,另1例仍未找到出血部位术后2 d死亡。

2.4 射频消融后针道出血的处理原则 通过21例射频后针道出血患者的处理,初步总结射频消融后针道出血的止血方式选择和后续处理原则(图1)。

3 讨论

既往报道,肝癌射频消融后出血的发生率约在0%-3.58%之间^[2-11]。这可能与3个因素有关:(1)不同报道中病例数量各异;(2)未将原发性肝癌与转移性肝癌分别考察;(3)未将针道出血和非针道出血区别统计。总结既往报道及我们的资料,肝癌射频消融后出血可分为2种类型:非针道出血和针道出血。前者主要是胃底食管下段静脉曲张破裂出血,后者最常见的有腹腔内出血和胆道出血。针道出血构成了射频消融后出血的主体(本研究占91.3%, 21/23)。

转移性肝癌极少存在肝硬化,肝组织结构

表 2 射频消融后针道出血的多因素Logistic回归分析

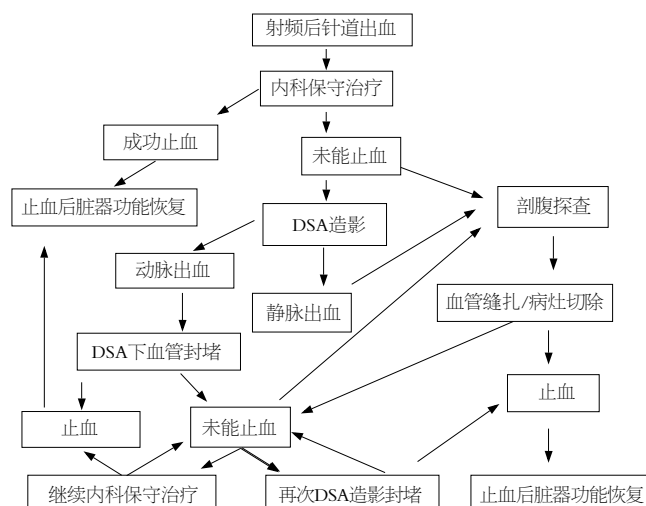
项目	<i>OR</i>	<i>P</i> 值	95% CI
血小板数量	6.31	0.032	6.72-11.23
凝血酶原时间	7.66	0.000	6.50-10.27
肿瘤部位	7.91	0.027	3.82-12.56
肝硬化	4.33	0.008	3.03-8.37

正常,自限性止血能力较强,射频后出血均为射频针损伤针道血管(多为较粗血管)所致。原发性肝癌大多伴有不同程度肝硬化,射频后出血有2种情况:(1)长期门脉高压形成胃底食管下段静脉曲张,射频消融直接刺激或术后呕吐等反应诱发静脉曲张破裂出血;(2)肝硬化后凝血因子合成障碍、肝组织弹性减退、脾功能亢进致血小板减少等因素,使肝脏血管损伤破裂后自限性止血能力减退或丧失,穿刺中即使损伤较细血管也更易发生针道出血。我们的研究也证实了上述推断。排除射频的操作因素,血小板明显

同行评价

本文实用性尚可, 内容条理分明, 具有一定的学术价值.

图 1 肝癌射频消融后出血处理方式选择原则.



低于正常、PT明显延长的肝癌患者发生针道出血的可能性远高于血小板正常或轻度降低以及PT值正常或轻度延长者。

然而本研究结果发现, 原发性和继发性肝癌射频后针道出血的总体发生率并无明显差异, 但从肝功能分级角度统计分析, Child-Pugh A级患者射频后针道出血风险显著低于B级。这一看似矛盾的结果可能是由于下列原因: 继发性肝癌均为Child-Pugh A级, 原发性肝癌则包括了Child-Pugh A级和B级两种情况, 但以A级为主, 因此将原发与继发性肝癌放在一起讨论与按照肝功能分级进行讨论可能会得出不同的结果。然而由我们的结果至少可以推断出两个论断: (1)存在明显肝硬化(Child-Pugh B级)的原发性肝癌患者比没有肝硬化的继发性肝癌或肝硬化较轻(Child-Pugh A级)的原发性肝癌更容易发生射频后针道出血。(2)在同等熟练程度穿刺操作下, 与肝硬化程度有关的凝血机制障碍(PT值和血小板数量异常)又是针道出血的重要决定因素。

肝癌外科切除后腹腔出血较常见, 术中血管结扎不牢是最常见原因之一^[12-13]。与之相似, 穿刺道血管损伤破裂也是射频后针道出血的先决条件, 因此只有提高操作技术才是预防针道出血的最根本环节。另外, 本研究证实肝硬化程度、凝血机制障碍及肿瘤部位(位于包膜下, 尤其外生性生长者)是射频后针道出血的非操作性影响因素, 因此最大限度预防射频消融后针道出血必须重点注意以下几点: (1)熟悉肝脏解剖, 穿刺中必须避开较粗血管。穿刺要尽量一步到位, 减少因反复穿刺带来的血管破裂风险。(2)肝硬化过重、PT过长者应通过保肝、注射维生素K1等处理, 使PT至少降至16 s以内, 并且射频

前后应用凝血酶原复合物。对于血小板过低者, 可通过药物或输血小板, 使之至少达到4万以上^[14-18]。(3)位于包膜下、尤其突出于包膜以外(外生性生长)的肝癌, 必须选择合理的穿刺路线。切忌透过腹壁直接肿瘤穿刺, 最好到达肿瘤前有一段正常的非瘤性组织穿刺道。(4)射频消融后必须烧灼针道后拔针。(5)存在较明显凝血机制障碍者可经针道填塞明胶海绵等止血物。

相比转移性肝癌, 伴有较严重肝硬化的原发性肝癌患者对针道大量出血打击的耐受力明显较弱, 出血后处理面临的矛盾较多, 对止血方式的选择限制更大。大量输液、输血和药物应用等抢救措施往往进一步加重肝脏损害, 甚至诱发多脏器功能衰竭, 即使出血能够控制, 后续恢复也存在更多变数, 死亡风险更大。本研究中4例死亡病例即为肝硬化较重的原发性肝癌患者。

对伴有严重肝硬化的原发性肝癌患者, 我们重点强调以下几个方面: (1)射频前存在凝血机制障碍者, 射频后必须密切观察病情变化, 尤其对脉搏的监测。如高度怀疑发生针道出血, 应紧急查血常规和腹部B超; 如腹腔出现积液, 应立即腹腔穿刺。(2)确诊发生腹腔出血后, 无论出血量多少均应快速备血并行深静脉穿刺置管。(3)由于较粗血管破裂, 尤其伴有肝硬化的针道出血通常难以经药物控制, 因此如内科处理效果不佳, 应当机立断行肝动脉造影、DSA下封堵止血。这是效果最好、损伤最轻、最适合肝硬化较重患者的处理方法, 其疗效已被我们及Carrafiello *et al*^[4]所证实。(4)如DSA下止血未果, 继续保守处理仍无效, 则应尽快开腹行缝扎止血或病灶切除。有人担心伴有肝硬化情况下开腹手术风险太大, 因而很难下此决心。其实此类

患者完全能够承受开腹血管缝扎止血或局灶切除(而不是大块肝切除), 况且其他方式止血无效后患者注定会发生死亡, 外科止血尚有一线生机。明知保守治疗生机渺茫还机械等待奇迹出现的做法是不负责任也不可取的。我们有2例出血患者即因前怕狼后怕虎, 延误了最佳时机而最终死亡, 教训深刻。(5)出血控制、患者生命体征稳定后应尽早开始后续处理。比如利尿以减轻心脏负担, 控制腹水形成, 保护肝肾功能等。同时必须严密观察肝功能、电解质、血气和肾功能变化, 防止酸碱平衡紊乱、肝肾综合征及多脏器功能衰竭的发生。

总之, 预防肝癌射频消融后针道出血的关键在于严格把握适应证, 而出血后处理的关键在于快速判断、把握时机。值得强调的是, 射频消融仅是肿瘤治疗的一个选项而已, 并非唯一选择, 必须时刻把安全放在第一位。

4 参考文献

- 1 陈敏华, 严昆, 戴莹, 杨薇, 步召德, 武爱文, 顾晋. 肝肿瘤经皮射频消融治疗中腹腔出血的处理—附3例临床报告. *中华外科杂志* 2004; 17: 1083-1084
- 2 Poggi G, Riccardi A, Quaretti P, Teragni C, Delmonte A, Amatu A, Saini G, Mazzucco M, Bernardo A, Palumbo R, Canto A, Bernieri S, Bernardo G. Complications of percutaneous radiofrequency thermal ablation of primary and secondary lesions of the liver. *Anticancer Res* 2007; 27: 2911-2916
- 3 Chen MH, Yang W, Yan K, Hou YB, Dai Y, Gao W, Zhang H, Wu W. Radiofrequency ablation of problematically located hepatocellular carcinoma: tailored approach. *Abdom Imaging* 2008; 33: 428-436
- 4 Carrafiello G, Laganà D, Ianniello A, Craparo G, Recaldini C, Lumia D, Dionigi G, Cuffari S, Fugazzola C. Bleeding after percutaneous radiofrequency ablation: Successful treatment with transcatheter embolization. *Eur J Radiol* 2007; 61: 351-355
- 5 Chen MH, Yan K, Yang W, Gao W, Dai Y, Huo L, Zhang H, Huang XF. [Long term (5 years) outcome of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma in 256 cases] *Beijing DaXue XueBao* 2005; 37: 671-672
- 6 Chen MH, Yan K, Yang W, Gao W, Dai Y, Wang YB, Zhang H, Huo L, Xing BC, Huang XF. [Efficacy of radiofrequency ablation of 343 patients with hepatic tumor and the relevant complications] *Beijing Daxue Xuebao* 2005; 37: 292-296
- 7 Hänsler J, Frieser M, Schaber S, Kutschall C, Bernatik T, Müller W, Becker D, Hahn EG, Strobel D. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma with a saline solution perfusion device: a pilot study. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: 575-580
- 8 Machi J, Uchida S, Sumida K, Limm WM, Hundahl SA, Oishi AJ, Furumoto NL, Oishi RH. Ultrasound-guided radiofrequency thermal ablation of liver tumors: percutaneous, laparoscopic, and open surgical approaches. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 477-489
- 9 Wood TF, Rose DM, Chung M, Allegra DP, Foshag LJ, Bilchik AJ. Radiofrequency ablation of 231 unresectable hepatic tumors: indications, limitations, and complications. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 593-600
- 10 Hildebrand P, Kleemann M, Roblick UJ, Mirow L, Birth M, Leibecke T, Bruch HP. Radiofrequency-ablation of unresectable primary and secondary liver tumors: results in 88 patients. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 118-123
- 11 Yamamoto T, Kubo S, Hirohashi K, Tanaka S, Uenishi T, Ogawa M, Sakabe K, Hai S, Yamamoto S, Shuto T, Tanaka H, Kinoshita H. Secondary hemocholecyst after radiofrequency ablation therapy for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2003; 38: 399-403
- 12 潘泽亚, 吴伯文, 黄罡, 傅思远, 李爱军, 周伟平, 吴孟超. 肝癌切除术并发大出血的防治. *第二军医大学学报* 2008; 29: 115-116
- 13 杨广顺, 卢军华. 肝切除术中出血和术后并发症的防治. *肝胆胰外科杂志* 2001; 3: 113-114
- 14 Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Lera J, Bartolozzi C. Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology* 2005; 234: 961-967
- 15 Buscarini E, Savoia A, Brambilla G, Menozzi F, Reduzzi L, Strobel D, Hänsler J, Buscarini L, Gaiti L, Zambelli A. Radiofrequency thermal ablation of liver tumors. *Eur Radiol* 2005; 15: 884-894
- 16 Pawlik TM, Izzo F, Cohen DS, Morris JS, Curley SA. Combined resection and radiofrequency ablation for advanced hepatic malignancies: results in 172 patients. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 1059-1069
- 17 Yu HC, Cheng JS, Lai KH, Lin CP, Lo GH, Lin CK, Hsu PI, Chan HH, Lo CC, Tsai WL, Chen WC. Factors for early tumor recurrence of single small hepatocellular carcinoma after percutaneous radiofrequency ablation therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1439-1444
- 18 Raut CP, Izzo F, Marra P, Ellis LM, Vauthey JN, Cremona F, Vallone P, Mastro A, Fornage BD, Curley SA. Significant long-term survival after radiofrequency ablation of unresectable hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 616-628

编辑 李军亮 电编 何基才

胰蛋白酶原基因新突变胰腺炎患者的临床分子生物学特征

郜峰, 肖肖, 庄则豪, 刘奇才

■背景资料

胰腺炎是一种危害人类健康的常见疾病, 近几年来发病率呈上升趋势, 其个体易感性与基因的遗传多态性有关, 而且基因遗传多态影响着病情的发展. 胰蛋白酶原基因 (PRSS1) 是目前少数明确与胰腺炎发病相关的基因之一.

郜峰, 福建医科大学附属第一医院病理科 福建省福州市 350005
肖肖, 刘奇才, 福建医科大学基因诊断研究室 福建省福州市 350005
庄则豪, 福建医科大学附属第一医院消化科 福建省福州市 350005
作者贡献分布: 基因扩增和序列分析由郜峰与肖肖完成; 临床病例收集由庄则豪完成; 刘奇才进行指导和质量把关.
通讯作者: 刘奇才, 350005, 福建省福州市茶中路20号, 福建医科大学附属第一医院检验科. lqc673@yahoo.com.cn
电话: 0591-87982327
收稿日期: 2008-06-24 修回日期: 2008-07-10
接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-07-28

Clinical and molecular characteristics of pancreatitis patients with novel mutation of protease serine 1 gene

Feng Gao, Xiao Xiao, Ze-Hao Zhuang, Qi-Cai Liu

Feng Gao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Xiao Xiao, Qi-Cai Liu, Department of Gene Diagnosis, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Ze-Hao Zhuang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Liu Qi-Cai, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, 20 Chazhong Road, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. lqc673@yahoo.com.cn
Received: 2008-06-24 Revised: 2008-07-10
Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To analyze the mutation of protease serine 1 (PRSS1) gene in patients with chronic pancreatitis (CP).

METHODS: The general data of one female CP patient were collected, and the PRSS1 gene were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and then sequenced. Meanwhile, the related literatures were retrospectively analyzed in order to investigate the pathogenic mechanism.

RESULTS: We found c.369 C→T mutation in exon 3 of PRSS1 gene and this mutation resulted in an amino change (p.141 Ala→Pho). There was

no difference in the enzyme spectrum (AMY, LIPA and CRP) between this female patient and general CP patients.

CONCLUSION: The mutation of c.369 C→T in PRSS1 gene may be related to CP.

Key Words: Protease serine 1; Mutation; Pancreatitis

Gao F, Xiao X, Zhuang ZH, Liu QC. Clinical and molecular characteristics of pancreatitis patients with novel mutation of protease serine 1 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2428-2430

摘要

目的: 分析1例胰蛋白酶原基因新突变慢性胰腺炎患者的分子生物学特征.

方法: 收集患者的一般资料, 并对胰腺炎易感基因-胰蛋白酶原基因 (protease serine 1, PRSS1) 进行PCR扩增, 纯化后直接测序. 进行文献回顾, 初步分析其发病原因.

结果: 慢性胰腺炎患者的胰蛋白酶原基因3号外显子区存在c.369C→T突变为杂合性突变, 造成p.141 Ala→Pho. 携带胰蛋白酶原基因突变的胰腺炎患者与普通的胰腺炎患者具有一样的胰腺酶谱规律.

结论: PRSS1基因3号外显子的c.369C→T杂合性突变与胰腺炎有关.

关键词: 胰蛋白酶原基因; 突变; 胰腺炎

郜峰, 肖肖, 庄则豪, 刘奇才. 胰蛋白酶原基因新突变胰腺炎患者的临床分子生物学特征. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2428-2430
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2428.asp>

0 引言

胰腺炎近年来发病率呈上升趋势^[1], 发病率为10-70/10万人, 其中重症胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 病死率可高达15%-20%^[2], 严重

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

威胁我国人民的健康。西方及亚太大多数国家的胰腺炎与嗜酒有关,而在我国是以胆道疾病为主要原因,其他病因有胰酶自身消化、细菌感染、白细胞过度激活和血循环障碍等。随着研究的进展,基因遗传背景在胰腺炎病因中的作用日益受到人们的关注,基于此我们对胰腺炎患者的胰蛋白酶原基因进行全长测序,发现1例胰蛋白酶原基因新突变位点的慢性胰腺炎病例,现报道如下^[7-9]。

1 材料和方法

1.1 材料 患者,女,22岁,以“持续性腹痛,进食后加剧”为主诉收治入院。胰腺炎的诊断标准:(1)上腹痛反复发作、胰区有压痛或触及包块、胰腺功能检查、胰腺影像学检查有阳性发现者;(2)有明显的胰腺钙化灶或结石;(3)有胰腺组织学变化。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取:知情同意后,取胰腺炎患者和三例健康人的外周血2 mL,EDTA抗凝。用Biosping公司生产的试剂盒提取DNA,按使用说明书操作。

1.2.2 PCR引物及PCR反应:采用自行设计的引物上游引物5'-GGTCCTGGGTCTCATACCTT-3',下游引物5'-GGGTAGGAGGCTTCACACTT-3',PCR反应体积为50 μ L,含1 μ L样品DNA,上游引物0.4 μ L,下游引物0.4 μ L,1 μ L dNTP,10 $\times$ PCR缓冲液5 μ L,4 μ L Mg^{2+} ,1 U Tag酶,在PE9700热循环仪上94 $^{\circ}$ C 5 min预变性后,94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 52 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 7 min,循环30次。

1.2.3 PCR产物纯化和回收:使用Tiangen公司胶回收试剂盒,按使用说明操作,回收产物。

1.2.4 测序:PCR产物直接测序由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2.5 临床资料收集:收集该胰腺炎患者不同时期血糖(GLU),急性时相反应蛋白(CRP),血淀粉酶(AMY),血清脂肪酶(LIPA),甘油三酯(TG),糖类抗原(CA19-9)。记录其他临床一般资料(年龄、性别、发病年龄、病程、并发症及治疗情况)。

2 结果

2.1 DNA序列分析 对PCR产物进行DNA测序。结果与NCBI网站上公布的PRSSI DNA标准序列(GI: 1616765)比对,证实PRSSI基因3号外显子存在c.369 C $\rightarrow$ T杂合性突变(图1)。

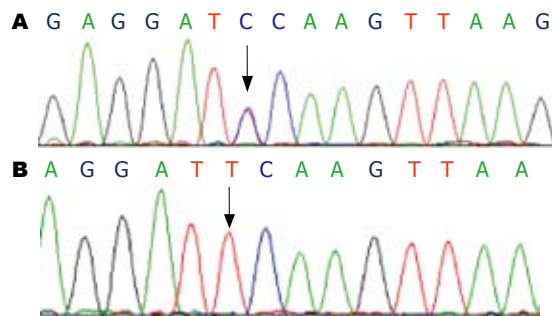


图1 胰蛋白酶原基因3号外显子c.369C $\rightarrow$ T突变。A:突变;B:正常基因序列。

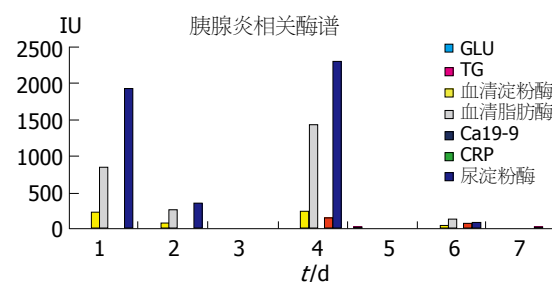


图2 胰腺炎患者的临床资料。

2.2 临床资料 患者的血糖、TG、Ca19-9水平未见明显升高;血清脂肪酶、血清(尿)淀粉酶、CRP均为反应炎症的指标,同时增高可反应炎症加剧。其病后7 h血淀粉酶迅速增高,6 d恢复正常,尿淀粉酶升高较晚,下降缓慢,持续2 wk(图2)。

3 讨论

PRSSI基因位于7号染色体长臂3区5段(7q35),1996年Whitcomb *et al*^[3-5]发现,遗传性慢性胰腺炎是由于第7染色体长臂上的阳离子胰蛋白酶原基因的突变;阳离子胰蛋白酶原所起的作用是水解食物中含有赖-精氨酸残基的蛋白质,同时他在激活、灭活其他消化酶的过程中起关键作用^[6]。目前,已有一些胰蛋白酶原基因突变的报告,其中R122H突变最常见^[1]。基于此我们对该胰腺炎患者的胰蛋白酶原基因进行检测发现PRSSI基因3号外显子存在c.369 C $\rightarrow$ T杂合性突变,由于氨基酸的转变,改变了胰蛋白酶原基因上Ca²⁺的结合位点,胰蛋白酶原受Ca²⁺激活成胰蛋白酶,胰腺中含有的Ca²⁺可使胰蛋白酶原激活而导致胰腺的自身消化,引发胰腺炎。

胆囊结石、酒精、高脂血症、ERCP、创伤等多种原因可导致急性胰腺炎。目前TG升高引起的SAP有上升趋势,亚特兰大急性型胰腺炎临床诊断及分级标准(1992)中的重症胰腺炎^[10-11],发病72 h内,TG高于6.8 mmol/L,排除其他病因诊

■ 相关报道

国外大量的研究已证明遗传性胰腺炎和特发性胰腺炎患者中存在PRSSI基因突变热点,国内近年来也陆续有人发现PRSSI基因突变的遗传性胰腺炎家系。

■同行评价

国内这方面的研究尚不多,本研究处国内领先水平,不足之处为仅观察1例患者。

断为高脂血症性重症胰腺炎。该患者的TG略增高,可以排除高脂血症性胰腺炎。感染性胰腺炎:急性胰腺炎继发于急性传染性疾病者多数较轻,随感染痊愈而自行消退,如传染性单核细胞增多症、细菌感染、急性流行性腮腺炎和肺炎衣原体感染等。常可伴有特异性抗体浓度升高,和白细胞增高。该患者特异性抗体浓度正常,且病情较重,故可排除感染性胰腺炎。酒精性胰腺炎:由于胰岛周围的小静脉被纤维化的组织压迫,胰岛分泌的胰岛素不能进入血液循环,可发生糖尿病。该患者血糖浓度略高或正常,且无酗酒史,故可排除酒精性胰腺炎。

PRSS1基因突变与胰腺炎发病的关联,目前已受到国际胰腺病学专家的一致认可,据可查文献显示约有150个胰蛋白酶原基因突变的胰腺炎家系被报道,而散发病例目前已超过400例,其中在欧美主要是以PRSS1基因的2号和3号外显子突变为主^[12-14],在蒙古利亚人种(特别是汉族人)最近的研究表明其突变热点与国外文献报道存在较大差异,主要是以杂合性突变为主。对胰腺炎基因易感的研究,将为急、慢性胰腺炎的治疗带来新的线索。

4 参考文献

- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-145
- 刘奇才, 郜峰, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水. 遗传性胰腺炎胰蛋白酶原基因突变分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3514-3517
- Lee TY, Oh HC, Kim MH, Kwon S, Lee SS, Seo DW, Lee SK. [Three cases of hereditary pancreatitis in two households in the same family associated with R122H mutation in cationic trypsinogen gene] *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 395-399
- Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 286-289
- 刘奇才, 郜峰, 庄则豪, 杨滨, 林寿榕, 伊强. 中国遗传性胰腺炎患者胰蛋白酶原基因多位点杂合突变及其临床特征. *生物化学与生物物理进展* 2007; 34: 1269-1278
- Liu QC, Cheng ZJ, Yang Y, Ou QS. [A novel mutation of PRSS1 gene in a Chinese hereditary pancreatitis family] *Yi Chuan* 2007; 29: 1067-1070
- Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Mani KR, Bhaskar S, Rao GV, Singh L. Absence of PRSS1 mutations and association of SPINK1 trypsin inhibitor mutations in hereditary and non-hereditary chronic pancreatitis. *Gut* 2004; 53: 723-728
- Le Maréchal C, Masson E, Chen JM, Morel F, Ruszniewski P, Levy P, Férec C. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. *Nat Genet* 2006; 38: 1372-1374
- Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-707
- Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhay M, Spicak J, Drumm B, Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 252-261
- Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 2000; 119: 461-465
- Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J Biol Chem* 2000; 275: 22750-22755
- Teich N, Ockenga J, Keim V, Mossner J. Genetic risk factors in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 2002; 37: 1-9
- Wiedmann M, Teich N, Ott R, Eichelkraut S, Mössner J. A man with two pylori. *Gut* 2008; 57: 305, 351

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 2008-07-28)

胶囊内镜在健康人群中的应用价值

陈孝, 张子其, 张钰

陈孝, 张子其, 张钰, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科 北京市 100853

作者贡献分布: 陈孝, 张子其及张钰对此文所作贡献均等; 此课题由陈孝与张子其设计; 研究过程由陈孝与张钰操作完成; 研究材料由陈孝与张钰提供; 数据分析由陈孝完成; 本论文写作由陈孝完成。

通讯作者: 张子其, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科. chenxiao301@sina.com

电话: 010-66876257

收稿日期: 2008-04-15 修回日期: 2008-05-21

接受日期: 2008-06-02 在线出版日期: 2008-07-28

Initial experience of capsule endoscopy among healthy individuals

Xiao Chen, Zi-Qi Zhang, Yu Zhang

Xiao Chen, Zi-Qi Zhang, Yu Zhang, Geriatric Endoscopic Centre, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Zi-Qi Zhang, Geriatric Endoscopic Centre, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. chenxiao301@sina.com

Received: 2008-04-15 Revised: 2008-05-21

Accepted: 2008-06-02 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To assess the practical usefulness and diagnostic yield of capsule endoscopy among healthy individuals.

METHODS: We retrospectively collected and analyzed the clinical data of 114 healthy individuals receiving capsule endoscopy examinations in our hospital from March 2002 to October 2007.

RESULTS: The ratio of successful examination was 99.12% (113/114). Sixty individuals (53.10%) were found with small intestinal diseases of different properties. Forty-three individuals were diagnosed with one kind of small intestinal lesions, 10 with 2 kinds of intestinal lesions, and 7 with 3 kinds of intestinal lesions. Of the 113 individuals, 17 didn't need medical management, 13 needed following up, other examinations or medical interference if necessary, and 30 needed drug interference and following up.

CONCLUSION: Capsule endoscopy can be an

alternative modality for diagnosing and screening intestinal diseases, and it is useful for early diagnosis and treatment of small intestinal lesions in asymptomatic people.

Key Words: Capsule endoscopy; Small intestine; Health care

Chen Xi, Zhang ZQ, Zhang Y. Initial experience of capsule endoscopy among healthy individuals. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2431-2434

摘要

目的: 了解胶囊内镜在健康人群中的使用价值。

方法: 对2002-04/2007-12在我科进行胶囊内镜检查的114例健康体检者临床病例资料进行回顾性分析。

结果: 检查成功率为99.12%。53.10%(60/113)的健康体检者检出各种不同性质的小肠病变, 其中, 检出1种病变者43例、2种病变10例、3种病变7例。检出的病变中, 不需医疗处置者占17例, 需随访监测、必要时进行其他检查或医疗干预者13例, 需要进行药物干预治疗并随访者30例。

结论: 胶囊内镜是一种有效的小肠疾病筛查和诊断方法, 其在无症状人群中的应用有助于亚临床病变的早期检出, 为小肠疾病的预防和早期治疗提供有力支持。

关键词: 胶囊内镜; 体检; 小肠疾病

陈孝, 张子其, 张钰. 胶囊内镜在健康人群中的应用价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2431-2434

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2431.asp>

0 引言

“早诊早治”是疾病预防的最终目的, 其实现的最佳手段是定期体格检查或人群筛查。小肠是消化系疾病发生率较低的器官, 缺乏无创、高效的临床检查方法, 因此, 小肠疾病的早期诊断并未受到很好的重视, 针对小肠体检的方法

■背景资料

胶囊内镜是进行小肠疾病诊断和筛查的首选方法。提高胶囊内镜诊断准确度是消化界不断寻求突破的重点。与此同时, 拓展胶囊内镜使用范围也渐进入人们视线。但由于消化界对健康人群中隐藏的亚临床小肠疾病分布情况不明, 因而在亚临床或体检人群中推广使用胶囊内镜一直饱受争议。

■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科; 高峰, 副教授, 新疆维吾尔自治区人民医院消化科

■研发前沿

即使在内镜技术高速发展的今天,小肠疾病的诊断仍是难题.胶囊内镜、小肠镜的运用为此提供了新的突破.

也一直未得到建立.胶囊内镜的临床应用优越性显示,他可为我们提供一种很好的小肠疾病筛查方法^[1],尤其重要的是,确有一批健康体检者具有选择胶囊内镜检查作为体检项目的主观要求.我们在胶囊内镜运用于小肠体检方面进行了5年的探索,获得了一些具有积极意义的经验,现总结报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-04/2007-12我科进行体格检查、无明显消化系症状、主动提出胶囊内镜检查并签订知情同意书、顺利接受该项检查者114例,男性100例,女性14例,年龄36-86(平均年龄为54.38±1.57)岁.入选条件为消化系结构完整(即未进行消化系相关手术)、临床初步检查未提示患有消化系动力性及可能影响消化系通畅性的疾病(如消化系肿瘤、消化系大憩室等).胶囊内镜为以色列Given影像公司生产的诊断图像系统(Given diagnostic imaging system)、小肠型胶囊内镜,胶囊内镜的视野范围为140度、景深为30 mm、最大放大倍数为8倍、最小分辨物可小于0.1 mm,图像采集及发射器发射视频图的频率均为2 帧/s,电池工作寿命为360-600 min.

1.2 方法 受检者于检查前禁食8 h,不进行肠道清洁.检查2 h内禁食、禁水,2 h后可适量进水,4 h后可进食半流质.检查期间受检者可自由活动,检查开始至结束后,受检者大便时要密切注意胶囊内镜是否排出,必要时进行腹部X线透视以观察、核实.在胶囊内镜未被证实排出体外之前,禁止进行核磁共振检查.

统计学处理 采用STATA 8.0软件进行统计处理,组间计量资料比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 健康人群胶囊内镜检查的临床特性及安全性 接受胶囊内镜检查的114例健康体检者,内镜胶囊顺利进入小肠并获得良好数据者113例,检查成功率为99.12%.平均每例检查时间为474(215-555) min,平均获得图像55 300帧(25 800-66 600帧).检查成功者胶囊内镜在胃内滞留时间平均为40(5-210) min.在检查记录有效期间,胶囊内镜顺利通过回盲瓣97例(占85.84%),未通过16例,通过回盲瓣的能力在性别、年龄上无明显差异.内镜胶囊在小肠内滞留时间平均为240(82-442) min.所有体检者在检查结束后均顺利排出胶囊,平均排出时间为1380(300-2880) min,无内镜排出延迟及滞留发生.

2.2 健康人群中胶囊内镜检出小肠疾病及其处理情况 除1例失败外,113例健康体检者胶囊内镜证实小肠正常者53例,检出小肠病变者60例(53.10%).其中小肠存在一种病变者43例,二种病变10例,三种病变7例.检出的主要病变包括:黄色瘤29例、小肠炎21例、十二指肠球炎8例、息肉5例、血管发育不良11例、蛔虫4例、黏膜下肿物(性质未定)5例、脂肪瘤1例.同时,胶囊内镜还发现并诊断:反流性食管炎1例、胃窦糜烂12例、十二指肠球炎5例、结肠多发性息肉7例、结肠血管发育不良1例.

体检者检出的小肠病变中,计有43例需要进行医疗干预:其中30例需及时进行药物治疗(以炎症及寄生虫为主),13例需随访及加强生活监测、必要时进行其他检查或治疗(以小肠息肉、黏膜下肿物、脂肪瘤为主);不需临床处理者17例(以小肠黄色瘤、血管发育不良为主).

3 讨论

早期诊断和早期治疗是疾病预防的关键之一,而实现早期诊断的首选方法是临床筛查.良好的临床筛查方案包括两种基本元素:其一是疾病本身是常见病,对人群的危害较高,疾病的发生具有一定的亚临床期,具有可供筛查的时间;其二是临床上具有简便、高效的筛查方法.既往认为小肠的疾病总体发病率较低^[9-16],对人群的危害相对较小;同时也缺乏针对小肠的切实有效、安全检查方法,因此小肠疾病的早期诊断一直是消化系的盲区,卫生保健则更是从未涉及.

胶囊内镜的出现使小肠疾病的检诊手段得到了飞跃性的发展.胶囊内镜具有的安全、高效、简便特性完全符合小肠疾病筛查的要求^[17-19],更为重要的是临床上的确存在一些特殊人群,比如:具有一定经济基础的个体劳动者和特殊保健对象,他们有主动使用胶囊内镜进行小肠健康检查的要求.这使得利用胶囊内镜进行小肠健康检查成为了可能.但胶囊内镜检查不仅费用过高,而且也属于侵入性检查,具有一定的风险,在发生胶囊内镜排出障碍时可诱发必须进行外科手术处理的并发症^[20-22].因此,在健康人群中进行胶囊内镜检查的安全性及临床运用价值都必须进行评估^[23-25].

胶囊内镜是迄今为止最为安全的消化系可视性检查方法,他的非安全因素不来自于仪器本身,而来自于受检者个体,即受检者本身存在妨碍胶囊内镜在消化系内正常移行的病变或解

■创新盘点

本文首次对健康人群中的亚临床小肠疾病存在状况进行了描述,尤其是对其中可能对人体健康造成损害的因素进行了分析,对开展小肠疾病的早期预防具有积极意义;同时也为胶囊内镜临床运用范围的进一步拓宽奠定了基础.

剖结构异常. 作者统计胶囊内镜并发症发现: 病理或生理改变均可使胶囊内镜排出受到影响, 进行胶囊内镜检查前消化系通畅性评估是必要的^[21,26-27]. 本组结果显示健康人群进行胶囊内镜检查是安全的, 不会发生并发症.

在健康人群中进行胶囊内镜检查的价值在于: 检出需要处置的亚临床病变. 本组显示健康人群中半数以上可检出各种病变, 其中肿瘤(含息肉和黏膜下肿物)、炎症(十二指肠球炎和小肠炎)、寄生虫等的比例较高. 检出的病变需及时进行药物治疗者主要为各种炎症和寄生虫, 占所有受检者的26.32%; 需定期随访, 必要时进行其他检查或医疗干预者主要为各种性质不明的肿瘤, 占11.40%; 检出病变但不需处理者主要为血管发育不良和黄色瘤, 占14.91%. 胶囊内镜的运用使该批亚临床患者获得了早期诊断和早期治疗, 这也显示了胶囊内镜检查运用于健康人群具有重要意义.

但我们发现: 胶囊内镜可检出一些无症状的小肠肿瘤患者, 这部分患者存在胶囊内镜排出障碍的风险^[21,27-30]; 另外, 胶囊内镜在健康人群中检出的小肠病变中对健康构成严重危害的相对较少, 而且大部分病例如十二指肠球炎和小肠炎可通过常规胃镜和结肠镜逆行回肠镜检查实现, 后者不仅花费明显减少, 而且可同时进行活组织检查, 运用更具可行性.

总之, 胶囊内镜在健康人群中运用有助于小肠疾病的早期诊断和早期治疗, 但其花费较高, 且部分病例可由常规的胃肠镜检查所取代. 我们的观点是不提倡、也不拒绝运用胶囊内镜进行健康体检.

4 参考文献

- Sidhu R, Sanders DS, Morris AJ, McAlindon ME. Guidelines on small bowel enteroscopy and capsule endoscopy in adults. *Gut* 2008; 57: 125-136
- El-Matary W. Wireless capsule endoscopy: indications, limitations, and future challenges. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 4-12
- Mergener K, Ponchon T, Gralnek I, Pennazio M, Gay G, Selby W, Seidman EG, Cellier C, Murray J, de Franchis R, Rösch T, Lewis BS. Literature review and recommendations for clinical application of small-bowel capsule endoscopy, based on a panel discussion by international experts. Consensus statements for small-bowel capsule endoscopy, 2006/2007. *Endoscopy* 2007; 39: 895-909
- Gubler C, Fox M, Hengstler P, Abraham D, Eigenmann F, Bauerfeind P. Capsule endoscopy: impact on clinical decision making in patients with suspected small bowel bleeding. *Endoscopy* 2007; 39: 1031-1036
- Estévez E, González-Conde B, Vázquez-Iglesias JL, de Los Angeles Vázquez-Millán M, Pérttega S, Alonso PA, Clofent J, Santos E, Ulla JL, Sánchez E. Diagnostic yield and clinical outcomes after capsule endoscopy in 100 consecutive patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 881-888
- Sturniolo GC, Di Leo V, Vettorato MG, De Boni M, Lamboglia F, De Bona M, Bellumat A, Martines D, D'Inca R. Small bowel exploration by wireless capsule endoscopy: results from 314 procedures. *Am J Med* 2006; 119: 341-347
- Bar-Meir S. Review article: capsule endoscopy - are all small intestinal lesions Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 3: 19-21
- Valle J, Alcántara M, Pérez-Gruesso MJ, Navajas J, Muñoz-Rosas C, Legaz ML, Cuena R, Carrobbles JM. Clinical features of patients with negative results from traditional diagnostic work-up and Crohn's disease findings from capsule endoscopy. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 692-696
- 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
- Cheon JH, Kim YS, Lee IS, Chang DK, Ryu JK, Lee KJ, Moon JS, Park CH, Kim JO, Shim KN, Choi CH, Cheung DY, Jang BI, Seo GS, Chun HJ, Choi MG. Can we predict spontaneous capsule passage after retention? A nationwide study to evaluate the incidence and clinical outcomes of capsule retention. *Endoscopy* 2007; 39: 1046-1052
- Tatar EL, Shen EH, Palance AL, Sun JH, Pitchumoni CS. Clinical utility of wireless capsule endoscopy: experience with 200 cases. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 140-144
- Jakobs R, Hartmann D, Benz C, Schilling D, Weickert U, Eickhoff A, Schoenleben K, Riemann JF. Diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding by intra-operative enteroscopy in 81 consecutive patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 313-316
- Gupta R, Lakhtakia S, Tandan M, Banerjee R, Ramchandani M, Anuradha S, Ramji C, Rao GV, Pradeep R, Reddy DN. Capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding--an Indian experience. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 188-190
- Lai LH, Wong GL, Chow DK, Lau JY, Sung JJ, Leung WK. Long-term follow-up of patients with obscure gastrointestinal bleeding after negative capsule endoscopy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1224-1228
- Spada C, Pirozzi GA, Riccioni ME, Iacopini F, Marchese M, Costamagna G. Capsule endoscopy in patients with chronic abdominal pain. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 696-698
- Fry LC, Carey EJ, Shiff AD, Heigh RI, Sharma VK, Post JK, Hentz JG, Fleischer DE, Leighton JA. The yield of capsule endoscopy in patients with abdominal pain or diarrhea. *Endoscopy* 2006; 38: 498-502
- 张子其, 陈孝. 胶囊内镜对小肠疾病的诊断价值. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 218-220
- Bhuket T, Takami M, Fisher L. The use of wireless capsule endoscopy in clinical diagnostic gastroenterology. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 259-266
- Gerber J, Bergwerk A, Fleischer D. A capsule endoscopy guide for the practicing clinician: technology and troubleshooting. *Gastrointest Endosc*

■应用要点

胶囊内镜在亚临床小肠疾病患者和人群中使用时具有肯定意义. 在经济条件许可的地区或特定人群中, 可以有选择性地开展胶囊内镜对小肠疾病的筛查.

■同行评价

本文结果显示胶囊内镜在无症状人群中的应用有助于亚临床病变的早期检出,对胶囊内镜在健康体检中的作用提供了一定的依据。

- 2007; 66: 1188-1195
- 20 陈孝, 张子其, 邵勇, 张钰, 张建萍, 王亚红. 胶囊内镜对小肠疾病诊断和治疗的影响程度. 世界华人消化杂志 2007; 15: 762-766
- 21 陈孝, 张子其, 张建萍, 张钰. 胶囊内镜检查存在的问题及副作用的初步分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2233-2236
- 22 Peter S, Heuss LT, Beglinger C, Degen L. Capsule endoscopy of the upper gastrointestinal tract -- the need for a second endoscopy. *Digestion* 2005; 72: 242-247
- 23 Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Gurudu SR, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with non-stricturing small bowel Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 954-964
- 24 Frieling T. The clinical impact of capsule endoscopy: to believe or not to believe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 873-874
- 25 Dubcenco E, Baker JP, Jeejeebhoy KN. What is the clinical validity of capsule endoscopy for evaluating the small bowel? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 618-619
- 26 Ersoy O, Sivri B, Arslan S, Batman F, Bayraktar Y. How much helpful is the capsule endoscopy for the diagnosis of small bowel lesions? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3906-3910
- 27 Delvaux M, Gérard Gay. Capsule endoscopy in 2005: facts and perspectives. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 23-39
- 28 Matas JL, Asteinza M, Loscos JM, Fernández S, Ramírez-Armengol JA, Díaz-Rubio M. Diagnostic yield and safety of capsule endoscopy. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 666-673
- 29 Rastogi A, Schoen RE, Slivka A. Diagnostic yield and clinical outcomes of capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 959-964
- 30 Viazis N, Papaxoinis K, Theodoropoulos I, Sgouros S, Vlachogiannakos J, Pipis P, Markoglou C, Avgerinos A. Impact of capsule endoscopy in obscure small-bowel bleeding: defining strict diagnostic criteria for a favorable outcome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 717-722

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定,本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字,如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如8.4 $\pm$ 0.27 cm,其SD/3 = 0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12; 1985年4月,写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 $\leq$ 100,百分数到个位; 101 $\leq$ 分母 $\leq$ 1 000,百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!(常务副总编辑:张海宁 2008-07-28)

直肠癌经直肠彩色及能量多普勒超声参数与TNM分期的相关性

于英蛟, 李雁平, 杨志伟, 王学梅

于英蛟, 王学梅, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科 辽宁省沈阳市 110001

李雁平, 杨志伟, 大庆油田总医院超声科 黑龙江省大庆市 163001

作者贡献分布: 此课题由王学梅, 于英蛟, 李雁平及杨志伟设计; 研究过程由于英蛟, 李雁平及杨志伟操作完成; 数据分析由于英蛟与王学梅完成; 本论文写作由于英蛟与王学梅完成。

通讯作者: 王学梅, 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超声中心; wxmlmt@yahoo.com.cn
电话: 024-83282098

收稿日期: 2008-03-27 修回日期: 2008-05-11

接受日期: 2008-05-13 在线出版日期: 2008-07-28

Relationship between Transrectal color and power Doppler ultrasonography quantification and TNM staging in rectal cancer

Ying-Jiao Yu, Yan-Ping Li, Zhi-Wei Yang, Xue-Mei Wang

Ying-Jiao Yu, Xue-Mei Wang, Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yan-Ping Li, Zhi-Wei Yang, Department of Ultrasound, Oil Field Hospital of Daqing, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Wang, Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Northern Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmlmt@yahoo.com.cn

Received: 2008-03-27 Revised: 2008-05-11

Accepted: 2008-05-13 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To reveal the relations of the parameters in color Doppler flow imaging (CDFI) and power Doppler imaging (PDI) with TNM staging in rectal cancer.

METHODS: Transrectal color and power Doppler ultrasound examinations were performed on 86 patients with rectal cancer before surgery. Tumor blood flow signals were recorded including peak stream velocity (PSV) and resistance index (RI) and calculated vascularity index (VI). All the rectal cancers were staged by TNM system.

RESULTS: There was a significant correlation

between VI and TNM staging ($\chi^2 = 32.78, P < 0.05$), but PSV and RI had no correlation with TNM staging in rectal cancer ($\chi^2 = 2.942, 4.473, P = 0.816, 0.613$).

CONCLUSION: VI can be used in the evaluation of rectal cancer angiogenesis before operation, and also may provide valuable information for preoperative diagnosis and prognosis evaluation.

Key Words: TNM staging; Rectal; Neoplasm; Doppler ultrasound; Transrectal ultrasonography

Yu YJ, Li YP, Yang ZW, Wang XM. Relationship between Transrectal color and power Doppler ultrasonography quantification and TNM staging in rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2435-2438

摘要

目的: 探讨腔内彩色多普勒超声(CDFI)及能量多普勒超声(PDI)参数与直肠癌TNM分期的关系。

方法: 应用直肠腔内超声术前检测86例直肠癌, 记录癌肿内血流峰值流速(PSV), 阻力指数(RI), 计算在PDI状态下血管指数(vascularity index, VI), 采用TNM分期标准对直肠癌进行分期, 超声所得各项参数与TNM分期比较。

结果: 彩色多普勒参数PSV, RI与直肠癌TNM分期无明显相关性($\chi^2 = 2.942, 4.473; P = 0.816, 0.613$), 能量多普勒测值VI与直肠癌TNM分期相关($\chi^2 = 32.78, P < 0.05$)。

结论: VI可用于术前评价直肠癌的血管生成, 为术前诊断及预后评估提供有价值的信息。

关键词: TNM分期; 直肠; 肿瘤; 多普勒超声; 经直肠超声

于英蛟, 李雁平, 杨志伟, 王学梅. 直肠癌经直肠彩色及能量多普勒超声参数与TNM分期的相关性. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2435-2438

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2435.asp>

■背景资料

直肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 提高直肠癌术后生存率, 关键在于早期诊断和早期合理的治疗。术前准确的分期对于临床制定合理的治疗方案, 判断预后尤为重要。目前临床多采用CT、MRI或经直肠二维超声等影像学检查手段来对直肠癌进行术前分期。在以往的经直肠二维超声判断直肠癌分期较其他影像学方法未见明显优势。研究表明, 肿瘤区域的血流动力学较正常组织发生了改变。

■同行评议者

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; 王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■相关报道

研究表明,肿瘤血管的结构和分布是不正常的,从而使得肿瘤区域的血流动力学较正常组织发生了改变.

0 引言

新生血管生成是肿瘤发生与进展的关键,其涉及到肿瘤的生长、浸润、转移等各个环节.研究表明直肠癌患者的血管生成状况与肿瘤细胞的增殖、浸润和转移相关.因此,通过观察肿瘤内血管生成可预测直肠癌浸润程度及淋巴结转移情况.经直肠超声(TRUS)的彩色多普勒成像(CDFI)及能量多普勒成像(PDI)能于术前敏感显示病灶内肿瘤血管,本研究应用CDFI、PDI技术对86例直肠癌肿块进行检测得到血管峰值流速(PSV)和阻力指数(RI)及PDI状态下计算的血管指数(vascularity index VI),与TNM分期进行对比分析,探讨超声参数与直肠癌分期的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究选取2006-07-01/2007-10-01在本院治疗且资料完整的直肠癌患者86例,其中男性51例,女性35例,年龄29-79(平均 52.5 ± 12.2)岁.仪器采用LOGIQ9彩超仪,选择经直肠腔内探头,频率8 MHz.

1.2 方法 所有患者于当日检查前排净大便.检查时,患者取左侧卧位,屈膝,双膝尽量向上,双手抱膝,使肛门充分暴露.探头表面放少许耦合剂,套橡胶套,在橡胶套表面涂以耦合剂起润滑作用.嘱患者深呼吸,探头缓慢进入肛门,观察肿瘤的位置,浸润肠壁的层次及与周围邻近器官的关系.选择清晰的二维图像,启动CDFI,选择与声速夹角最小的血管测量其PSV及RI.启动PDI,显示肿瘤区域血管分布,保持探头平稳,使图像稳定,冻结5次图像,选择显示最多血流信号的切面,存储图像.将PDI图像输入计算机,并用计算机图像软件分析获取血管数目定量参数即VI,VI为肿瘤内血管的面积占肿块总面积的比值.所有病例均经国际抗癌联盟TNM分期标准进行分期,收集术后病理分期资料.国际抗癌联盟TNM分期标准,对直肠癌进行术后分期,分为I-IV期. I期: $T_1N_0M_0$ 癌限于黏膜层或黏膜下层,无淋巴结转移、无远处转移; $T_2N_0M_0$ 侵及肌层,未超越浆膜,无淋巴结转移,无远处转移; II期: $T_3N_0M_0$, $T_4N_0M_0$, T_3 癌肿穿透肠壁,侵及邻近组织器官, T_4 癌肿穿透肠壁,侵及邻近器官. III期: 任何T, N_1M_0 , N_2M_0 任何深度的肠壁浸润,区域淋巴结有转移,无远处转移. IV期: 任何T、任何N、 M_1 ,任何深度的肠壁浸润,不论淋巴结有转移,远处已有转移.

统计学处理 利用SPSS11.5软件进行统计学

处理. PSV、RI、VI与TNM分期比较用有序分组资料的线性趋势检验, $P < 0.05$ 为检验水准.

2 结果

86例直肠癌患者中, I期13例(15.1%), II期25例(29.1%), III期39例(45.3%), IV期9例(10.5%). 腺癌77例(89.5%), 黏液腺癌3例(3.5%), 印戒细胞癌3例(3.5%), 恶性间质瘤2例(2.3%), 未分化癌1例(1.2%). 86例患者均获得满意的彩色及能量多普勒图像. PSV范围13.72-34.78 cm/s, RI范围0.52-0.83(图1A), VI范围10.3%-38.9%(图1B). 直肠癌肿块彩色多普勒超声参数RI与病理TNM分期之间无相关关系($\chi^2 = 4.473$, $P = 0.613$). PSV与病理TNM分期之间无相关关系($\chi^2 = 2.942$, $P = 0.816$). VI与TNM分期之间有相关关系,且呈直线相关($\chi^2 = 32.78$, $P < 0.001$, $r = 0.522$, $P < 0.001$, 表1).

3 讨论

直肠癌约占大肠癌的60%-75%,是常见的消化系统恶性肿瘤之一,近年来呈上升趋势.提高直肠癌术后生存率,关键在于早期诊断和早期合理的治疗. T_1 和部分 T_2 期直肠癌可以行局部切除,而 T_3 、 T_4 期或有淋巴结转移可考虑术前放化疗加手术等,因此直肠癌术前准确的分期对于临床制定合理的治疗方案,判断预后尤为重要^[1].目前临床多采用CT、MRI或经直肠二维超声等影像学检查手段来对直肠癌进行术前分期. CT在T分期的准确度仅达33%-77%,对淋巴结准确度为53%^[2-3]. Laghi *et al*^[4]应用MRI研究35例直肠癌患者,得出T分期总的准确性是86%,另外,涂小煌 *et al*^[5]研究MRI水成像(MRH)对直肠癌术前分期价值,得出MRI水成像检查对T分期的总准确性为82.4%,淋巴结转移的总准确性为67.6%. 经直肠二维超声对T分期的总准确性为65.8%^[6],但是超声检查与操作者的经验有很大关系, Rafaelsen *et al*^[7]研究比较了有经验和无经验的医生对30例直肠癌术前分期诊断的特异性,分别为83%和46%. 二维超声对淋巴结转移诊断的准确性较低,有研究表明, N分期中准确性57%-71.4%. 因此,在以往的经直肠二维超声判断直肠癌分期较其他影像学方法未见明显优势.

研究表明,血管生成在肿瘤的生长中发挥着重要的作用^[8-10]. 血管生成成为肿瘤细胞的增殖提供了营养和氧气,同时也增加了肿瘤转移的机率. 肿瘤血管的结构和分布是不正常的,包括

表 1 直肠癌肿块RI、PSV、VI与TNM分期的关系

TNM分期	n	RI			PSV			VI		
		0.5-	0.6-	0.7-	5 cm/s-	10 cm/s-	15 cm/s-	0.10-	0.15-	0.20-
I	13	4	5	4	4	5	4	8	3	2
II	25	10	12	3	8	10	7	7	12	6
III	39	12	17	10	13	11	15	0	19	20
IV	9	2	3	4	2	2	5	0	3	6
合计	28	37	21	27	28	31	15	37	34	

■创新盘点

以往有关超声在直肠癌术前分期的应用价值的文章中,多采用二维超声直接观察肠壁结构的方法,有关血流动力学参数与直肠癌术前分期的关系则研究较少,本文分析了PSV和RI及VI与直肠癌TNM分期的相关性。

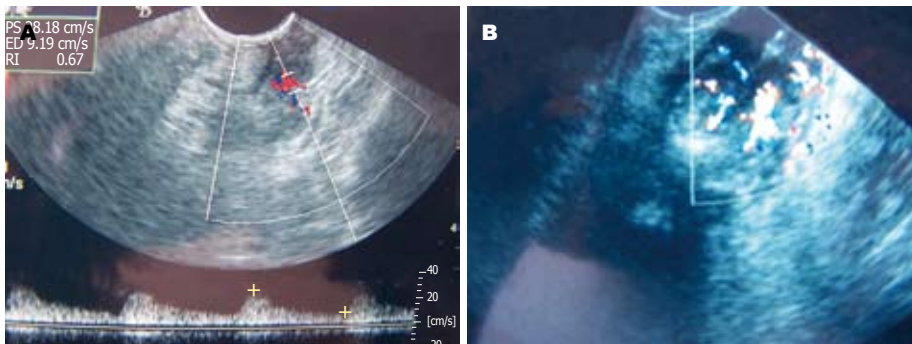


图 1 直肠癌声像图. A: II 期(PSV28.18 cm/s, RI0.67); B: III 期(VI: 22.3%).

管径粗细的变化、延长及旋转、分枝结构的紊乱及血管壁的不完全等。这些变化会增加毛细血管的通透性、血管横断层面的面积及动静脉脉瘘的形成,从而使得肿瘤区域的血流动力学较正常组织发生了改变。本研究旨在探讨彩色及能量多普勒超声在直肠癌TNM分期中的应用价值。

在彩色多普勒超声中,PSV和RI是较重要的表示血流动力学特征的参数,以往的研究中,这两个参数在肿瘤良恶性鉴别上有重要意义,但与恶性肿瘤病理分期之间的关系则研究较少。郭丽魁 *et al*^[11]在卵巢癌的研究中得出结论,RI值随临床分期的升高而降低,不同临床分期之间差异有显著性,PSV在不同临床分期之间差异无显著性。在本项直肠癌研究中,未发现这两项参数与直肠癌TNM分期之间存在明显相关性,这与一些学者在宫颈癌TNM分期中的研究结果及Emoto *et al*^[12]在53例子宫内膜癌患者中的研究结果相一致,可能是由于恶性肿瘤本身其血管形成过程及血管形态是相似的,因此血流动力学相似,在各期之间则没有明显差别。

VI是肿瘤断面内彩色像素数与总像素数的比值,反映的是肿瘤内超声可探测的血管密度,在PDI条件下测得的VI能更好的显示瘤内粗细不均,走行迂曲紊乱、不规则的血管,较真实的反映肿瘤内的血管分布情况。本项研究表明,

VI与直肠癌TNM分期呈直线相关,这与赵玉珍 *et al*^[13]的研究结果一致,可能是由于不同分期的恶性肿瘤内新生血管的密度不同,分期越高,新生血管的密度越大。但与另一些学者的研究结果相反,分析其原因,可能是由于分组标准不同。本项研究所测得的VI值均在10%-40%之间,故以10%、15%、20%为分组标准,得出阳性结果,而另有学者的研究以25%、50%、75%为分组标准。

彩色及能量多普勒超声是一种无创、快捷、易操作、在活体上可重复实施、能显示肿瘤全貌及病理特征的检查方法,在术前评估肿瘤血管生成、指导临床分期和预后上,都有一定的价值,具有较广泛的临床意义。VI能够反映直肠癌血供的一些特点,对预测直肠癌血行转移有一定意义,可以为选择正确的治疗方案和估测预后提供参考。

4 参考文献

- Kim HJ, Wong WD. Role of endorectal ultrasound in the conservative management of rectal cancers. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 358-366
- Heriot AG, Grundy A, Kumar D. Preoperative staging of rectal carcinoma. *Br J Surg* 1999; 86: 17-28
- Kim JC, Kim HC, Yu CS, Han KR, Kim JR, Lee KH, Jang SJ, Lee SS, Ha HK. Efficacy of 3-dimensional endorectal ultrasonography compared with conventional ultrasonography and computed tomography in preoperative rectal cancer staging.

■同行评价

本研究为直肠癌患者术前评估, 临床分期, 制定计划提供了很好的依据, 易于临床推广。

- 4 *Am J Surg* 2006; 192: 89-97
- 4 Laghi A, Ferri M, Catalano C, Baeli I, Iannaccone R, Iafrate F, Ziparo V, Passariello R. Local staging of rectal cancer with MRI using a phased array body coil. *Abdom Imaging* 2002; 27: 425-431
- 5 涂小煌, 黎成金, 马明, 王烈, 宋京翔. 直肠癌术前磁共振水成像检查的意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1928-1933
- 6 Ptak H, Marusch F, Meyer F, Wendling P, Wenisch HJ, Sendt W, Manger T, Lippert H, Gastinger I. Feasibility and accuracy of TRUS in the pre-treatment staging for rectal carcinoma in general practice. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 420-425
- 7 Rafaelsen SR, Sorensen T, Jakobsen A, Bisgaard C, Lindebjerg J. Transrectal ultrasonography and magnetic resonance imaging in the staging of rectal cancer. Effect of experience. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 440-446
- 8 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31
- 9 Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2004; 11: 948-953
- 10 Yoshino S, Kato M, Okada K. Clinical significance of angiogenesis, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 591-594
- 11 郭丽魁, 王凯, 齐铮琴. 经阴道彩色多普勒超声对不同临床分期与病理类型卵巢癌诊断价值的研究. *实用妇产科杂志* 2005; 21: 735-736
- 12 Emoto M, Tamura R, Shiota K, Hachisuga T, Kawarabayashi T. Clinical usefulness of color Doppler ultrasound in patients with endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 700-706
- 13 赵玉珍, 焦荣红, 于跃明, 纪晓惠, 李景胜. 直肠癌腔内超声彩色血管能量成像与TNM分期的对比研究. *中国超声医学杂志* 2006; 22: 455-457

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)

Dixon术中肠腔封闭式加压灌注检测吻合口的临床意义

戴东, 宫爱民, 颜文贞, 李明意, 谭小宇

戴东, 宫爱民, 颜文贞, 李明意, 谭小宇, 广东医学院附属医院普通外科 广东省湛江市 524001
宫爱民, 大连大学附属新华医院肛肠外科 辽宁省大连市 116021

作者贡献分布: 此检测方法由戴东设计, 并与宫爱民, 颜文贞, 李明意及谭小宇共同在术中开展; 效果跟踪随访过程由宫爱民, 颜文贞及谭小宇操作完成; 本论文写作由戴东, 宫爱民及颜文贞完成。

通讯作者: 戴东, 524001, 广东省湛江市人民大道南57号, 广东医学院附属医院普通外科, daidong2008@126.com

电话: 0759-2788162

收稿日期: 2008-04-16 修回日期: 2008-06-02

接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-07-28

Clinical significance of closed lumen pressurized perfusion in Dixon operation in detecting anastomotic leakage

Dong Dai, Ai-Min Gong, Wen-Zhen Yan, Ming-Yi Li, Xiao-Yu Tan

Dong Dai, Ai-Min Gong, Wen-Zhen Yan, Ming-Yi Li, Xiao-Yu Tan, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China

Ai-Min Gong, Department of Anorectal Surgery, the Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong Dai, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, 57 Renmin Avenue, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China. daidong2008@126.com

Received: 2008-04-16 Revised: 2008-06-02

Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical value of closed gut lumen pressurized perfusion (CGLPP) in the detection of anastomotic leakage.

METHODS: A total of 35 cases were collected. After the enteroenterostomy was completed, the intestine was clamped at the upper extremity 5 cm away from the anastomotic stoma. In addition, one Foley urinary catheter (22-24 in size) was used via the anus and water was instilled into the catheter balloon to make the enteric cavity closed. Via the urinary catheter, methylthioninium chloride diluent was infused into the enteric cavity to observe whether anastomotic leakage existed.

RESULTS: During the pressurized perfusion, anastomotic leakage was found in 2 cases (5%), and repaired immediately. After following up for 6-12 mo, no anastomotic fistula and stricture occurred. All the cases had no recurrence or metastasis.

CONCLUSION: Application of CGLPP in Dixon operation may help to detect anastomotic leakage and prevent anastomotic injury.

Key Words: Prevention; Carcinoma of the rectum; Dixon operation; Anastomotic fistula

Dai D, Gong AM, Yan WZ, Li MY, Tan XY. Clinical significance of closed lumen pressurized perfusion in Dixon operation in detecting anastomotic leakage. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2439-2441

摘要

目的: 探讨Dixon术中肠腔封闭式加压灌注在预防吻合口瘘中的临床意义。

方法: Dixon手术完成肠肠吻合术后, 在吻合口上端5 cm处钳夹封闭上端肠腔; 另经肛门插入1 Foley尿管(22-24号), 向尿管球囊中注入水使球囊封闭肛门, 使该段肠腔处于相对封闭状态。通过尿管向该肠段内注入美兰稀释液, 观察吻合口是否有美兰液渗出可及时发现即行缝合修补。

结果: 术中经肠段封闭式加压灌注检测发现2例吻合口有轻微渗出(发生率5%), 即行修补。随访6-12 mo, 本组病例术后未发生吻合口瘘、吻合口狭窄等情况, 患者无复发和转移, 健康状况良好。

结论: Dixon术中应用封闭式加压灌注检测吻合口, 不易引发吻合口副损伤。

关键词: 预防; 直肠癌; Dixon术; 吻合口瘘

戴东, 宫爱民, 颜文贞, 李明意, 谭小宇. Dixon术中肠腔封闭式加压灌注检测吻合口的临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(21): 2439-2441

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2439.asp>

■背景资料

经腹直肠癌直肠前切除术(Dixon手术)需具有严格的手术指征, 目前Dixon手术仍为直肠癌最理想的保肛术式。TME原则的普及、直肠癌生物学特性研究的进一步深入, 使得低位直肠癌的保肛率大为提高。

■同行评议者

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

■相关报道

欧美及日本均主张直肠癌远侧肠管切除范围为2 cm。我国大肠癌专业委员会建议直肠癌肿远侧肠管切除3 cm。Heald *et al*提出全直肠系膜切除的直肠癌手术原则(TME)后,使保肛手术后局部复发率明显下降。

0 引言

直肠癌患者须在可行直肠癌根治手术的前提下,是否能保留肛门,将是直接影响低位直肠癌患者术后生活质量的重要问题。适时的保留肛门,是外科医师在直肠癌根治手术中主要目标之一。经腹直肠癌直肠前切除术(Dixon手术)需具有严格的手术指征,目前Dixon手术仍为直肠癌最理想的保肛术式。TME原则的普及、直肠癌生物学特性研究的进一步深入,使得低位直肠癌的保肛率大为提高。但保肛术后吻合口瘘的发生率仍在10%-20%间^[1-2],吻合口瘘的发生直接影响保肛术的成败。预防吻合口瘘是提高保肛手术成功的关键。

1 材料和方法

1.1 材料 本组2005-01/2006-03完成Dixon手术35例,男性21例,女性14例,年龄34-72(中位年龄56.2)岁。肿瘤平均距离在齿状线上5.5-6 cm处,吻合口距齿状线3-4 cm。高分化腺癌17例,直肠息肉癌变16例,黏液腺癌2例。根据1978年我国大肠癌学术会议对Duke分期补充意见:B期26例,C1期7例,C2期2例。

1.2 方法 本组35例患者均在气管内插管全麻下,严格遵循TME原则行低位Dixon手术,其中16例由于骨盆腔较为宽大直接采用手工吻合,另19例因骨盆腔较为狭窄用吻合器(美国强生公司生产的CDH29mm或CDH33mm吻合器)完成低位吻合,吻合口均距齿状线3-4 cm。肠管切除的切端经快速冰冻病理检查证实无癌细胞浸润,认真冲洗术野,吸尽盆腔内冲洗液,充分显露吻合口处肠管。在吻合口上方5 cm处用肠钳钳夹乙状结肠或降结肠,经肛门向直肠插入1条Foley尿管(22-24号),将尿管球囊置于肛门口,向尿管球囊内注入15-20 mL盐水,球囊膨胀使肛门处于相对封闭状态(图1)。随后将2 mL×2支美蓝溶液稀释在200 mL的盐水中,用50 mL注射器将所已稀释的美蓝液缓慢通过Foley尿管注入所封闭肠段,使该段肠管逐步充盈,平均注入100-150 mL时,该段肠管充盈满意。详细观察吻合口处有无美蓝液渗出。操作中仅发现2例肠吻合口处有美蓝液轻微渗出,即用1号丝线行浆肌层水平褥式缝合修补渗液处。该操作可重复使用至确认无吻合口渗出为止,确定吻合口无渗液后抽空水囊拔出Foley尿管。常规在骶前放置胶引流管1条,经腹膜外由左下腹部引出并固定于腹壁作观察、引流用。经再次确认所用于吻合的乙状结

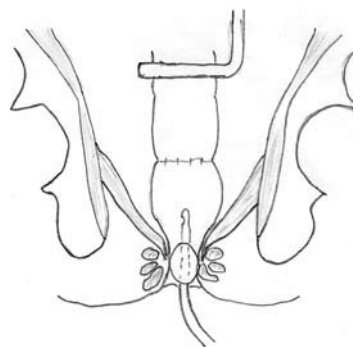


图1 肠腔封闭式加压灌注检测示意图。

肠、降结肠及其系膜游离度,及确认其供血情况,确保吻合段乙状结肠、降结肠在无张力供血良好的情况下,缝合盆底腹膜,关腹。术后常规经颈静脉导管维持维持全肠外营养治疗1 wk,并确保患者术后的水、电解质、能量及营养物质的供给。

2 结果

本组35例患者术中均采用了肠腔封闭式加压灌注检测,结果证实通过此方法能够明确掌握吻合口的吻合口情况;上述患者在应用本检测后在术中仅发现有2例患者出现吻合口处有轻微渗出现象,即用1号丝线对瘘口处上下端浆肌层缝合修补固定;修复后再次注入美兰稀释液复查。该组患者术后未发现吻合口瘘的情况,术后本组患者恢复良好。另该35例患者术后1 wk内3-4次/d排稀烂,至术后3 wk患者排便功能恢复正常。上述患者转入化疗后仍然定期复查及病情跟踪,了解术后疾病的进展情况,在复查及病情追踪的过程中未发现有吻合口狭窄及癌肿复发。

3 讨论

直肠癌手术技术技巧的提高、吻合器械的广泛应用,低位直肠癌手术的保肛率不断提高,平均可达70%左右^[3-6]。另相关直肠癌生物学特性、解剖学的研究进展:淋巴转移存在的3个途径,既上、侧、下3个途径,并非所有部位的直肠癌肿都发生3个方向的淋巴引流,腹膜返折以上直肠癌肿一般仅有上方向的淋巴引流,腹膜返折以下的直肠癌肿则出现向上及侧方向的淋巴引流,奠定了直肠癌的淋巴引流的特定途径及下段直肠癌根治术中淋巴清扫范围的病理及解剖基础^[4-7]。直肠癌逆行扩散(远端)极为罕见并其范围也有限,即使有侧侧(向肛门侧)浸润也多在0.5-1.0 cm以内,罕有超过者2 cm者。学术界公认远端肠段切缘距离>2 cm为安全。欧美及日本均主张直肠癌远侧肠管切除范围为2 cm。我国

大肠癌专业委员会建议直肠癌肿远侧肠管切除3 cm^[8-9]。Heald *et al*提出全直肠系膜切除的直肠癌手术原则(total mesorectal excise, TME)后, 使保肛手术后局部复发率明显下降^[10]。Dixon术后直肠癌患者的主要难题是吻合口瘘, 不论是人工或吻合器的吻合, 吻合口瘘仍是常见的并发症^[11-16]。因此如何预防吻合口瘘是保证直肠癌低位前切除吻合保肛手术成功的关键^[17-23]。作者通过术中行肠段封闭式加压灌注检测预防及避免手术后吻合口瘘: Dixon手术完成后, 施行相对封闭的肠腔内通过Foley尿管缓慢向肠腔内注射美蓝稀释液, 观察吻合口是否有美蓝液渗出。如发现渗漏便及时修补; 术中经导尿管向封闭检测肠腔内注射美蓝溶液, 既对相对封闭的肠腔进行加压灌注, 通过封闭式加压灌注来检测吻合口的吻合质量, 操作中可及时了解吻合口情况, 注射美蓝溶液时应注意压力要适当, 压力过高可能会胀破吻合口, 压力过低则无法检测吻合口的吻合质量。在本组经肠腔封闭式加压灌注检测的病例中仅发现2例吻合口处有美蓝液轻微渗出, 经及时修补及再次检测确认无渗。除以上封闭式加压灌注检测外, 术中必须确保近端乙状结肠或降结肠的血供及该段肠管系膜应具有适当的松弛度, 这同样对吻合口的愈合也十分重要。检测完成后在骶前经腹膜外常规放置引流管, 可充分引流骨盆腔, 观察是否发生吻合口瘘或盆腔内感染, 骶前骨盆腔内经腹膜外置管, 当吻合口瘘发生或盆腔内感染可及时引流而不污染腹腔。术后第1天即开始由鼻胃管注入石蜡油(100 mL/次, 3次/d)润滑肠道, 同时促进胃肠蠕动, 可预防粪块的形成。经过上述一系列措施, 本组患者无吻合口瘘发生, 确保肛手术的成功, 因而提高了患者的生活质量。Dixon术中肠腔相对封闭式加压灌注操作简单、直接安全可靠, 方法行之有效, 不易引发吻合口副损伤。可有效预防直肠癌Dixon手术后吻合口瘘的发生。

4 参考文献

- 1 Pickleman J, Watson W, Cunningham J, Fisher SG, Gamelli R. The failed gastrointestinal anastomosis: an inevitable catastrophe? *J Am Coll Surg* 1999; 188: 473-482
- 2 黄筵庭. 腹部外科手术并发症. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 415-416
- 3 Penna Ch. [Management of anastomotic fistula

following excision of rectal cancer] *J Chir* (Paris) 2003; 140: 149-155

- 4 郁宝铭. 直肠癌保肛的现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 32-33
- 5 李世拥. 直肠癌保肛术式的争论. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 34-35
- 6 张胜本. 直肠癌根治切除后保肛的条件. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 36-37
- 7 王根本, 金保纯, 戴和壁. 临床解剖学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 136-139
- 8 刘宝善. 直肠癌低位切除的理论基础与临床效果. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 38-39
- 9 王正康, 徐文怀. 当代大肠癌手术学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994: 76-111
- 10 Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986; 1: 1479-1482
- 11 戴东, 谭小宇, 杜松涛, 曾宪成, 张立学, 李国光, 汪根树. 老年女性低位直肠癌保肛手术的临床探讨. 中国普通外科杂志 2002; 11: 247-248
- 12 Kanellos I, Vasiliadis K, Angelopoulos S, Tsachalis T, Pramateftakis MG, Mantzoros I, Betsis D. Anastomotic leakage following anterior resection for rectal cancer. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 1: s79-s81
- 13 Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, van de Velde CJ. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 211-216
- 14 王刚成, 万相斌, 赵玉洲. 低位直肠癌保肛术后吻合口瘘影响因素的Logistic回归分析. 中国现代医药杂志 2007; 9: 45-48
- 15 丁士海, 周宗和. 直肠癌低位切除术后并发吻合口瘘的原因及预防. 实用肿瘤学杂志 2006; 20: 507
- 16 Bucher P, Mermillod B, Morel P, Soravia C. Does mechanical bowel preparation have a role in preventing postoperative complications in elective colorectal surgery? *Swiss Med Wkly* 2004; 134: 69-74
- 17 张建明, 苏艳军, 程若川, 刁畅, 刘其雨, 黄勇. 直肠癌前切除吻合口瘘的原因及防治. 昆明医学院学报 2006; 27: 95-98
- 18 Renner K, Rosen HR, Novi G, Halbling N, Schiessel R. Quality of life after surgery for rectal cancer: do we still need a permanent colostomy? *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1160-1167
- 19 Pollett WG, Nicholls RJ. The relationship between the extent of distal clearance and survival and local recurrence rates after curative anterior resection for carcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1983; 198: 159-163
- 20 Poon RT, Chu KW, Ho JW, Chan CW, Law WL, Wong J. Prospective evaluation of selective defunctioning stoma for low anterior resection with total mesorectal excision. *World J Surg* 1999; 23: 463-467; discussion 467-468
- 21 于滨, 李中信, 马顺茂. 低位直肠癌Dixon术后吻合口瘘的防治体会. 中国综合临床 2007; 23: 644-645
- 22 赵广法. 直肠全系膜切除术后吻合口漏的危险因素分析和对策. 肿瘤 2004; 24: 595
- 23 徐光辉. 直肠癌Dixon术吻合口瘘的防治. 临床医学 2005; 25: 51-53

■同行评价

本文针对直肠癌手术吻合口漏的预防进行选题, 目的性明确, 研究过程清晰, 结论可信, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹秀峰 主任医师
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

曹志成 院士
香港伊丽莎白医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

陈国凤 主任医师
中国人民解放军第302医院感染七科

陈建杰 主任医师
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈亚军 主任医师
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

程斌 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

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

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

管世鹤 副教授
安徽医科大学第一附属医院检验科

郝纯毅 主任医师
北京肿瘤医院肿瘤外科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医院普外科

纪小龙 教授
中国人民解放军武警总医院纳米医学研究所

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘建 教授
首都医科大学附属北京友谊医院院办

刘占举 教授
郑州大学第二附属医院消化内科

钱林学 教授
首都医科大学附属北京友谊医院

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

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王蒙 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

杨维良 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

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

张学 教授
中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系