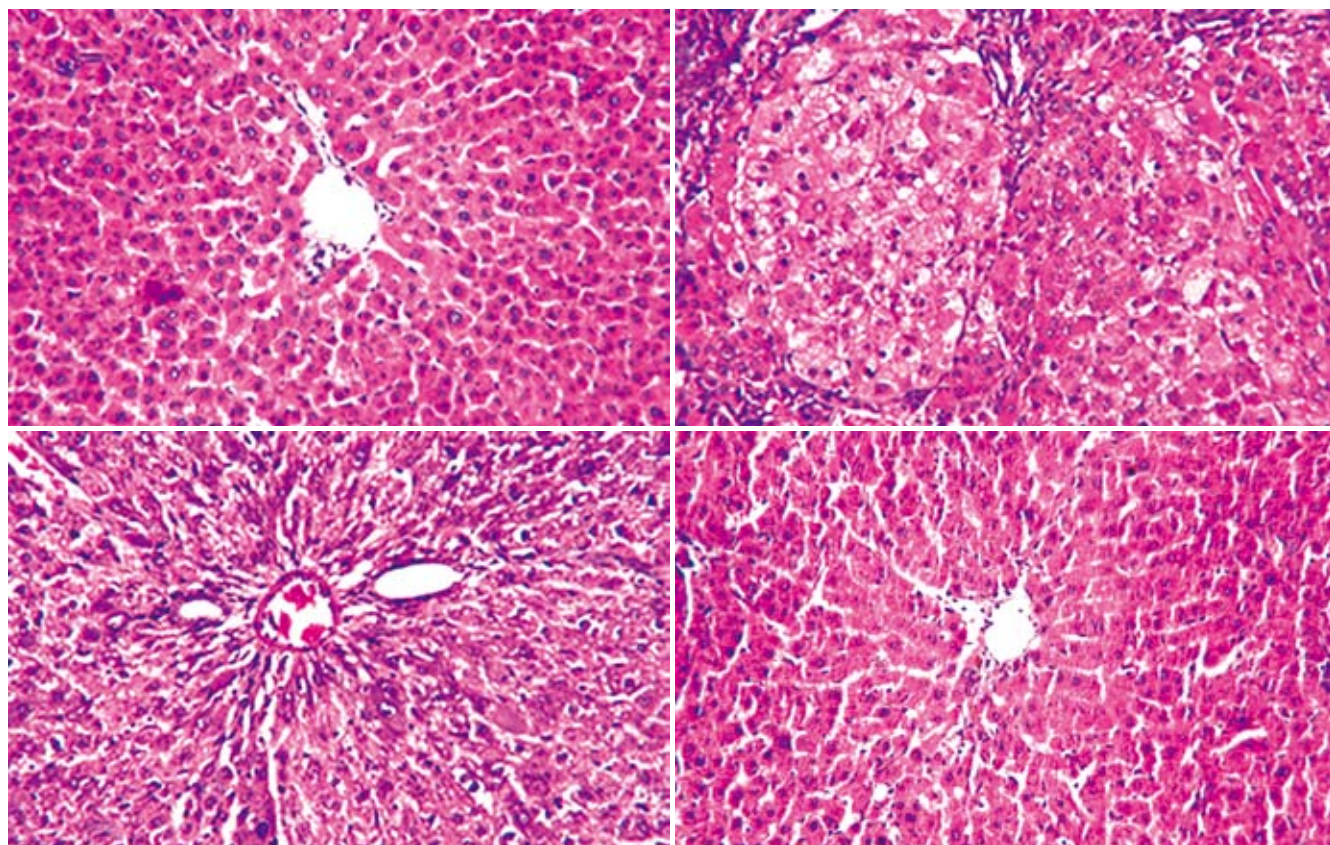


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 11 月 8 日 第 16 卷 第 31 期 (Volume 16 Number 31)



31 / 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
唐笑爱教授
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
李加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
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 11 月 8 日 第 16 卷 第 31 期 (总第255期)

述 评

3477 原发性肝癌的治疗决策

沈世强, 陈祖兵

基础 研究

3480 模拟失重大鼠肝组织中NF- κ B的表达及意义

崔彦, 董家鸿, 张铭, 周金莲, 刘子沛, 王平, 李成林, 张建中

3485 Leptin在大鼠肝缺血/再灌注介导的肠道损伤中的作用

林季, 颜光涛, 薛辉, 郝秀华, 张凯, 王录煊

3492 血管紧张素 II 在大鼠酒精性肝纤维化发病机制中的作用

于继红, 陈玉帅, 林红, 傅宝玉

3498 pGL3-Basic-COX-2-promoter报告基因重组质粒的构建及其功能鉴定

李琦, 周利红, 王炎, 孙珏, 高虹, 范忠泽

3505 含Apoptin基因重组腺病毒的构建及鉴定

陈澍, 金宁一, 李霄, 刘立明, 贾鹏, 刘妍, 高鹏, 陆蕴松, 迟宝荣

临 床 研 究

3510 实时荧光定量RT-PCR对胃癌组织中hPMS2 mRNA的检测及其临床意义

徐光香, 刘希双, 杨堃

3515 Pim-3异常表达在胃癌中的意义

胡志方, 黄缘, 钟琼, 简捷

3519 恩替卡韦治疗非霍奇金淋巴瘤相关性HBV再激活34例

冯洪玲, 唐克诚, 李谦, 袁桂玉, 杨积明

文 献 综 述

3523 肝型脂肪酸结合蛋白研究进展

刘鹏, 陆怀秀, 殷正丰

3528 Survivin在胃癌中的表达及其靶向治疗

丁玉平, 邹赛英, 赵海华

3533 环氧合酶-2在溃疡性结肠炎中的作用

章仲恒, 姜潇, 王建国

研 究 快 报

3539 血容量失血40%大鼠早期口服补液时胃排空率的变化及其影响因素

周国勇, 侯经元, 张立俭, 胡森, 盛志勇

3543 复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响

刘东璞, 卢凤美, 张春斌

3547 一种新的幽门螺杆菌雷贝拉唑耐药相关基因

赵飞, 何利华, 姜葵, 张建中

临 床 经 验

3551 核因子- κ B和血管内皮生长因子在胃癌中的表达及其意义

王海鹏, 田小林, 郭芸

3556 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞HBV DNA载量与其功能的关系

彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 何芳

3561 重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性的变化及其机制

宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 陈秋虹, 黄云花, 梁列新

3566 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义

俞泽元, 高鹏, 申力, 黄海云, 但杰

3571 经导管动脉栓塞治疗急性十二指肠溃疡大出血29例

王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充

	3576 MUTYH基因与结直肠癌发病的关系 佟静, 王炳元 3582 大肠癌患者血清中sIL-2R、IL-8水平变化及其意义 靳胜, 赵有翼 3585 TSLC1和IDAL-1/4.1B在胰腺癌中的表达及其临床意义 刘志清, 赵秋, 李德民, 章华, 王渝, 廖宇圣, 张翠芳, 柯晓煜
致 谢	3590 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3484 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开政策 3491 世界华人消化杂志修回稿须知 3497 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 3504 世界华人消化杂志正文要求 3514 世界华人消化杂志数字用法标准 3532 世界华人消化杂志外文字符标准 3542 世界华人消化杂志名词术语标准 3550 世界华人消化杂志英文摘要要求 3555 世界华人消化杂志计量单位标准 3565 世界华人消化杂志标点符号用法 3570 世界华人消化杂志作者署名要求 3575 世界华人消化杂志参考文献要求 3581 世界华人消化杂志中文摘要要求 3584 世界华人消化杂志投稿方式
封面故事	Ibrahim SS, Nassar NN. Diallyl sulfide protects against <i>N</i>-nitrosodiethylamine-induced liver tumorigenesis: Role of aldose reductase. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(40): 6145-6153 http://www.wjgnet.com/1009-9327/14/6145.asp
本期责任人	编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 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 2008-11-08 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心	编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: 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	国外代号	国内定价	广告经营许可证
		82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

November 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 31

EDITORIAL	3477 Therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma <i>Shi SQ, Chen ZB</i>
BASIC RESEARCH	3480 Expression of nuclear factor-kappa B and its significance in liver tissues of rats during simulated weightlessness <i>Cui Y, Dong JH, Zhang M, Zhou JL, Liu ZP, Wang P, Li CL, Zhang JZ</i> 3485 Role of leptin in hepatic ischemia/reperfusion-induced intestinal injury of rats <i>Lin J, Yan GT, Xue H, Hao XH, Zhang K, Wang LH</i> 3492 Role of angiotensin II in pathogenesis of alcoholic liver fibrosis in rats <i>Yu JH, Chen YS, Lin H, Fu BY</i> 3498 Construction of pGL3-Basic-COX-2-promoter reporter gene vector and detection of its function <i>Li Q, Zhou LH, Wang Y, Sun J, Gao H, Fan ZZ</i> 3505 Construction and identification of the recombinant adenovirus expressing Apoptin gene of chicken anemia virus <i>Chen L, Jin NY, Li X, Liu LM, Jia P, Liu Y, Gao P, Lu YS, Chi BR</i>
CLINICAL RESEARCH	3510 Detection of hPMS2 mRNA in gastric cancer using real-time fluorescent quantitative RT-PCR and its clinical significance <i>Xu GX, Liu XS, Yang K</i> 3515 Significance of aberrant Pim-3 expression in gastric carcinoma <i>Hu ZF, Huang Y, Zhong Q, Jian J</i> 3519 Efficacy of entecavir in treating non-Hodgkin's lymphoma-associated-related HBV reactivation: an analysis of 34 cases <i>Feng HL, Tang KC, Li Q, Yuan GY, Yang JM</i>
REVIEW	3523 Advance in liver-type fatty acid binding protein <i>Liu P, Lu HX, Yin ZF</i> 3528 Survivin expression in gastric carcinoma and its targeted therapy <i>Ding YP, Zou SY, Zhao HH</i> 3533 Role of cyclooxygenase-2 in ulcerative colitis <i>Zhang ZH, Jiang X, Wang JG</i>
RAPID COMMUNICATION	3539 Influencing factors for gastric emptying rate during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss <i>Zhou GY, Hou JY, Zhang LJ, Hu S, Sheng ZY</i> 3543 Effect of Chinese herbs compound <i>Rhodiola sachalinensis</i> on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase1 in fibrotic liver in rats <i>Liu DP, Lu FM, Zhang CB</i> 3547 A novel gene of <i>Helicobacter pylori</i> associated with resistance to rabepazole <i>Zhao F, He LH, Jiang K, Zhang JZ</i>
CLINICAL PRACTICE	3551 Expression and significance of NF-κB and VEGF in gastric carcinoma <i>Wang HP, Tian XL, Guo Y</i> 3556 Relationship between HBV DNA load in monocyte-derived dendritic cells and dendritic cell function in patients with chronic hepatitis B <i>Peng JP, Sun KW, Wu YN, He F</i>

	3561 Alterations of intestinal permeability in chronic severe HBV-infected patients <i>Song HY, Jiang CH, Yang JR, Chen QH, Huang YH, Liang LX</i> 3566 Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human nonalcoholic fatty liver and its clinical significance <i>Yu ZY, Gao P, Shen L, Huang HY, Dan J</i> 3571 Transcatheter arterial embolization for patients with acute massive hemorrhage of duodenal ulcer: an analysis of 29 cases <i>Wang YL, Cheng YS, Zhang JX, Ru FM, Cao CW, Xu JC</i> 3576 Relationship between MUTYH gene and occurrence of colorectal cancer in family clan of familial adenomatous polyposis <i>Tong J, Wang BY</i> 3582 Pre- and post-operative changes and significance of serum sIL-2R and IL-8 in colorectal cancer patients <i>Jin S, Zhao YY</i> 3585 Expression and clinical significance of TSLC1 and DAL-1/4.1B in pancreatic cancer <i>Liu ZQ, Zhao Q, Li DM, Qin H, Wang Y, Liao YS, Zhang CF, Ke XY</i>
ACKNOWLEDGMENT	3590 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Ibrahim SS, Nassar NN.</i> Diallyl sulfide protects against <i>N</i>-nitrosodiethylamine-induced liver tumorigenesis: Role of aldose reductase. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(40): 6145-6153 http://www.wjgnet.com/1009-9327/14/6145.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</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 November 8, 2008

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
 Department of Science and Technology
 of Shanxi Province

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

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

原发性肝癌的治疗决策

沈世强, 陈祖兵

沈世强, 陈祖兵, 武汉大学人民医院普外科 湖北省武汉市 430060

沈世强, 1992年获日本名古屋大学医学部外科博士学位, 教授, 主要从事腹部肿瘤外科, 专于肝癌的基础和临床研究。

通讯作者: 沈世强, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院普外科, swsw2218@hotmail.com

电话: 027-88041911-2212

收稿日期: 2008-06-17 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-08

Therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma

Shi-Qiang Shen, Zu-Bing Chen

Shi-Qiang Shen, Zu-Bing Chen, Department of Surgery, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Shi-Qiang Shen, Department of Surgery, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. swsw2218@hotmail.com

Received: 2008-06-17 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-08

Abstract

Hepatitis B or C virus infection carries a high risk for genesis of hepatocellular carcinoma (HCC). Most of HCC patients were complicated with cirrhosis. The choice of therapeutic modality is depended on tumor location, metastasis and liver function. The only proven potentially curative therapy for HCC are hepatic resection or liver transplantation in highly selected patients. For the patients with non-resectable HCC, chemoembolization and ablation therapy may be used as the primary therapy. Agents for highly advanced HCC should be given based on clinical trials.

Key Words: Primary hepatocellular carcinoma; Hepatectomy; Liver transplantation; Hepatic artery chemoembolization; Ablation therapy

Shi SQ, Chen ZB. Therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3477-3479

摘要

原发性肝癌的病因主要是乙肝病毒及丙肝病毒, 绝大多数肝癌患者合并有肝硬化。治疗手

段的选择取决于肿瘤位置, 转移及肝脏储备功能等因素。在合适的患者中, 原发性肝癌首选治疗为肝切除术或肝移植。对不可手术的肝癌, 则可选择局部消融治疗或肝动脉栓塞化疗。更晚期的患者只能作对症治疗。治疗选择的标准需以临床实验研究为基础。

关键词: 原发性肝细胞癌; 肝切除术; 肝移植; 肝动脉栓塞化疗; 消融治疗

沈世强, 陈祖兵. 原发性肝癌的治疗决策. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3477-3479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3477.asp>

0 引言

据统计, 目前全球每年新患原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者约为626 000, 其中55%发生在我国。我国每年约110 000人死于HCC, 肝癌诊治形势十分严峻^[1]。随着技术进步和治疗经验的积累, HCC的治疗手段不断更新丰富, 有肝切除术、原位肝移植(orthotopic liver transplant, OLT)、肝动脉栓塞化疗术(transcatheterhepatic arterial chemoembolization, TACE)、经皮无水酒精注射(percutaneous ethanol injection, PEI)、射频消融(radio frequency ablation, RFA)、微波消融(microwave coagulation therapy, MCT)、冷冻术、放疗、抗激素疗法、生物治疗及中药治疗等。包括肝切除和肝移植的手术是目前唯一有可能治愈HCC的方法, 选择合适患者行TACE、PEI、RFA、冷冻术等方法均能不同程度上改善不能手术的肝癌患者的预后。如何针对不同的病情, 从多种治疗方法中选择出最合理有效的治疗策略有重要意义。

全球范围内大部分HCC的病因都和乙肝病毒及丙肝病毒相关。在日本和欧美国家, 丙肝病毒为HCC首要病因; 在东南亚和我国, 乙肝病毒为HCC首要病因^[2]。90%左右HCC患者都合并有肝硬化。HCC以小结节的形式发展, 早期并无临床表现, 倍增时间平均为6 mo。HCC治疗手段的选择取决于肿瘤位置、大小、是否转移及肝脏储备功能等因素。目前世界范围内公认HCC首

■背景资料

在我国, HCC患者诊断时多处于中晚期或处于肝功能代偿的临界状态, 与欧美国家的诊疗指南比较起来, 我们的治疗方案更积极。我国每年约110 000人死于HCC, 肝癌诊治形势十分严峻。随着技术进步和治疗经验的积累, HCC的治疗手段不断更新丰富, 选择合适患者行TACE、PEI、RFA、冷冻术等方法均能不同程度上改善不能手术的肝癌患者的预后。

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

■研发前沿

如何针对不同的病情,从多种治疗方法中选择出最合理有效的治疗策略有重要意义。

选治疗为肝切除术和肝移植。若疾病进一步进展,则选择局部微创治疗或TACE。更晚期的患者仅能选择对症治疗。但是治疗方案的选择标准在各个国家和地区有所不同。在我国,HCC患者诊断时多处于中晚期或处于肝功能代偿的临界状态,与欧美国家的诊疗指南比较起来,我们的治疗方案更积极。

1 肝切除术

美国NCCN指南认为,无肝硬化背景的HCC应施行肝切除术,而对有肝硬化背景的HCC,肝切除术的最好适应证是位于外周且肝功能良好(Child-Pugh A级)的小肝癌^[3]。英国胃肠学会发布的指南认为,任何单发小肝癌(≤ 5 cm)患者都应到能够行肝切除术或肝移植术的单位进行外科治疗的评估,肝切除只适用于肝功能优良(Child-Pugh A)的患者^[4]。中华外科学会肝脏外科学组推荐的肝癌根治性切除适应证为:(1)肝功能分级属A级或能恢复到A级;(2)肝储备功能基本在正常范围以内;(3)受肿瘤破坏的肝组织 $<30\%$ 或无瘤侧肝脏达全肝组织的50%以上^[5]。这表明国内的肝癌肝切除的适应范围较欧美等西方国家要宽泛。我国是HCC高发国,临床上大量面对大肝癌及肝功能不全的情况。我国的外科医生常常将进展期肝癌(>5 cm)及肝功能分级属A级或能恢复到A级纳入手术切除的范围是一种必然的选择。

最近有一项多中心的研究比较了美国、法国和日本的肝癌肝切除术的疗效,尽管在肿瘤大小及肝硬化的严重程度有很大不同,但术后5年生存率并没有显著不同(分别为31%, 31%, 41%)^[6]。最近日本的一项调查显示肝癌肝切除手术死亡率为0.9%, 5年生存率51%^[7]。国内吴孟超报道6446例肝癌肝切除术5年生存率为53.2%。其中10 cm以上的HCC切除术1317例,其1、3、5年总体生存率分别为73.8%、48.0%和36.9%^[8]。国内对巨大肝癌合并有门脉主干癌栓或下腔静脉癌栓或胆管癌栓的患者,也行肿瘤切除+门静脉或下腔静脉或胆管切开取栓术,获得肿瘤及癌栓的完整切除,术后联合消融治疗、TACE或免疫治疗等处理,其疗效还在进一步观察中。

肝癌切除后剩下的肝脏仍有发生恶变的可能,术后随访5年的复发率为50%-60%。术后复发再次手术肝功能衰竭的风险较大,国外认为局部消融治疗和TACE是更合理的选择,但目前国内对合适病例仍倾向首选手术切除。在2项大样本随机对照研究(randomized control trials, RCT)和5项临床对照研究中,肝切除术后行TACE能减少

肿瘤复发延长生存时间^[9]。

2 肝移植术

最初行肝癌肝移植的5年生存率较差,一般低于50%,主要是由于肿瘤的复发。现行研究表明这是由于对肝移植的患者挑选不当造成的。现在公认按Milan标准挑选:单个肿块直径 ≤ 5 cm,或不多于3个肿块且直径 ≤ 3 cm的,并以影像学证实无血管侵犯,复发的几率几乎为零,并且肝移植的预后和那些仅有基础肝病而无肝癌的患者预后相似^[10-11]。肝移植短期生存率类似于肝癌切除术;然而在无瘤生存方面,肝移植占有明显的优势。最近有研究按单个肿块直径 ≤ 6.5 cm的标准挑选行肝移植结果表明预后与Milan标准类似^[12]。

目前公认肝移植是治疗HCC的最佳选择,但有许多困难限制着肝移植的广泛开展,如供肝的短缺、费用的高昂等。鉴于此种情况,我们认为肝移植术比较适合早期肝癌伴有肝硬化、肝功能失代偿而不适合手术切除或微创治疗者。

3 局部消融治疗

美国NCCN指南认为局部消融治疗和肝动脉栓塞化疗是无法手术肝癌患者的合理选择^[3]。而局部消融治疗相对于TACE而言对肝癌患者仍存在治愈的机会。中华外科学会肝脏外科学组认为局部消融治疗适宜于:(1)肝切除术后近期复发的肝癌;(2)单个肿瘤,或癌灶在5个以内,肿瘤直径 <5 cm,伴有严重的肝硬化,肝功能分级属A级或B级^[5]。

局部消融治疗中PEI最先应用到临床,其创伤小,但作用范围受酒精弥散能力局限且分布不均,易被瘤组织内的纤维间隔阻挡,需反复多次治疗。RFA是一项较新的技术,单个的探针可以破坏直径 ≤ 3 cm的病灶,而一种新开发的多探头探针可用于治疗直径约6 cm的病灶。在一项102例对EPI或RFA的进行比较的临床随机研究中:RFA显著延长无瘤,但在总生存时间上并无差异。另一项临床随机研究中比较RFA及MCT,在生存时间上并无区别,只是MCT次数多些^[13]。我们的资料表明,对于大肝癌病例,RFA联合肝动脉门静脉化疗更有助于延长生存期^[14]。

对于早期肝癌,局部消融治疗疗效可与肝切除术类似。746例PEI治疗直径 <5 cm的肿瘤的大宗样本显示,肝硬化Child A级的患者(239例)的3年和5年生存率分别为79%和47%,而Child B级的患者(149例)则分别为63%和29%^[15]。

■相关报道

国内吴孟超报道6446例肝癌肝切除术5年生存率为53.2%。其中10 cm以上的HCC切除术1317例,其1、3、5年总体生存率分别为73.8%、48.0%和36.9%。

4 肝动脉栓塞化疗

中华外科学会肝脏外科学组认为TACE适应:(1)肝功能分级属A级或B级;(2)无法手术治疗;(3)肝癌肝切除术后肿瘤复发。原则上可切除的肝癌术前不作放射介入治疗^[5]。TACE是使肝癌肿瘤的动脉血供栓塞阻断,并使瘤细胞短时间内暴露在冲击性高浓度的化疗药物下的方法。

一项包括9项RCT的Meta分析证实了TACE提高生存时间。在另一项包括3项RCT的共412例患者的Meta分析中TACE和肝动脉栓塞术(TAE)在生存时间并没有差异^[16]。在另一项包括4项RCT的Meta分析中TACE联合局部消融治疗比任何单个治疗能显著延长生存时间。有2项RCT和13项非随机临床研究显示在肝切除前行TACE并不能减少肿瘤复发,也不能延长生存时间。相反在2项RCT和5项临床对照研究中,肝切除术后行TACE能减少复发延长生存时间^[9]。

5 其他治疗

应用放射治疗、生物治疗、激素治疗等方法治疗HCC也取得进展,但只是用于临床研究或缓解症状对症治疗。任何治疗的疗效必需以临床实验为基础。全身化疗在肝癌治疗中的作用是非常局限的。常用的药物是阿霉素,其有效率仅10%-15%^[17]。一些具有更大破坏性的多药联合化疗方案不能提高有效率,反而可能会降低受治患者的生存率。大的随机化实验显示在治疗无法手术的肝癌患者中他莫昔芬并不能提高生存率^[18]。另一项随机对照试验表明, α 干扰素也不能提高生存率,反而产生更多的副反应^[19]。目前寄希望最大的肝癌的基因治疗仍在研究中。

6 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134
- 3 Guideline NCP. Hepatobiliary Cancers. NCCN org online. 2007-10, cited 2008-10; 1(1): 24 screens. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/hepatobiliary.pdf
- 4 Ryder SD; British Society of Gastroenterology. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. *Gut* 2003; 52: iii1-iii8
- 5 中华外科学会肝脏外科学组. 原发性肝癌外科治疗方法的选择. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 698-700
- 6 Esnaola NF, Mirza N, Lauwers GY, Ikai I, Regimbeau JM, Belghiti J, Yamaoka Y, Curley SA,

- Ellis LM, Nagorney DM, Vauthey JN. Comparison of clinicopathologic characteristics and outcomes after resection in patients with hepatocellular carcinoma treated in the United States, France, and Japan. *Ann Surg* 2003; 238: 711-719
- 7 Makuuchi M, Sano K. The surgical approach to HCC: our progress and results in Japan. *Liver Transpl* 2004; 10: S46-S52
- 8 吴孟超, 吴东. 原发性肝癌综合治疗的现状与展望. *癌症进展* 2005; 3: 410-412
- 9 Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Yu D, Meyer T, Patch DW, Burroughs AK. Treatment outcomes for hepatocellular carcinoma using chemoembolization in combination with other therapies. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 594-606
- 10 Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-699
- 11 Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Löscher C, Beckebaum S, Broelsch CE, Lang H. Meta-analysis of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma based on 1, 198 cases. *Eur J Med Res* 2007; 12: 527-534
- 12 Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-1403
- 13 Galandi D, Antes G. Radiofrequency thermal ablation versus other interventions for hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD003046
- 14 Shen SQ, Xiang JJ, Xiong CL, Wu SM, Zhu SS. Intraoperative radiofrequency thermal ablation combined with portal vein infusion chemotherapy and transarterial chemoembolization for unresectable HCC. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1403-1407
- 15 Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, Pompili M, Brunello F, Lazzaroni S, Torzilli G. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995; 197: 101-108
- 16 Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Tibballs J, Meyer T, Patch DW, Burroughs AK. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 6-25
- 17 Schachschal G, Lochs H, Plauth M. Controlled clinical trial of doxorubicin and tamoxifen versus tamoxifen monotherapy in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 281-284
- 18 Nowak A, Findlay M, Culjak G, Stockler M. Tamoxifen for hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD001024
- 19 Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol* 2001; 34: 593-602

■同行评价

本文较为简明的论述了目前原发性肝癌的治疗选择,基本上反映了国内外肝癌治疗的主流意见,文中还将中华外科学会肝脏外科学组推荐的肝癌治疗选择标准与国外的指南做了比较,对读者了解、比较国内外的学术观点与特色,以及国内外肝癌治疗效果存在差异的原因等有裨益。

模拟失重大鼠肝组织中NF- κ B的表达及意义

崔彦, 董家鸿, 张铭, 周金莲, 刘子沛, 王平, 李成林, 张建中

■背景资料

机体在失重环境中受到瀑布式的直接和间接的失重应激作用, 正常生理机能受到影响。近年来, 我国航天事业迅猛发展, 航天员特殊训练和载人航天飞行的成功及后续重大任务对航天医学提出了新的要求, 但迄今国内尚未见有关失重和模拟失重应激环境下肝脏生理和病理研究的报道。

崔彦, 董家鸿, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 重庆市 400038

崔彦, 刘子沛, 王平, 李成林, 中国人民解放军第306医院普通外科 北京市 100101

张铭, 周金莲, 张建中, 中国人民解放军第306医院病理科 北京市 100101

崔彦, 1987年湖南医科大学硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病的临床与基础研究。

全军“11.5”计划面上基金资助项目, No. 06MA005

作者贡献分布: 此课题由崔彦, 董家鸿及李成林设计; 研究过程主要由崔彦, 张铭及周金莲完成, 刘子沛, 王平及李成林协助; 论文写作由崔彦完成; 实验及论文修改中董家鸿与张建中提供技术指导。

通讯作者: 崔彦, 100101, 北京市朝阳区安翔里9号, 中国人民解放军第306医院普通外科. dryancui@yahoo.com.cn
电话: 010-66356138

收稿日期: 2008-09-25 修回日期: 2008-10-16

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-08

Expression of nuclear factor-kappa B and its significance in liver tissues of rats during simulated weightlessness

Yan Cui, Jia-Hong Dong, Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Zi-Pei Liu, Ping Wang, Cheng-Lin Li, Jian-Zhong Zhang

Yan Cui, Jia-Hong Dong, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Yan Cui, Zi-Pei Liu, Ping Wang, Cheng-Lin Li, Department of General Surgery, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China

Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Jian-Zhong Zhang, Department of Pathology, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China

Supported by: the Grant from the Chinese PLA General Project during the 11th Five-Year Plan Period, No. 06MA005

Correspondence to: Professor Yan Cui, Department of General Surgery, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China. dryancui@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-25 Revised: 2008-10-16

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in liver tissues of rats under the condition of simulated weightlessness.

METHODS: Eighty-four male adult Wistar rats weighing 280-310 g were randomly assigned to simulated weightlessness group and control group, each with 7 subgroups from 1 to 7 ac-

cording time sequence in day unit. Tail-suspension was used to simulate the weightlessness condition. The expression of NF- κ B p65 was detected by Western blotting analysis and PV-6001 immunohistochemistry respectively.

RESULTS: The tail-suspended rats were upset at the beginning, and seemed adapted to the microgravity condition after 2 to 3 days. Tail-suspension significantly increased liver NF- κ B expression in rats, as compared with the controls ($F = 271.36$, $P < 0.01$), with peak expression on day 1 and 2, followed by a gradual decline to the normal level on day 5, 6 and 7 ($F = 60.68$, $P < 0.05$). NF- κ B expression stained as brown particles was mainly detected in rat hepatocytes, also in the infiltrated cells and Kupffer cells. There were three types of intracellular expression according to the location of positive NF- κ B particles, i.e. cytoplasm, nucleus, and cytoplasm plus nucleus, existing alone or co-existing in rat liver.

CONCLUSION: Simulated weightlessness, especially in the early stage, acts as a kind of stress to induce the activation of NF- κ B in liver tissues of rats, suggesting that NF- κ B plays an important role in the cascade reactions and adaptation to the weightlessness stress.

Key Words: Simulated weightlessness; Wistar rat; Liver; Nuclear factor-kappa B; Western blotting; Immunohistochemistry

Cui Y, Dong JH, Zhang M, Zhou JL, Liu ZP, Wang P, Li CL, Zhang JZ. Expression of nuclear factor-kappa B and its significance in liver tissues of rats during simulated weightlessness. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3480-3484

摘要

目的: 研究模拟失重环境下大鼠肝脏组织中NF- κ B的表达及意义。

方法: 成年♂Wistar大鼠84只, 随机分为模拟失重组和对照组, 每组又分别设1、2、3、4、5、6和7 d共7个时相点, 每时相点模拟失重和同步对照各6只大鼠。采用尾悬吊法建立模拟

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

失重动物模型. 各组大鼠肝组织中NF- κ B表达分别应用Western blot和免疫组化PV-6001法进行检测.

结果: 在尾悬吊1-2 d期间, 大鼠焦躁不安, 饮食量减少, 精神较差, 活动减弱, 2-3 d后有所适应, 逐渐恢复稳定状态. 模拟失重环境下大鼠肝脏NF- κ B表达水平明显升高, 1、2 d悬尾组大鼠肝组织中NF- κ B表达率明显高于对照组($F = 271.36, P < 0.01$), 其后, NF- κ B表达水平呈明显下降趋势($F = 60.68, P < 0.05$), 5-7 d悬尾组NF- κ B表达水平接近对照组, 差异无统计学意义. NF- κ B阳性产物主要见于实验大鼠肝细胞内, 亦见于炎细胞及Kupffer细胞内, 可分为胞质型、核型、核浆型等三个类型, 单独或混合存在.

结论: 模拟失重使大鼠肝脏组织中NF- κ B表达发生明显变化, 提示在失重环境中肝脏NF- κ B的早期高表达和逐渐恢复过程与失重应激反应及失重耐受有密切关系.

关键词: 模拟失重; 大鼠; 肝脏; 核因子 κ B; 蛋白免疫印迹法; 免疫组化

崔彦, 董家鸿, 张铭, 周金莲, 刘子沛, 王平, 李成林, 张建中. 模拟失重大鼠肝组织中NF- κ B的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3480-3484
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3480.asp>

0 引言

微重力环境对于机体来说, 是一种特殊类型的不良刺激. 机体在失重环境中发生诸多变化, 导致一系列病理生理改变^[1]. 肝脏受到瀑布式的直接和间接的失重应激作用, 正常生理机能受到影响. Merrill *et al*^[2]研究搭乘Cosmos 2044生物卫星大鼠的肝脏, 发现失重可对肝脏的蛋白质、糖原及多种酶的代谢产生重要影响. Abraham *et al*^[3]研究搭乘苏联Cosmos 936生物卫星的大鼠, 发现肝脏的部分代谢酶水平发生变化, 但短期后即能恢复. Rivera *et al*^[4]进行地面模拟失重动物实验, 发现微重力环境下胃肠道蠕动缓慢, 菌群移位, 黏膜屏障发生障碍, 导致内毒素成分进入门静脉而对肝脏造成损伤. 近年来, 我国航天事业迅猛发展, 航天员特殊训练和载人航天飞行的成功及后续重大任务对航天医学提出了新的要求, 但迄今国内尚未见有关失重和模拟失重应激环境下肝脏生理和病理研究的报道^[5]. 本研究通过尾悬吊法模拟失重动物实验, 观察实验大鼠肝脏组织中NF- κ B表达特性, 探讨失重

环境对肝脏造成的影响及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年健康♂Wistar大鼠84只, 体重280-310 g, 由中国农业大学实验动物研究所提供. NF- κ B mAb(Sigma, USA), GAPDH(Ambion, USA), 碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠IgG(GAR-AP, Zymed, USA). NF- κ B p65 mAb(Santa Cruz, USA), PV-9000即用型二步法检测盒(北京中山生物技术有限公司). NBT(Sigma, USA), BCIP(Sigma, USA), DTT(Sigma, USA), PVDF膜(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), TEMED(Sigma, USA). 转膜仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 低温离心机5810R(Eppendorf, Hamburg, Germany), 微型高速离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany), 垂直电泳槽(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 琼脂糖水平电泳槽(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 凝胶成像系统(AlphaImager™ 2200, USA).

1.2 方法

1.2.1 分组: 大鼠适应饲养1 wk后进行实验. 随机分为模拟失重组和对照组, 每组又分别设1、2、3、4、5、6及7 d共7个时相点, 每时相点模拟失重和同步对照各6只大鼠.

1.2.2 造模与取材: 参照陈杰 *et al*的方法采用尾悬吊法建立模拟失重大鼠模型^[6]. 大鼠单笼饲养, 实验组大鼠尾部悬于笼顶, 前肢踏于笼底. 对照组大鼠置于相同鼠笼中, 自由活动. 所有大鼠可自由进食、饮水. 动物室温度保持在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天灯光照明12 h与黑暗交替循环, 保持适当湿度及通风条件. 各时相点实验结束时, ip戊巴比妥钠(45 mg/kg)将实验及对照动物麻醉, 无菌操作, 经腹正中中线剖腹, 取肝右叶组织保存于液氮中, 左叶肝组织浸入40 g/L中性甲醛中固定.

1.2.3 Western blot检测大鼠肝组织NF- κ B蛋白表达: (1)蛋白质提取: 从液氮中取出肝组织, 放入玻璃匀浆器中, 加入200 μL 细胞裂解液, 在冰上将组织制成匀浆并在液氮中反复冻溶裂解细胞3-5次, 然后转移至离心管中, 4°C 高速离心(12 000 r/min)80 min. 吸出上清液, 分装, -80°C 保存备用; (2)加样, 电泳, 160 V, 1 h; (3)转膜: 电泳完毕后切取60-94 kDa和27-45 kDa区, 转膜液浸泡20 min, 转膜100 V, 100 min; (4)免疫反应: 水平摇床上用TBST浸泡PVDF膜10 min, 室温下脱色摇床上摇动封闭1-3 h, 用TBS稀释一抗NF- κ B 1 : 200, GAPDH 1 : 10000, 与PVDF膜一起

■研发前沿

NF- κ B控制着大量基因的激活, 介导多种炎性介质和急性期反应蛋白等的转录表达, 参与细胞凋亡的调控. NF- κ B在机体应激反应过程中的重要作用及机制是目前研究的热点问题.

■相关报道

研究尾悬吊模拟失重大鼠肝脏组织中NF- κ B的表达特点并探讨其作用机制, 国内外尚未见类似研究报道.

■创新盘点

本研究应用Western blot和免疫组化PV-6001法研究模拟失重大鼠肝脏组织中NF- κ B表达特性,发现在模拟失重环境中实验大鼠肝脏NF- κ B表达发生明显变化,其早期高表达及渐降过程与失重应激反应和失重耐受有一定关系。

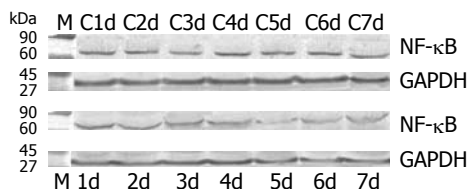


图1 Western blot半定量检测悬吊大鼠肝脏NF- κ B p65蛋白水平的变化。M: Marker。

4℃条件下摇动孵化过夜。然后用TBST在脱色摇床上洗10 min $\times$ 3次。加TBS稀释碱性磷酸酶标记的二抗与PVDF膜在常温下孵育2-3 h, 继用TBST在脱色摇床上洗10 min $\times$ 3次; (5)显色: 用碱性磷酸酶底物BCIP/NBT显色10 min。

1.2.4 免疫组化检测大鼠肝组织NF- κ B表达: (1)免疫组化PV-6001法: 常规切片, 脱蜡至水; 3%过氧化氢室温10 min以阻断内源性过氧化物酶; PBS冲洗3 min $\times$ 3次, 枸橼酸钠高压锅热修复2 min后自然冷却, PBS洗3 min $\times$ 3次; 加入一抗NF- κ B(1:100)于湿盒中4℃过夜; PBS洗3 min $\times$ 3次, 加入辣根酶羊抗兔多聚体, 室温30 min; PBS洗3 min $\times$ 3次; 染色按照PV-9000即用型二步法检测盒说明进行操作。用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照; (2)NF- κ B阳性表达判定: 以细胞核和(或)胞质中有明显的棕黄色颗粒为阳性。每张切片随机计数5个高倍视野($\times$ 400)下的阳性细胞数, 切片边缘视野不计, 以排除“边缘效应”的干扰。阳性指数以NF- κ B阳性细胞占所有细胞的百分率(%)表示。

统计学处理 数据以mean $\pm$ SD表示, 结果用SPSS11.0统计软件进行 t 检验和方差分析。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物情况 本研究各组动物在实验期间无死亡。在尾悬吊1-2 d, 大鼠焦躁不安, 饮水量减少, 精神较差, 活动减弱, 2-3 d后有所适应, 逐渐恢复稳定状态。

2.2 Western blot检测结果 肝组织中NF- κ B的Western blot分析结果表明, 各实验组及对照组大鼠肝脏组织中均可检测到70 kDa的NF- κ B表达(图1)。与对照组比较, 模拟失重1 d组大鼠肝脏组织中NF- κ B蛋白水平显著升高, 并形成高峰, 差异有统计学意义($F_{\text{方差值}} = 13.27, P<0.05$)。随着模拟失重时间的延长, NF- κ B蛋白表达水平呈下降趋势, 其中3-5 d组NF- κ B仍在较高水平表达, 与对照组相比差异不显著。而6-7 d组NF- κ B表达

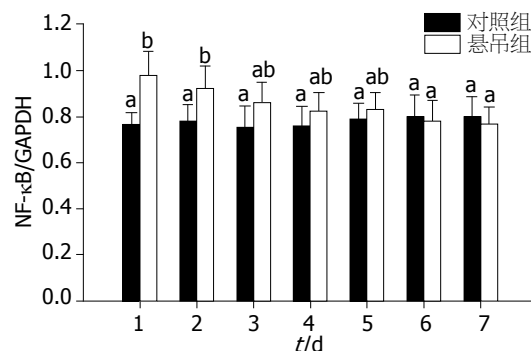


图2 各组大鼠肝脏NF- κ B/GAPDH的灰度比值, 字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

则低于正常对照, 差异无统计学意义(图2)。

2.3 NF- κ B免疫组化结果 NF- κ B阳性产物主要见于实验大鼠的肝细胞内, 亦可见于炎细胞及Kupffer细胞内。棕黄色颗粒状的NF- κ B表达位于细胞质及细胞核中, 分布不均, 呈单个散在或小片状分布, 可分为胞质型、核型、核浆型等三个类型, 单独或混合存在。在肝细胞核型表达阳性中, 可见全核阳性者, 也可见局部碎片状阳性者, 且主要位于核仁区(图3)。结果显示, 1、2 d悬尾组大鼠肝组织中NF- κ B表达率明显高于对照组($F_{\text{方差值}} = 271.36, P<0.01$), 随着模拟失重时间的延长, NF- κ B表达水平呈明显下降趋势($F_{\text{方差值}} = 60.68, P<0.05$), 5-7 d悬尾组NF- κ B表达水平接近对照组, 差异无统计学意义(图4)。

3 讨论

NF- κ B是Sen和Baltimore于1986年首先报道从B淋巴细胞核抽提物中检出的可与免疫球蛋白轻链基因增强子 κ B序列特异结合的核蛋白因子^[7]。NF- κ B广泛存在于真核细胞内, 属于Rel蛋白家族, 为二聚体蛋白分子, 包含多种亚单位结构, NF- κ B p65是其主要成员之一, 表达最广泛, 相对稳定, 生物活性最强。NF- κ B调控大量基因的表达与活性, 介导多种炎性介质和急性期反应蛋白等的转录表达, 参与细胞凋亡的调节, 具有多向性特征。通常情况下, 细胞内NF- κ B与I κ B抑制蛋白结合在一起, 处于失活状态。多种因素可激活NF- κ B, 活化后的NF- κ B从细胞质转移到细胞核内的DNA特定黏附部位, 进而启动和调控转录程序, 发挥生物学效应^[7-9]。

研究发现, NF- κ B与肝脏的多种病变相关, 在肝脏的急性损伤过程中发挥重要作用^[10]。杨文军 *et al*^[11]报道大鼠创伤性炎症肝脏损伤后NF- κ B活性明显升高, 与肝脏结构和功能改变基本

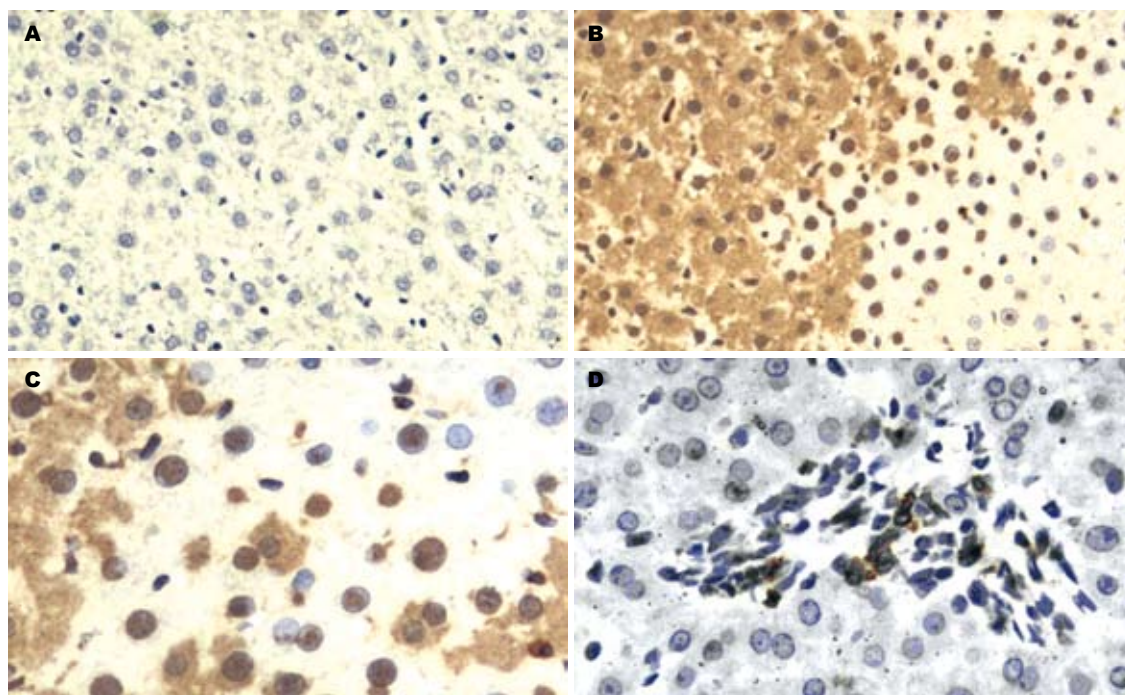


图3 模拟失重大鼠肝脏NF- κ B表达的影响(PV-6001). A: 对照组($\times 100$); B: NF- κ B高表达, 核浆型, 悬吊1 d组所见($\times 100$); C: 肝细胞中NF- κ B核型表达, 可见全核阳性及局部碎点状阳性者, 主要位于核仁区($\times 200$); D: NF- κ B阳性产物亦可见于炎细胞和Kupffer细胞内($\times 200$).

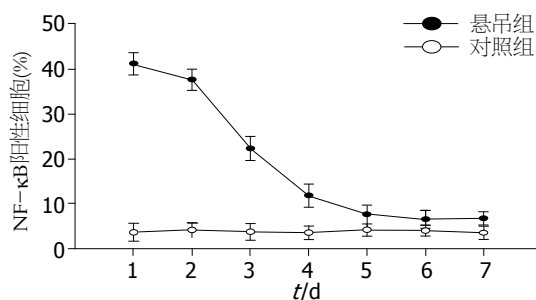


图4 各组NF- κ B免疫组化结果比较(mean $\pm$ SD).

一致. Salazar-Montes *et al*^[12]研究发现肝脏急性损伤30 min后NF- κ B即被激活. 王春妍 *et al*^[13]研究认为, NF- κ B通过调控其下游基因加重肝脏损伤.

失重和模拟失重环境下肝脏NF- κ B的表达特征如何? 国内外尚未见研究报道. 本实验结果发现, 在模拟失重早期(48 h内), 大鼠肝组织中NF- κ B表达水平明显升高, 应用Western blot半定量检测和免疫组化PV6001组织染色的结果一致. 分析NF- κ B的这种变化, 可能缘自失重环境所造成的肝脏分子水平的应激反应. Wise *et al*^[14]的研究表明, 微重力环境引起脑组织氧化应激(oxidative stress)并活化NF- κ B, 引发转录因子高表达. 近期还有学者研究发现, NF- κ B在模拟失重小鼠睾丸组织中表达异常, 伴随睾丸重量减轻和睾酮水平下降的同时, NF- κ B以及

■应用要点

本研究为进一步探讨失重和模拟失重环境对肝脏的影响奠定基础, 为航天员特殊强化训练及航天飞行过程中的有害因素防护及保健提供理论基础.

Caspase-8和Caspase-3的表达水平明显升高, 认为失重环境导致NF- κ B及Caspase-8、Caspase-3过度活化进而激活了与细胞凋亡有关的信号通路^[15]. 显然, 模拟失重环境下肝组织NF- κ B高表达应是肝脏失重应激反应的一部分, 对NF- κ B高表达是否导致肝脏细胞凋亡笔者将做进一步研究. 本实验还发现, 在尾悬吊初期, 大鼠焦躁不安, 饮水量减少, 精神较差, 活动减弱, 而24-48 h后则有所适应, 逐渐恢复稳定状态, 这一现象与肝组织中NF- κ B表达先升后降的结果似乎同步, 提示肝脏NF- κ B表达在失重耐受(microgravity tolerance)过程中亦可能发挥一定作用. 理论上推测, NF- κ B表达及基因调控对失重应激环境可形成一种应激耐力, 此机制是否成立及其在航天员强化训练中的意义则有待深入研究.

本研究结果显示, 实验大鼠肝组织中NF- κ B阳性产物主要见于肝细胞, 亦见于炎细胞及Kupffer细胞. 笔者依据NF- κ B在细胞内表达部位的不同而将其分为胞质型、核型、核浆型等三种类型, 各种类型可单独或混合存在. 在核型NF- κ B阳性表达类型中, 可见全核阳性者, 也可见局部碎点状阳性者, 且主要位于核仁区. 分析认为, NF- κ B在肝脏细胞内的分布及其表达特征说明了NF- κ B的应激活化和发挥生物学效应的程序、部位、强度及消长过程; 核仁是rRNA基

■同行评价

本文立意新颖,设计合理,结果可信,对我国航空航天员的合理训练可能有一定的指导作用。

因存储、rRNA合成加工以及核糖体亚单位的装配场所, NF- κ B在核仁功能区染色形态的不同,可能涉及失重应激反应的程度及时相效应,与NF- κ B功能演变和对靶基因信息转录的调控力度有关。

总之,在失重应激环境中,肝脏乃至机体全身的应激损伤、保护与适应,基因调控过程的启动、瀑布效应与反馈等机制,显然是一个十分复杂的系统, NF- κ B在其中发挥的具体作用以及所涉及的其他介导因素,尚需要进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Graebe A, Schuck EL, Lensing P, Putcha L, Derendorf H. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 837-853
- 2 Merrill AH Jr, Wang E, LaRocque R, Mullins RE, Morgan ET, Hargrove JL, Bonkovsky HL, Popova IA. Differences in glycogen, lipids, and enzymes in livers from rats flown on COSMOS 2044. *J Appl Physiol* 1992; 73: 142S-147S
- 3 Abraham S, Lin CY, Volkmann CM, Klein HP. Biochemical changes in rat liver after 18.5 days of spaceflight. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 334-339
- 4 Rivera CA, Tchamitchi MH, Mendoza L, Smith CW. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1656-1663
- 5 沈羨云, 王林杰. 我国失重生理学研究进展. *航天医学与医学工程* 2008; 21: 182-187
- 6 陈杰, 马进, 丁兆平, 张立藩. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型. *空间科学学报* 1993; 2: 159-162
- 7 Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- 8 Leeman JR, Gilmore TD. Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway. *Gene* 2008; 423: 97-107
- 9 苏剑东, 吴灵飞. NF-kappaB与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1411-1416
- 10 Czaja MJ. Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 378-389
- 11 杨文军, 余正平, 张启瑜, 宋其同, 梁华平, 徐祥, 朱冠保, 施红旗, 蒋飞照. 核因子- κ B活性在创伤性炎症大鼠肝脏损伤中的变化及其意义. *肝胆胰外科杂志* 2006; 18: 13-15
- 12 Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, Sandoval-Rodriguez A, Lopez-Reyes A, Armendariz-Borunda J. Increased DNA binding activity of NF-kappaB, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5995-6001
- 13 王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海. 核因子-kappa B及其下游因子TNF-alpha、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2804-2808
- 14 Wise KC, Manna SK, Yamauchi K, Ramesh V, Wilson BL, Thomas RL, Sarkar S, Kulkarni AD, Pellis NR, Ramesh GT. Activation of nuclear transcription factor-kappaB in mouse brain induced by a simulated microgravity environment. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; 41: 118-123
- 15 Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Ravichandran P, Sadanandan B, Ramesh V, Thomas R, Hall JC, Wilson BL, Ramesh GT. Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis. *Mol Cell Biochem* 2008; 313: 71-78

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 2008-11-08)

Leptin在大鼠肝缺血/再灌注介导的肠道损伤中的作用

林季, 颜光涛, 薛辉, 郝秀华, 张凯, 王录焕

林季, 颜光涛, 薛辉, 郝秀华, 张凯, 王录焕, 中国人民解放军总医院生化研究室 北京市 100853

林季, 医学博士, 助理研究员, 主要从事消化系创伤后内源性促修复机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30670821

中国人民解放军总医院苗圃基金资助项目, No. 06MP83

作者贡献分布: 此课题由颜光涛设计; 研究过程由林季, 颜光涛, 薛辉, 郝秀华, 张凯及王录焕操作完成; 部分试剂由张凯与王录焕提供; 数据分析由林季, 薛辉及郝秀华完成; 论文写作由林季与颜光涛完成。

通讯作者: 颜光涛, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院生化研究室. yan301@263.net

电话: 010-66937072 传真: 010-68176512

收稿日期: 2008-09-04 修回日期: 2008-10-11

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Role of leptin in hepatic ischemia/reperfusion-induced intestinal injury of rats

Ji Lin, Guang-Tao Yan, Hui Xue, Xiu-Hua Hao, Kai Zhang, Lu-Huan Wang

Ji Lin, Guang-Tao Yan, Hui Xue, Xiu-Hua Hao, Kai Zhang, Lu-Huan Wang, Research Laboratory of Biochemistry, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670821; and the Nursery Fund of General Hospital of Chinese PLA, No. 06MP83

Correspondence to: Professor Guang-Tao Yan, Research Laboratory of Biochemistry, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. yan301@263.net

Received: 2008-09-04 Revised: 2008-10-11

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To explore the changes of leptin in intestinal tract following hepatic ischemia/reperfusion (H-I/R), to investigate the association between these changes and H-I/R-induced intestinal injury, and to find out the role of leptin in H-I/R-induced intestinal injury.

METHODS: A 70% H-I/R model of rats was established, forming 5 groups including sham-operation and injury ones based on different reperfusion time. Enzyme-colorimetry was used to detect serum diamine oxidase activity after injury, hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry were applied to investigate pathological variations and leptin protein ex-

pressions in duodenum after injury, respectively, while reverse transcriptase-PCR was used to detect leptin mRNA expressions in duodenum after injury.

RESULTS: Compared with sham-operation group after injury, the four reperfusion groups showed no significant difference in serum diamine oxidase activity, but serum diamine oxidase level was significantly higher in 60 min ischemia/60 min reperfusion (I60'R60') group than in I60'R360' group ($P = 0.0077$). Pathological investigation suggested that duodenal impairments at the early phase of H-I/R were more serious, while the impairments at the later phase lessened gradually. Compared with leptin protein expression in duodenum of sham-operation group after injury, that of I60'R240' and I60'R360' groups increased significantly (0.126503 ± 0.005873 , 0.129458 ± 0.003755 vs 0.079269 ± 0.001995 , both $P < 0.01$), and the levels of reperfusion groups decreased in such order as I60'R360', I60'R240', I60'R60' and I60'R150' groups. Compared with leptin mRNA expression in duodenum of sham-operation group after injury, that of I60'R150' group decreased significantly (0.944 ± 0.033 vs 1.022 ± 0.011 , $P = 0.049$), and it was significantly lower than the level of I60'R360' group.

CONCLUSION: The expression changes of leptin in intestinal tract after H-I/R are closely associated with intestinal injury, suggesting that leptin may be a protective factor of resisting H-I/R-induced intestinal injury.

Key Words: Leptin; Reperfusion injury; Liver; Duodenum; Recovery of function; Homeostasis

Lin J, Yan GT, Xue H, Hao XH, Zhang K, Wang LH. Role of leptin in hepatic ischemia/reperfusion-induced intestinal injury of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3485-3491

摘要

目的: 研究瘦素(leptin)在肝缺血/再灌注(H-I/R)后肠道内的表达变化, 并探讨leptin在H-I/R

■背景资料

研究表明, 瘦素(leptin)参与能量代谢、神经-内分泌、血管新生、生殖、免疫应答等的调节, 这提示瘦素是与创伤修复密切相关的代谢因子。探讨瘦素在肝缺血/再灌注后肠道内的表达变化及其与肠道损伤的联系, 为利用以瘦素为核心的调控网络进行损伤后干预提供了理论依据。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科; 张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

■ 研发前沿

肝、肠道是营养吸收、能量代谢的重要器官,国内外尚未见leptin与肝缺血/再灌注介导的肠道损伤相关联的报道。同时,由于leptin可能参与创伤后内环境紊乱的恢复过程,研究leptin在肝缺血/再灌注介导的肠道损伤中的变化,成为证明leptin是否对肠道损伤发挥保护效应的一个主要环节。

介导的肠道损伤中的作用。

方法: 建立大鼠70% H-I/R模型,大鼠随机分成5组,每组9只,依次为假手术(Sham)组、肝缺血60 min/再灌注60 min (I60'R60')组、I60'R150'组、I60'R240'组和I60'R360'组。采用酶比色法检测损伤后血清二胺氧化酶活性,采用HE染色和免疫组织化学法分别检测损伤后十二指肠的病理改变和leptin蛋白表达,并采用逆转录-PCR法观察损伤后十二指肠leptin mRNA表达的变化。

结果: 与损伤后Sham组比较,四个再灌注组血清二胺氧化酶活性无显著差异,但I60'R60'组显著高于I60'R360'组($P = 0.0077$)。病理学观察提示H-I/R早期的十二指肠损伤较重而后期逐步减轻。与损伤后Sham组十二指肠leptin蛋白表达相比, I60'R240'、I60'R360'组显著升高(0.126503 ± 0.005873 , 0.129458 ± 0.003755 vs 0.079269 ± 0.001995 , 均 $P < 0.01$),再灌注组之间按I60'R360'、I60'R240'、I60'R60'、I60'R150'组的顺序依次递减。与损伤后Sham组十二指肠leptin mRNA表达相比, I60'R150'组显著降低(0.944 ± 0.033 vs 1.022 ± 0.011 , $P = 0.049$)。

结论: Leptin在H-I/R后肠道内发生的表达变化与肠道损伤密切相关,提示leptin可能作为一种保护因子对抗H-I/R介导的肠道损伤。

关键词: 瘦素;再灌注损伤;肝;十二指肠;功能恢复;内环境稳定

林季, 颜光涛, 薛辉, 郝秀华, 张凯, 王录煥. Leptin在大鼠肝缺血/再灌注介导的肠道损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3485-3491

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3485.asp>

0 引言

肝缺血/再灌注(H-I/R)常发生于肝移植、肝切除、腹腔挤压伤复苏时,引起损伤的主要原因是活性氧生成、 Ca^{2+} 超载和白细胞活化,是导致临床相关疾病患者不良预后的重要原因^[1-3]。瘦素(leptin)是一种由ob基因表达,含167个氨基酸,分子质量为16 kDa的活性因子,主要作用是抑制摄食、促进能量消耗^[4-5]。近年的研究证实leptin参与能量代谢、神经-内分泌、血管新生和生殖的调控^[6-8],能够加速糖和脂肪的氧化以代偿细胞损伤,并能够增强免疫系统功能^[9-10]。由于肝、肠道是营养吸收、能量代谢的重要器官,leptin又是与创伤修复密切相关的代谢因子,而且尚

未见leptin与H-I/R介导的肠道损伤相关联的报道,我们设想leptin在H-I/R后肠道内的表达发生一定的变化,这些变化与肠道结构破坏、功能受损存在一定的联系。我们通过建立大鼠70% H-I/R模型,采用酶比色法检测损伤后血清二胺氧化酶(DAO)活性,采用HE染色和免疫组织化学法分别检测损伤后十二指肠的病理改变和leptin蛋白表达,并采用逆转录-PCR法观察损伤后十二指肠leptin mRNA表达的变化,探讨leptin在H-I/R介导的肠道损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 免疫用清洁级♂新西兰白兔3只,体重1250 g;实验用清洁级♂SD大鼠45只,体重250 g,均由中国人民解放军总医院实验动物中心提供(许可证编号D98010)。重组鼠leptin购自Pepro Tech®公司;福氏完全及不完全佐剂购自Gibco BRL®公司;AMV酶、Oligo(dT)₁₅购自Promega®公司;琼脂糖购自Sigma®公司。DAO检测试剂由中国人民解放军总医院第一附属医院黎君友老师馈赠;磷酸盐缓冲液、生物素化羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记的链亲合素、二氨基联苯胺四盐酸(DAB)染色试剂盒购自北京中杉金桥®公司;TRIzol试剂、RNA酶抑制剂、Taq酶、dNTPs购自北京鼎国®公司;leptin、 β -actin引物由北京赛百盛®公司合成;其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 leptin抗血清的制备: 将leptin抗原120 μg 与3 mL福氏完全佐剂充分混匀后,以背部皮内多点注射法免疫新西兰白兔,每只白兔注射1 mL。首次免疫后2 wk进行加强免疫,采用福氏不完全佐剂。之后每隔4 wk进行1次加强免疫,共计4次。末次免疫后1 wk于清醒状态下分离白兔右侧颈内动脉并插管持续放血,收集血样按4℃、3000 g 15 min,冻存血清于-80℃备用。

1.2.2 大鼠70% H-I/R模型的建立: 大鼠随机分成5组,每组9只,依次为假手术(Sham)组、肝缺血60 min/再灌注60 min(I60'R60')组、I60'R150'组、I60'R240'组和I60'R360'组。实验前12 h禁食、不限水,实验时以1%戊巴比妥钠(60 mg/kg, ip)麻醉大鼠,无菌条件下开腹,取右侧肋缘下斜切口,充分显露第一肝门。以微血管夹夹闭肝蒂左分叉,60 min后取出血管夹进行再灌注,腹腔内注射1 mL生理盐水后关腹^[11]。Sham组开腹后仅钝性分离肝蒂左分叉,但不夹闭阻断肝叶供血。

表 1 PCR所用的引物序列及反应条件

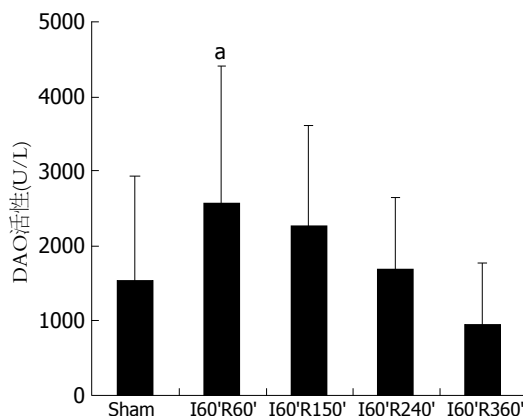
引物名	核酸序列及PCR反应条件	产物大小(bp)	GenBank
leptin	上游引物: 5'-ACCTGGAGAACCTGCGAGAC-3' 下游引物: 5'-AGGAGTAGGAGAAACGGACA-3' 变性: 94℃ 30 s, 退火: 55.6℃ 30 s, 延伸: 72℃ 30 s, 循环: 35	336	NM_013076
β -actin	上游引物: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' 下游引物: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGGC-3' 变性: 94℃ 30 s, 退火: 55.7℃ 30 s, 延伸: 72℃ 30 s, 循环: 35	445	NM_031144

1.2.3 血清及十二指肠样品的制备: 损伤后于相应时间点、相同麻醉条件下对各组大鼠行心脏抽血, 血样置37℃水浴20 min后, 按4℃、3000 *g* 离心20 min, 保存血清于-20℃。抽血后迅速取出十二指肠并均分为2份, 一份置液氮速冻后存于-80℃, 另一份采用常规石蜡包埋法经梯度酒精脱水、二甲苯透明后, 制作成石蜡块。采用Leica® RM2135切片机连续切片, 厚度4 μ m, 分别用于HE染色和免疫组织化学检测。

1.2.4 血清DAO活性的检测: 血清DAO活性测量的标准点为75、150、300、600、1200、2400、4800、9600 U/L, 设立空白对照管、标准管和样品管。各取40 μ L蒸馏水、标准品和血清样品加入含0.2 mol/L pH7.2磷酸缓冲液240 μ L、40 mg/L辣根过氧化物酶8 μ L、5 g/L邻联茴香胺8 μ L、1.75 g/L二盐酸尸胺8 μ L的混合液, 室温避光混匀2 min, 置37℃避光水浴30 min后, 于436 nm处以空白对照管调零后测量各管的吸光度。以标准管的DAO活性由低至高为横坐标, 以其对应的调零后吸光度为纵坐标, 作出标准曲线。将各血清样品的调零后吸光度代入标准曲线, 即可计算出相应样品的DAO活性。

1.2.5 十二指肠损伤的观察: 十二指肠标本的石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精处理至水洗, 以Gill改良苏木素溶液染色、盐酸酒精分化、稀氨水返蓝、伊红溶液染色, 再经梯度酒精处理、二甲苯透明后, 用中性树脂封片。采用Leica® DC300F型图像采集系统观察并拍摄HE染色结果。

1.2.6 十二指肠leptin蛋白表达的检测: 采用链霉卵白素-过氧化物酶连结三步法检测十二指肠标本的leptin蛋白表达。石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精处理至水洗, 依次经内源性过氧化物酶清除、抗原修复、正常血清封闭、抗体结合、DAB染色、蒸馏水洗涤, 再经Gill改良苏木素溶液染色、盐酸酒精分化、稀氨水返蓝、梯度酒精处理、二甲苯透明后, 用中性树脂封片。所用一抗为1:50自制leptin抗血清, 二抗为

图 1 损伤后各组血清DAO活性. ^a $P<0.05$ vs I60'R360'.

1:200生物素化羊抗兔IgG, 显色时加入1:200辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, 三种试剂均以磷酸盐缓冲液稀释。采用Leica® DC300F型图像采集系统拍摄免疫组织化学染色结果, 每组切片随机挑选9个视野进行拍摄, 采用Image Pro Plus® 6.0软件定量分析每个视野图像中特异性阳性染色的累积光密度与特异性组织区域面积像素的比值。

1.2.7 逆转录-PCR: 采用TRIzol试剂提取十二指肠总RNA, 操作步骤按说明书进行。提取总RNA后, 以三蒸水为空白对照, 测量样品260 nm处的紫外吸光值并计算出总RNA浓度, 随后进行逆转录。以 β -actin mRNA表达作为cDNA合成及PCR反应的内源性参照, leptin和 β -actin的引物序列及反应条件如表1。于15 g/L琼脂糖电泳检测PCR产物, 并用Gel-Pro®凝胶成像仪拍摄和分析电泳图像。

统计学处理 采用统计软件Stata 7.0进行数据处理, 使用单因素方差分析 F 检验和 t 检验分别进行多样本组间和两样本间比较。测量结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 损伤后各组血清DAO活性的变化 与损伤后

■ 相关报道

目前认为肝缺血/再灌注的损伤机制包括自由基释放、中性粒细胞聚集、内皮素/NO失衡、核因子- κ B活化、前炎症细胞因子和黏附分子释放、肝细胞凋亡等, 而leptin与这些因素都有关联, 提示他参与调节肝缺血/再灌注介导的脏器损伤。前期研究也证实leptin在损伤后发挥迟缓而持续的保护效应。

■创新盘点

本研究发现leptin在肝缺血/再灌注后的肠道内发生显著的表达变化,这些表达变化与肠道损伤紧密相关,leptin表达水平的增高与肠道损伤的修复存在密切联系,提示leptin对肝缺血/再灌注后的肠道结构受损和屏障功能改善很可能扮演了抗损伤因子的重要角色。

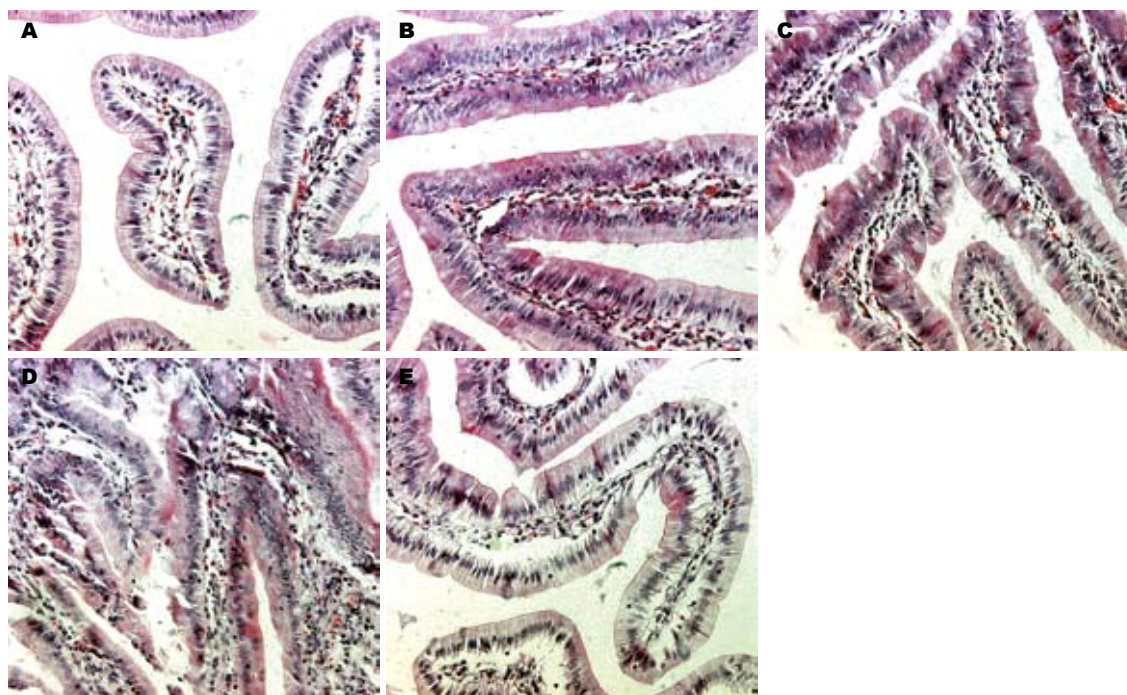


图2 损伤后各组十二指肠的病理学变化(HE染色×200). A: Sham; B: I60'R60'; C: I60'R150'; D: I60'R240'; E: I60'R360'.

Sham组血清DAO活性相比,4个再灌注组与之均无显著差异.再灌注组之间两两相比,I60'R60'组显著高于I60'R360'组($P = 0.0077$),I60'R150'组趋向于显著高于I60'R360'组($P = 0.0858$),其他组之间无显著差异(图1).

2.2 损伤后各组十二指肠的病理学变化 与Sham组相比,I60'R60'组十二指肠黏膜上皮层柱状细胞活动性增加、排列不规则、嗜酸性染、胞质减少,刷状缘局灶性萎缩、缺失,杯状细胞数增加,黏膜固有层充血.I60'R150'组十二指肠黏膜上皮层柱状细胞活动性增加、排列极不规则、广泛水肿、坏死,刷状缘广泛萎缩、崩解,杯状细胞数增加、坏死,黏膜固有层充血减轻.I60'R240'组十二指肠黏膜上皮层柱状细胞活动性增加、排列紊乱、弥漫性水肿、坏死,刷状缘弥漫性萎缩、崩解,杯状细胞数增加、广泛坏死,黏膜固有层充血减轻.I60'R360'组十二指肠黏膜上皮层柱状细胞活动性减低、排列趋于规则、无明显水肿、尚有局灶性坏死,刷状缘趋于完整、仅局限性缺失,杯状细胞数减少、无明显坏死,黏膜固有层无充血(图2).

2.3 损伤后各组十二指肠leptin蛋白表达的变化 与损伤后Sham组十二指肠leptin蛋白表达(0.079269 ± 0.001995)相比,I60'R60'组(0.089756 ± 0.014883)、I60'R150'组(0.074811 ± 0.010886)与之无显著差异,I60'R240'组($0.126503 \pm$

0.005873)、I60'R360'组(0.129458 ± 0.003755)显著升高(均 $P < 0.01$).再灌注组之间两两相比均有显著差异(均 $P < 0.01$),按I60'R360'、I60'R240'、I60'R60'、I60'R150'组的顺序依次递减(图3).

2.4 损伤后各组十二指肠leptin mRNA表达的变化 与损伤后Sham组十二指肠leptin mRNA表达(1.022 ± 0.011)相比,I60'R150'组显著降低(0.944 ± 0.033 , $P = 0.049$),I60'R60'(0.990 ± 0.001)、I60'R240'(0.968 ± 0.041)、I60'R360'组(1.041 ± 0.017)与之均无显著差异.再灌注组之间两两相比,I60'R360'组显著高于I60'R150'组($P = 0.014$),并趋向于显著高于I60'R240'组($P = 0.065$),其他组之间均无显著差异(图4).

3 讨论

H-I/R造成的损伤机制主要是自由基释放、中性粒细胞聚集、内皮素/NO失衡、核因子- κ B活化、前炎症细胞因子和黏附分子释放、肝细胞凋亡等^[12-17],目前研究发现leptin与内皮素、NO、核因子- κ B、多种炎症细胞因子、氧源性自由基、中性粒细胞聚集及细胞凋亡都存在联系^[18-23],而且我们前期的工作也初步证实leptin在急性炎症反应中发挥一定的保护效应^[4,6,24-26],我们考虑leptin与H-I/R介导的内环境紊乱(尤其是肠道损伤)可能存在某些联系.但目前国内外尚无这方面的报道,若能揭示leptin在H-I/R介导

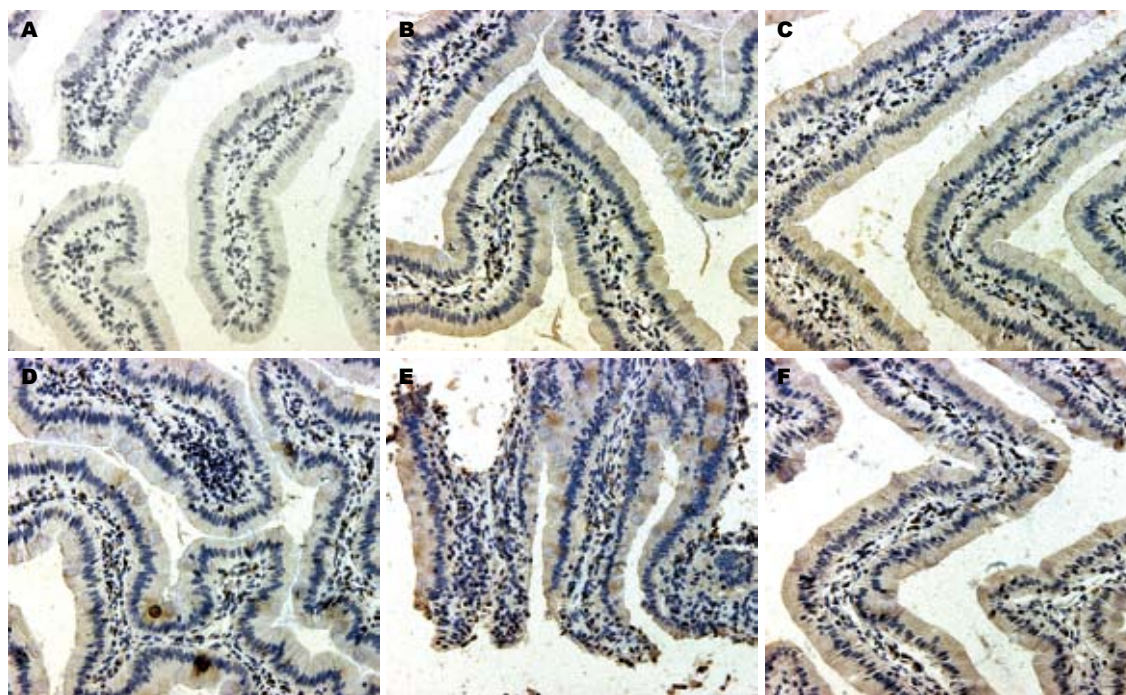


图3 损伤后各组十二指肠leptin蛋白表达的变化(免疫组织化学染色 $\times 200$)。A: 阴性对照; B: Sham; C: I60'R60'; D: I60'R150'; E: I60'R240'; F: I60'R360'。

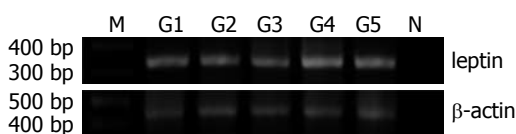


图4 损伤后各组十二指肠leptin mRNA表达的变化。M: Marker; G1: Sham; G2: I60'R60'; G3: I60'R150'; G4: I60'R240'; G5: I60'R360'; N: 阴性对照。

的肠道损伤中的作用, 对于相关外科手术、创伤等疾病的诊治将具有积极的意义。我们采用的70% H-I/R模型而非100% H-I/R模型, 避免了因全肝血流阻断后肠道淤血引起的细菌移位和内毒素释放对观察指标的潜在影响^[27]。同时, 自制的leptin抗血清具有良好的效价和特异性, 已应用于前期的相关研究^[28-29]。

DAO是一种含有脱氨的丁二胺和组胺的细胞质酶, 发挥控制肠黏膜增殖的作用, 外周血DAO活性的变化能反映创伤后肠黏膜屏障功能受损和修复情况, 是判断肠黏膜屏障功能的敏感指标^[30-31]。我们的结果发现, 损伤后再灌注组血清DAO活性与Sham组均无显著差异, 这符合70% H-I/R模型仅夹闭部分门脉血流而不会造成显著肠道淤血、坏死的实验条件; 同时, H-I/R早期I60'R60'组血清DAO活性显著高于损伤后期的I60'R360'组, 以及I60'R150'组趋向高于I60'R360'组, 则说明H-I/R早期的十二指肠黏膜受损情况比损伤后期要严重得多。十二指肠HE

染色的结果提示, H-I/R早期的肠道损伤较重而后期逐步减轻, 也说明H-I/R后期机体对肠道损伤存在有效的抗损伤、促修复机制。

既然leptin是联系能量代谢、免疫调控和神经-内分泌三大功能系统的枢纽, 我们考虑leptin在H-I/R后受损肠道内的表达水平会发生某些变化, 这些变化可能与改善肠道的内环境紊乱有关。从蛋白水平的结果来看, 损伤后十二指肠leptin蛋白表达在H-I/R早期无显著变化, 至损伤后期显著升高, 提示H-I/R后期受损的肠道黏膜屏障逐步恢复时伴随着leptin蛋白表达的升高。从基因水平的结果来看, 十二指肠leptin mRNA表达于H-I/R早期即有下降的趋势, 于I60'R150'组显著降低, 损伤后期又逐步恢复, 虽然与Sham组无显著差异, 但是I60'R360'组显著高于I60'R150'组而且趋向高于I60'R240'组, 提示H-I/R早期高代谢造成的能量储备不足和肠道严重受损抑制了十二指肠leptin mRNA表达, 损伤后期能量储备的逐步升高和肠道损伤逐步修复则反馈诱导十二指肠leptin mRNA表达回升至Sham组水平, 同时他也促进了十二指肠leptin蛋白的表达。

总之, 结合血清DAO活性、十二指肠HE染色结果、leptin蛋白表达和基因表达的结果, 我们发现leptin表达水平的增高与肠道损伤的修复存在密切联系, leptin对H-I/R后肠道结构受损和

■应用要点

探讨leptin在肝缺血/再灌注介导的肠道损伤中的作用, 为充分利用以leptin为核心的代谢、免疫及神经-内分泌网络进行内源性和外源性的干预, 开拓早期诊治肝缺血/再灌注介导的肠道损伤和消化系统脏器创伤的新方法有积极的意义。

■同行评价

本研究选题新颖,设计合理,统计处理正确,语言表达规范,科学性、创新性和可读性均能较好地反映我国胃肠病基础研究的先进水平。

屏障功能改善很可能发挥了抗损伤因子的重要角色. 充分利用以leptin为核心的代谢、免疫及神经-内分泌网络进行内源性和外源性的干预,将有助于开拓早期诊治H-I/R介导的肠道损伤和消化系统脏器创伤的新方法。

致谢: 感谢廖杰、于力方、李宁老师与钟苑、周国根、吕效兴同志对本研究的部分操作给予的支持。

4 参考文献

- Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 457-464
- Wang ZZ, Zhao WJ, Zhang XS, Tian XF, Wang YZ, Zhang F, Yuan JC, Han GZ, Liu KX, Yao JH. Protection of *Veratrum nigrum* L. var. *ussuriense* Nakai alkaloids against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 564-571
- Jiang N, Zhang ZM, Liu L, Zhang C, Zhang YL, Zhang ZC. Effects of Ca^{2+} channel blockers on store-operated Ca^{2+} channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4694-4698
- Lin J, Yan GT, Xue H, Hao XH, Zhang K, Wang LH. Leptin protects vital organ functions after sepsis through recovering tissue myeloperoxidase activity: an anti-inflammatory role resonating with indomethacin. *Peptides* 2007; 28: 1553-1560
- Dong F, Ren J. Fitness or fatness--the debate continues for the role of leptin in obesity-associated heart dysfunction. *Curr Diabetes Rev* 2007; 3: 159-164
- Lin J, Yan GT, Hao XH, Wang LH, Zhang K, Xue H. Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1000-1004
- Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006; 393: 7-20
- Buyukberber M, Koruk M, Savas MC, Gulsen MT, Pehlivan Y, Devenci R, Sevinc A, Gergerlioglu S. Leptin levels in the differential diagnosis between benign and malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 398-402
- Niu L, Wang X, Li J, Huang Y, Yang Z, Chen F, Ni H, Jin Y, Lu X, Cao Q. Leptin stimulates $\alpha 1(I)$ collagen expression in human hepatic stellate cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway. *Liver Int* 2007; 27: 1265-1272
- Thomas T. Leptin and fragility fracture: evidence for a protective effect in humans. *Am J Med* 2004; 117: 966-968
- Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Haskó G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 2007; 21: 1788-1800
- Lee WY, Lee JS, Lee SM. Protective effects of combined ischemic preconditioning and ascorbic acid on mitochondrial injury in hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2007; 142: 45-52
- Katsumi H, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Prevention of hepatic ischemia/reperfusion injury by prolonged delivery of nitric oxide to the circulating blood in mice. *Transplantation* 2008; 85: 264-269
- Matsui N, Kasajima K, Hada M, Nagata T, Senga N, Yasui Y, Fukuishi N, Akagi M. Inhibitor of NF- κ B activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Toxicol Sci* 2005; 30: 103-110
- Akahori T, Sho M, Hamada K, Suzaki Y, Kuzumoto Y, Nomi T, Nakamura S, Enomoto K, Kanehiro H, Nakajima Y. Importance of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Hepatol* 2007; 47: 784-792
- Kubes P. The role of adhesion molecules and nitric oxide in intestinal and hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 Suppl 2: 1458-1463
- Hatano E. Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S43-S44
- Chao HH, Hong HJ, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chiu WT, Wu CH, Shyu KG, Cheng TH. Leptin stimulates endothelin-1 expression via extracellular signal-regulated kinase by epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 573: 49-54
- Mattace Raso G, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Coppola A, Bianco G, Diano S, Di Carlo R, Meli R. Leptin induces nitric oxide synthase type II in C6 glioma cells. Role for nuclear factor- κ B in hormone effect. *Neurosci Lett* 2006; 396: 121-126
- Tang CH, Lu DY, Yang RS, Tsai HY, Kao MC, Fu WM, Chen YF. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF- κ B, and p300 pathway in microglia. *J Immunol* 2007; 179: 1292-1302
- Rolland YM, Perry HM 3rd, Patrick P, Banks WA, Morley JE. Leptin and adiponectin levels in middle-aged postmenopausal women: associations with lifestyle habits, hormones, and inflammatory markers--a cross-sectional study. *Metabolism* 2006; 55: 1630-1636
- Marciniak A, Borkowska E, Kedra A, Rychlik M, Beltowski J. Time-dependent transition from H(2)O(2)-extracellular signal-regulated kinase- to O(2)-nitric oxide-dependent mechanisms in the stimulatory effect of leptin on renal Na^{+}/K^{+} -ATPase in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 1216-1224
- Montecucco F, Bianchi G, Gnerre P, Bertolotto M, Dallegri F, Ottonello L. Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069: 463-471
- Lin J, Yan GT, Wang LH, Hao XH, Zhang K, Xue H. Leptin fluctuates in intestinal ischemia-reperfusion injury as inflammatory cytokine. *Peptides* 2004; 25: 2187-2193
- Lin J, Yan GT, Wang LH, Xue H, Hao XH, Zhang K. [Effect of long tubular bone fracture on serum levels of leptin, acute phase proteins and biochemical markers for organ functions] *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2006; 18: 19-23
- Lin J, Yan GT, Gao XN, Liao J, Wang LH, Hao XH. [Distribution of leptin expression and its effect on the recovery of sepsis-induced internal disorders]

- Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 39: 360-363, 417
- 27 Hiranuma S, Ito K, Noda Y, Ozasa H, Koike Y, Horikawa S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2167-2172
- 28 Yan GT, Hao XH, Xue H, Lu YP. Establishment of a highly sensitive leptin radioimmunoassay and detection of increased leptin levels in hyperlipidemia and pregnancy. *J Immunoassay Immunochem* 2002; 23: 317-326
- 29 Shi Y, Yan GT, Lin J. Intestinal ischemia-reperfusion injury made leptin decreased. *Regul Pept* 2006; 133: 27-31
- 30 Rajtar S, Irman-Florjanc T. Amitriptyline affects histamine-N-methyltransferase and diamine oxidase activity in rats and guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 2007; 574: 201-208
- 31 García-Martin E, Mendoza JL, Martínez C, Taxonera C, Urcelay E, Ladero JM, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, Agúndez JA. Severity of ulcerative colitis is associated with a polymorphism at diamine oxidase gene but not at histamine N-methyltransferase gene. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 615-620

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 2008-11-08)

血管紧张素 II 在大鼠酒精性肝纤维化发病机制中的作用

于继红, 陈玉帅, 林红, 傅宝玉

■背景资料

酒精性肝病既往是西方国家的常见疾病。近年来, 在我国已成为引起肝硬化、肝癌的主要因素。酒精性肝病的发病机制还不十分清楚, 临床治疗缺乏有效手段。肾素-血管紧张素-醛固酮系统已被证实介导心、肺、肾等器官纤维化过程, 但在酒精性肝纤维化发病过程中的作用还不十分清楚, 本文就这一问题进行研究。

于继红, 陈玉帅, 林红, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

于继红, 讲师, 主要从事酒精性肝病的临床和科研工作。

作者贡献分布: 此课题由傅宝玉设计; 研究过程主要由于继红操作完成; 陈玉帅与林红对数据分析及论文写作提供帮助。

通讯作者: 傅宝玉, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科。weicuisy@tom.com

电话: 024-83282199 传真: 024-83282200

收稿日期: 2008-08-20 修回日期: 2008-09-25

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Role of angiotensin II in pathogenesis of alcoholic liver fibrosis in rats

Ji-Hong Yu, Yu-Shuai Chen, Hong Lin, Bao-Yu Fu

Ji-Hong Yu, Yu-Shuai Chen, Hong Lin, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. weicuisy@tom.com

Received: 2008-08-20 Revised: 2008-09-25

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To determine role of angiotensin II (Ang II) in alcoholic liver fibrosis and to provide a new suitable agent for clinical treatment.

METHODS: Wistar male rats were randomly divided into 3 groups: control group ($n = 30$), experimental group ($n = 50$) which were intra-gastrically infused with NS or alcohol, and Captopril group ($n = 30$) treated with captopril twice a day for 12w [8 g/(kg·d)] following two weeks' of alcohol infusion. HE and van Gieson staining were used to observe the histological changes, and serum or hepatic hyaluronic acid, laminin and angiotensin II were detected using radio-immunoassay method. Immunohistochemistry staining was used to detect the expressions of type I and type IV collagen in liver.

RESULTS: The serum Ang II level began to increase after eight weeks' of ethanol feeding in alcohol-fed rats and reached the highest level at

the end of 12 weeks, significantly higher than controls (1250.50 ± 170.06 vs 598.20 ± 83.73 , $P < 0.0005$). Ang II, detected in liver, progressing increased and showed significant difference between alcohol-fed rats and controls (1083.4 ± 197.45 vs 568.2 ± 89.82 , 1382.5 ± 154.88 vs 570.2 ± 77.63 , 1504.00 ± 173.12 vs 579.2 ± 87.65 , all $P < 0.0005$). HE and van Gieson staining showed no degeneration or necrosis or inflammatory cell infiltration or fibroproliferation in captopril-treated rats, whereas dramatic changes were observed in alcohol-fed rats. At the end of week 12, serum hepatic hyaluronic acid and laminin level were significantly increased in alcohol-fed rats than either the controls or the captopril-treated rats (33.9 ± 2.77 vs 22.0 ± 2.31 , 24.2 ± 1.9 ; 72.5 ± 3.31 vs 54.4 ± 3.15 , 56.7 ± 3.22 , all $P < 0.05$). The result of immunohistochemistry staining showed no different location of positive staining, but the strength and areas of type I or type IV collagen-positive staining were significantly lower in captopril-treated rats than in alcohol-fed rats (6.45 ± 0.41 , 7.01 ± 0.49 vs 17.23 ± 0.62 , 18.04 ± 0.89 , all $P < 0.0005$).

CONCLUSION: Ang II is increased both in plasma and also in liver tissue. Captopril inhibits formation of liver fibrosis, decreases the plasma level of HA and LN and reduces the expression of collagen type I and IV in liver. Thus Ang II promotes the alcohol-induced liver fibrosis.

Key Words: Angiotensin II; Liver fibrosis; Alcohol; Rats

Yu JH, Chen YS, Lin H, Fu BY. Role of angiotensin II in pathogenesis of alcoholic liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3492-3497

摘要

目的: 明确血管紧张素 II (Ang II) 在酒精性肝纤维化发生中的作用, 为临床治疗提供新的靶点。

方法: Wistar大鼠110只随机分为对照组($n = 30$), 酒精组($n = 50$), Captopril组($n = 30$); 酒精组采用乙醇灌胃法制备酒精性肝病动物模型,

■同行评议者

朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化科

Captopril组在乙醇灌胃2 wk后, 加用Captopril 8g/(kg·d), 日2次灌胃, 同时继续乙醇灌胃, 共12 wk. 应用HE和VG染色观察肝脏病理组织学改变; 放射免疫分析法检测血清HA、LN含量以及血浆和肝组织内Ang II水平; 免疫组织化学染色检测肝组织内I、IV型胶原含量.

结果: 酒精组血浆Ang II水平在8 wk后开始升高, 12 wk时达到顶点, 明显高于对照组(1250.50 ± 170.06 vs 598.20 ± 83.73 , $P < 0.0005$). 实验4, 8, 12 wk, 肝组织内Ang II进程进行性升高, 与对照组相比差异具有统计学意义(1083.4 ± 197.45 vs 568.2 ± 89.82 , 1382.5 ± 154.88 vs 570.2 ± 77.63 , 1504.00 ± 173.12 vs 579.2 ± 87.65 , 均 $P < 0.0005$). Captopril组未见明显的肝细胞脂肪变性、坏死及炎性细胞浸润, 无纤维条索形成; 而这些改变在酒精组均非常明显. 12 wk末, 酒精组血清LN和HA与对照组及Captopril组比较差异具有统计学意义(33.9 ± 2.77 vs 22.0 ± 2.31 , 24.2 ± 1.9 ; 72.5 ± 3.31 vs 54.4 ± 3.15 , 56.7 ± 3.22 , 均 $P < 0.05$); I、IV型胶原的定位在两组没有明显差别, 但在染色强度及染色面积上, Captopril组明显低于酒精组(6.45 ± 0.41 , 7.01 ± 0.49 vs 17.23 ± 0.62 , 18.04 ± 0.89 , 均 $P < 0.0005$).

结论: 酒精性肝纤维化时血浆及肝组织内Ang II增高, 血管紧张素转换酶抑制剂Captopril能抑制酒精性肝纤维化的形成. Ang II具有促进酒精性肝纤维化发生的作用.

关键词: 血管紧张素 II; 肝纤维化; 酒精; 大鼠

于继红, 陈玉帅, 林红, 傅宝玉. 血管紧张素 II 在大鼠酒精性肝纤维化发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3492-3497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3492.asp>

0 引言

随着我国人民生活水平的提高和乙肝疫苗预防的普及, 我国乙型肝炎的发病率逐年下降, 但酒精性肝病的发病率明显上升^[1]. 由酒精引起的肝硬化、肝癌已经成为威胁人类健康的严重疾病, 其发病机制还不十分清楚. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(rennin-angiotension-aldosterone system, RAAS)是一类血管调节因子, 通过调节血管收缩和水钠潴留来维持机体血流动力学的稳定^[2]. 近年来发现RAAS中的血管紧张素 II (Ang II) 还有上调细胞因子、促进细胞增生和调节细胞外基质代谢等非血流动力学作用^[3], 能够促进心脏和肾脏纤维化的形成. 肝脏并不是合成RAAS的

经典器官, RAAS在酒精性肝纤维化形成中的作用还不确定, 因此我们应用乙醇灌胃法制备酒精性肝纤维化动物模型, 观察血浆和肝脏Ang II的动态变化以及血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)Captopril能否抑制酒精性肝纤维化的形成, 以明确Ang II在酒精性肝纤维化发生中的作用, 为临床治疗提供新的思路.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠110只, 6-8周龄, 体质量160-200 g, 清洁级, 由中国医科大学实验动物中心提供. 分析纯无水乙醇, 沈阳生威试剂厂; Captopril, 美国Sigma公司; HA、LN放射免疫分析试剂盒, 上海海军科学研究所; Ang II放射免疫分析试剂盒, 北京生物技术研究; 抗I、IV型胶原多克隆抗体, 美国Santa Cruz公司; SABC免疫组化试剂盒, 北京中衫金桥公司.

1.2 方法

1.2.1 造模: 实验动物按随机数字表随机分为3组. 对照组30只, 给予生理盐水2.0 mL/只, 每天ig 3次, 共12 wk. 酒精组50只, 参照文献[4]给予乙醇, 每天ig 3次, 共12 wk, 其中0-4 wk给予400 mL/L乙醇8 g/(kg·d); 4-8 wk, 500 mL/L乙醇9 g/(kg·d); 8-12 wk, 500 mL/L乙醇10 g/(kg·d). Captopril组30只, 在给予乙醇ig 2 wk后, 加用Captopril 8 g/(kg·d), 每天ig 2次, 同时继续乙醇ig, 用量、用法同酒精组, 总疗程12 wk. 实验4、8、12 wk末分批处死动物, 各个时间点每组动物10只. 下腔静脉采血并大循环灌流去除肝脏血液后留取肝脏组织标本待检.

1.2.2 肝脏组织病理学检查: 肝脏标本置于甲醛中固定, 石蜡包埋, HE及VG染色, 观察肝脏病理形态学改变.

1.2.3 血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)检测 应用放射免疫分析法, 严格按照说明书进行操作.

1.2.4 血浆、肝组织内Ang II水平检测: 下腔静脉采血2 mL注入含有酶抑制剂的抗凝管中, 2500 r/min 4℃离心7 min分离血浆待用. 100 mg肝组织制成肝细胞匀浆待用. 标准管及样品管各加入标准液及待测样品200 μL, 然后加入¹²⁵I标记的Ang II 100 μL, 兔抗Ang II抗体100 μL, 充分混匀, 4℃ 24 h; 加入驴抗兔免疫分离剂500 μL, 充分混匀后室温放置15 min, 3000 r/min离心15 min后吸去上清, 沉淀物在γ-放射免疫计数器下测定.

1.2.5 I、IV型胶原免疫组织化学染色: 采用

■ 研究前沿

酒精性肝纤维化形成的核心是肝星状细胞的激活, 但肝星状细胞活化的启动因素, 参与因子及相关信号通路尚不十分清楚, 临床针对肝星状细胞活化的治疗缺乏靶点.

■相关报道

柳恽 *et al* 应用 CCl_4 诱导大鼠肝实质损伤性肝纤维化模型, 从肝、脾指数, 肝HE和Masson染色以及透射电镜下肝细胞超微结构变化等几个方面, 证实了血管紧张素转化酶抑制剂依那普利对肝纤维化具有治疗作用。

SABC法。石蜡包埋的肝组织切成4 μm 厚的切片, 常规二甲苯, 梯度乙醇脱蜡至水。30 mL/L H_2O_2 37℃孵育15 min以去除内源性过氧化物酶, PBS冲洗5 min $\times$ 3; 高压30 s进行抗原修复, PBS洗5 min $\times$ 3; 加入正常山羊血清37℃封闭30 min, 不洗即加入兔抗大鼠多克隆 $\alpha 1(\text{I})$ 、 $\alpha 1(\text{IV})$ 型胶原抗体(1:50倍稀释), 阴性对照用PBS代替一抗, 4℃过夜; PBS洗5 min $\times$ 3, 加入生物素标记的羊抗兔-IgG抗体, 37℃孵育20 min; PBS洗5 min $\times$ 3, 加入SABC液, 37℃孵育20 min; PBS洗5 min $\times$ 3, DAB显色, 显微镜下控制显色时间, 3 min左右; 自来水冲洗, 苏木素复染40 s, 盐酸-乙醇分化, 常规脱水透明, 树胶封片。结果应用病理图像分析仪对染色强度和染色面积进行分析, 分析时每张切片选取阳性染色最明显的10个视野。

统计学处理 以mean $\pm$ SD表示, 应用SPSS13.0对各组间数据进行单因素方差分析(AVONA), 各组间两两比较应用LSD方法, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 实验4 wk末, 酒精组大鼠毛色晦暗, 竖毛, 反应迟钝, 食欲不佳, 体质量下降; 而Captopril组大鼠活跃, 毛色光滑, 体质量持续增长。整个实验过程中, 对照组、酒精组及Captopril组分别死亡1、8和1只大鼠, 死亡率分别为3.3%、16%和3.3%。

2.2 肝脏组织病理学 HE及VG染色结果显示: 对照组肝小叶结构完整, 肝细胞放射状排列, 无变性、坏死和炎细胞浸润, 无纤维组织增生。酒精组4 wk末即出现局限性肝小叶中央静脉区小泡状脂肪变, 肝细胞点片状坏死, 炎性细胞浸润; 12 wk末, 大于2/3肝小叶形成弥漫性以大泡为主的混合性脂肪变, 肝细胞坏死增多, 并可见中央静脉及汇管区周围纤维组织增生, 呈条索状向肝小叶内延伸, 部分包绕肝小叶, 但无假小叶形成, 窦周亦有明显的纤维组织增生。而Captopril组8 wk末才出现局限性轻度脂肪变性, 肝细胞坏死及炎性细胞浸润均不明显; 12 wk末脂肪变略有增加, 无纤维条索形成(图1)。

2.3 血清透明质酸、层粘连蛋白含量 实验4 wk末各组间血清LN浓度差异无统计学意义($P=0.231$); 实验8 wk末酒精组血清LN浓度开始升高, 12 wk末进一步升高, 与对照组及Captopril组比较差异具有统计学意义($P=0.001$, $P=0.012$)。血清HA浓度在实验4和8 wk末时各组间比较无

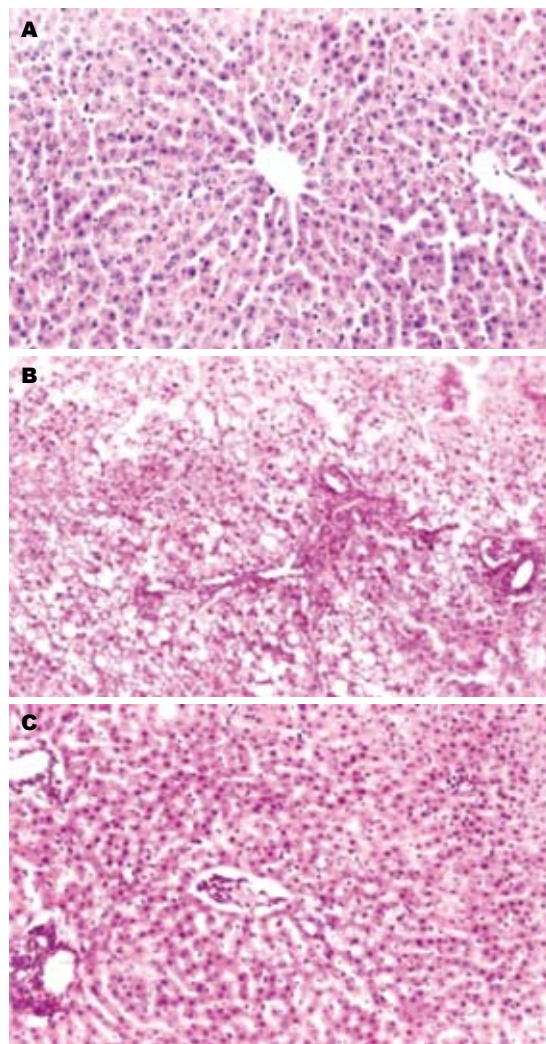
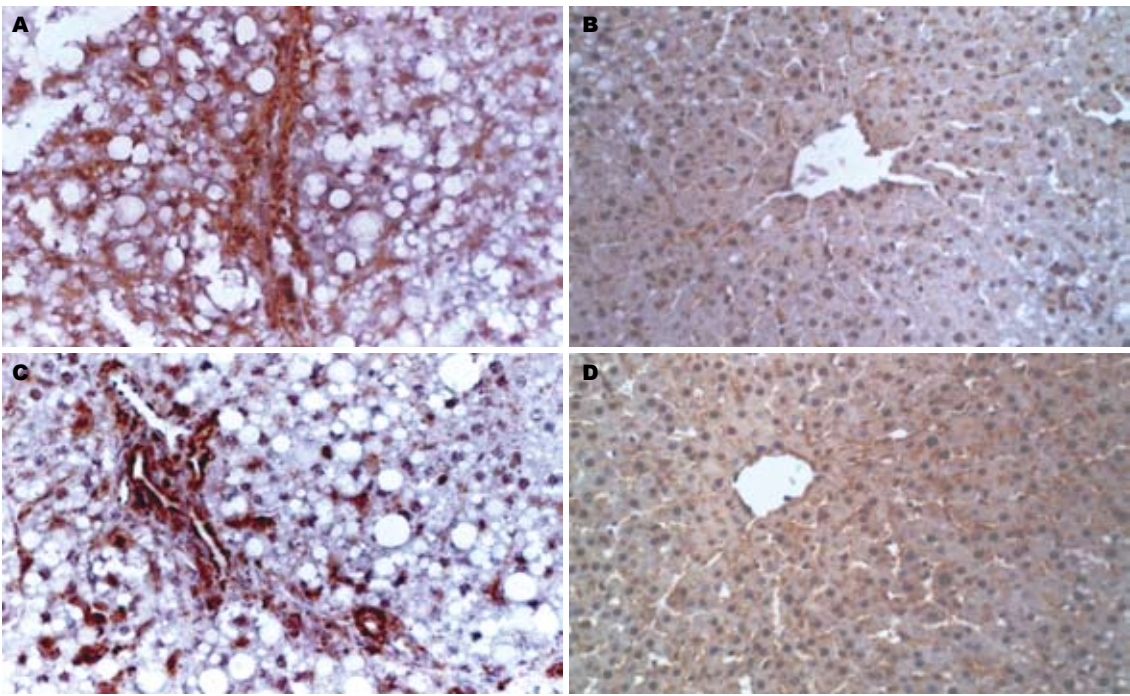


图1 肝脏组织病理学(HE染色)。A: 对照组; B: 酒精组; C: Captopril组。

统计学差异($P=0.496$, $P=0.201$); 12 wk末酒精组血清HA浓度明显高于对照组及Captopril组, 差异具有统计学差异($P<0.0005$, 表1)。

2.4 血浆、肝组织内Ang II水平 实验4 wk末酒精组血浆Ang II水平与对照组比较差异没有统计学意义($P=0.067$)。实验8 wk末酒精组血浆Ang II水平开始升高, 12 wk末仍维持于较高水平, 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.0005$)。肝组织内亦可检测到Ang II, 实验4 wk末酒精组肝组织内Ang II水平即开始升高, 8 wk末进一步升高, 12 wk末达到顶点, 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.0005$, 表2)。

2.5 I、IV型胶原免疫组织化学染色结果 对照组和Captopril组大鼠中I型胶原主要分布于汇管区的结缔组织、血管壁及胆管壁, 并沿肝窦壁成丝状着色; IV型胶原主要位于中央静脉、汇管区的血管壁, 两者均呈弱阳性染色。酒精组中I型胶原主要分布于中央静脉、汇管区周围



■创新盘点
本文首次报道了Ang II在酒精性肝纤维化发病机制中的作用,并确定肝脏在病理情况下能够自主合成Ang II。

图 2 I、IV型胶原免疫组织化学染色结果. A: 酒精组 I 型胶原; B: Captopril组 I 型胶原; C: 酒精组IV型胶原; D: Captopril组IV型胶原.

表 1 各组血清LN、HA含量 (μg/L)

分组	LN			HA		
	4 wk	8 wk	12 wk	4 wk	8 wk	12 wk
对照组	20.4 ± 2.06	21.2 ± 2.03	22.0 ± 2.31	53.7 ± 3.09	52.5 ± 3.03	54.4 ± 3.15
酒精组	23.6 ± 2.15	31.1 ± 2.87	33.9 ± 2.77	52.6 ± 3.75	58.1 ± 3.24	72.5 ± 3.31
Captopril组	21.9 ± 2.23	24.3 ± 1.87	24.2 ± 1.90	46.8 ± 4.22	47.8 ± 3.87	56.7 ± 3.22

表 2 各组血浆、肝脏Ang II 含量 (ng/L)

分组	血浆Ang II			肝组织Ang II		
	4 wk	8 wk	12 wk	4 wk	8 wk	12 wk
对照组	611.00 ± 138.12	607.00 ± 107.81	598.20 ± 83.73	568.20 ± 89.82	570.20 ± 77.63	579.20 ± 87.65
酒精组	729.00 ± 132.54	1113.40 ± 187.51	1250.50 ± 170.06	1083.40 ± 197.45	1382.50 ± 154.88	1504.00 ± 173.12

及增生的纤维组织处,形成宽而粗大的纤维条索;IV型胶原大量沉积于增生的纤维间隔内,呈强阳性染色,并可见沿肝窦壁连续分布的强阳性线性染色.病理图像分析仪所示酒精组 I、IV型胶原阳性面积百分比(17.23 ± 0.62 , 18.04 ± 0.89)均明显高于对照组(5.14 ± 0.29 , 5.26 ± 0.33)和Captopril组(6.45 ± 0.41 , 7.01 ± 0.49),差异有统计学意义($P < 0.0005$,图2).

3 讨论

RAAS的研究已有上百年历史,在维持机体血流

动力学的稳定方面发挥重要作用,并认为其对血流动力学的调节参与肝脏疾病所致门脉高压和肝肾综合征的发生^[5-6].近年来发现RAAS与心、肺、皮肤、肾等器官和组织的纤维化密切相关^[7-11].肝纤维化与其他器官组织纤维化过程相似,是机体对损伤的一种过度修复^[12-13].那么RAAS是否在肝纤维化的进程中发挥重要作用,成为新的研究热点.随后的研究发现,在慢性乙型病毒性肝炎和肝硬化患者中存在血清Ang II和血管紧张素转换酶的升高,血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体拮抗剂可以抑制

■应用要点

本研究证实Ang II能够促进酒精性肝纤维化的形成,为临床应用血管紧张素转换酶抑制剂进行干预,治疗酒精性肝纤维化提供了实验基础。

CCl₄引起的大鼠肝纤维化^[14-19]。这说明RAAS在肝纤维化的形成中发挥重要作用。

酒精性肝病与乙型病毒性肝炎或CCl₄引起的肝脏损害有不同的特点。酒精性肝病时脂质过氧化反应更加明显,由氧应激引起的血管内皮系统的增生更加显著^[20],这可以由临床上酒精性肝病的患者蜘蛛痣、肝脾大要比其他肝病患者更加常见、更加严重来证实。因此酒精性肝病进程中RAAS可能占据更加重要的地位,为了验证这一观点,我们利用乙醇灌胃法制备了酒精性肝纤维化动物模型,观察了在肝纤维化过程中,RAAS最关键的活性物质Ang II的动态变化以及ACEI的经典药物Captopril对酒精性肝纤维化形成的影响。

结果发现,在乙醇灌胃4 wk末时,血浆Ang II水平即开始升高,8 wk末时进一步升高,12 wk末虽然没有继续升高,但仍维持在较高水平,说明在酒精性肝病时确实存在RAAS的活化。在心、肾等脏器纤维化的研究中发现,纤维化的形成与局部RAAS的激活有关。但是心脏和肾脏是能够合成RAAS的全部或大部分成分的,而肝脏目前能够证实的仅有血管紧张素原的合成,是否能够合成Ang II和ACE还是未知。因此我们应用大循环灌流去除肝脏血液成分的影响,检测了肝组织内Ang II的含量。结果发现在乙醇灌胃4 wk末时,肝组织内Ang II水平即表现为较高水平,8 wk末时进一步升高,12 wk末达到高峰,并且明显高于血浆内Ang II水平,这说明肝脏局部确实存在Ang II,而不是来源于血液循环。

ACE是Ang II合成的限速酶,能够促进Ang I转化为Ang II。为了进一步验证Ang II的促纤维化作用,我们应用Captopril抑制Ang II的合成,从肝脏组织病理学、血清HA、LN含量和肝组织内I、IV型胶原的表达几个方面观察了Captopril对酒精性肝纤维化进程的影响。结果表明,在乙醇灌胃12 wk末时,中央静脉、汇管区及窦周间隙纤维组织明显增生,条索状向肝小叶内延伸,说明此时已经形成肝纤维化,而Captopril组未见明确的纤维组织增生,说明Captopril抑制了肝纤维化的形成。另一方面乙醇可以引起反应肝纤维化程度的血清HA、LN的明显升高,而Captopril阻止了这种改变。肝组织内I、IV型胶原免疫组织化学染色存在类似的结果,在酒精组12 wk末时,中央静脉、汇管区周围增生的纤维组织及纤维间隔内可见I型胶

原的强阳性染色,在血管壁和肝窦间隙可见连续的IV型胶原强阳性染色,而在Captopril组仅能看见较弱的非连续性染色。以上这些结果证明ACEI能够抑制酒精性肝纤维化的形成,Ang II确实是促进酒精性肝纤维化形成的重要因子。

4 参考文献

- 1 厉有名,陈卫星,虞朝辉,乐敏,刘有特,徐根云,季峰,李舒丹.浙江省酒精性肝病流行病学调查概况.中华肝脏病杂志 2003; 11: 647-649
- 2 Suo M, Hautala N, Földes G, Szokodi I, Tóth M, Leskinen H, Uusimaa P, Vuolteenaho O, Nemer M, Ruskoaho H. Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2002; 39: 803-808
- 3 Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001; 21: 563-572
- 4 崔巍,敖然,傅宝玉.碱性成纤维细胞生长因子在酒精性肝病大鼠中的表达及抗纤复方I号对其影响.中国医科大学学报 2007; 36: 59-61
- 5 张剑平,魏红山,孙继云,肖凡,张毅,徐道振,成军.肝病患者血清血管紧张素转化酶活性变化的临床意义.世界华人消化杂志 2007; 15: 2553-2556
- 6 姚怡然,周力,姚旗,张涛.重型肝炎患者血浆内皮素、心钠素、肾素-血管紧张素II测定.世界华人消化杂志 2004; 12: 1757-1758
- 7 Barlucchi L, Leri A, Dostal DE, Fiordaliso F, Tada H, Hintze TH, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Canine ventricular myocytes possess a renin-angiotensin system that is upregulated with heart failure. *Circ Res* 2001; 88: 298-304
- 8 Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* 2002; 109: 787-796
- 9 Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res* 2000; 86: 1187-1189
- 10 Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* 2002; 3: 3
- 11 Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136-151
- 12 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- 13 Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- 14 张晶,宗春华,李定国,周仁建,杜学亮,周馨,徐芹芳,陆汉明.肝内肾素-血管紧张素-醛固酮系统与大鼠肝纤维化的关系.世界华人消化杂志 2002; 10: 397-400
- 15 Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-155
- 16 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;

- 34: 745-750
- 17 Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385
- 18 Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H. Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 2001; 21: 147-158
- 19 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 20 Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 17-21

■同行评价

本研究内容有特色, 技术路线合理, 研究结果可靠, 有一定新意, 对同行有参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •**世界华人消化杂志性质、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学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领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、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者提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-08)

pGL3-Basic-COX-2-promoter报告基因重组质粒的构建及其功能鉴定

李琦, 周利红, 王炎, 孙珏, 高虹, 范忠泽

■背景资料

1998年Sawaoka *et al* 首次发现*H pylori* 感染诱导胃黏膜COX-2表达后, 国内外相继证实了*H pylori*感染的胃癌组织COX-2表达水平上调。多数研究认为COX-2的过表达是胃癌发生的早期事件, 随着癌前病变的进展, COX-2蛋白表达递增, COX-2不仅与早期胃癌的发生有关, 同时与胃癌的恶性进展密切相关。因此,*H pylori*感染可能通过COX-2途径参与了*H pylori*相关胃炎向癌前病变和胃癌的演进过程, 增加COX-2的表达可能是*H pylori*引起胃癌发生的重要原因。

李琦, 周利红, 王炎, 孙珏, 高虹, 范忠泽, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科 上海市 200062

李琦, 上海中医药大学, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事中西医结合治疗肿瘤的临床及实验研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30600844

上海市教委第五期重点学科资助项目, No. J50304

作者贡献分布: 李琦与范忠泽对此文所作的贡献均等, 本研究由李琦与范忠泽设计; 研究过程由李琦, 周利红, 王炎, 孙珏及高虹共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由李琦与范忠泽提供; 数据分析由孙珏与高虹完成; 本论文写作由李琦, 周利红及王炎完成。

通讯作者: 范忠泽, 200062, 上海市兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科。lwzf@hotmail.com

电话: 021-62572723-4306 传真: 021-52665957

收稿日期: 2008-08-15 修回日期: 2008-10-06

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Construction of pGL3-Basic-COX-2-promoter reporter gene vector and detection of its function

Qi Li, Li-Hong Zhou, Yan Wang, Jue Sun, Hong Gao, Zhong-Ze Fan

Qi Li, Li-Hong Zhou, Yan Wang, Jue Sun, Hong Gao, Zhong-Ze Fan, Department of Tumor, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600844; the 5th Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. J50304

Correspondence to: Zhong-Ze Fan, Department of Tumor, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. fanzhongze@citiz.net

Received: 2008-08-15 Revised: 2008-10-06

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To construct COX-2 promoter recombined luciferase reporter gene vector, and to detect its function.

METHODS: Primers were designed based on human COX-2 gene promoter, then COX-2 promoter from human genome DNA was replicated. pGL3-Basic Vector and COX-2 promoter were digested with restriction enzymes *Hind* III and *Bgl* II separately, then COX-2 promoter was inserted into pGL3-Basic Vector. The recombi-

nant vector pGL3-Basic-COX-2-promoter was transiently co-transfected into MKN45 cells with control vector pRL-SV40 respectively. twelve hours later, cells were treated with *H pylori* 100 times amount of cells for different length of time, then the activity of dual luciferase was detected.

RESULTS: COX-2 promoter recombined luciferase reporter gene vector was constructed successfully, and the result of sequencing and double digesting of recombined plasmid were completely correct. The experiment of transient transfection showed that the expression of COX-2 promoter in MKN45 cells was increased with time. Activity of dual-luciferase after transfection for 40 h was 3.5 folds of that for 8 h ($P < 0.05$). When *H pylori* was added to medium for co-culture, activity of dual-luciferase was increased up markedly compared with groups that were not added with *H pylori* ($P < 0.05$ or 0.01), and it was 5 folds after transfection for 40 h than 8 h ($P < 0.01$).

CONCLUSION: pGL3-Basic-COX-2-promoter can be transcribed and activated in MKN45 cells, and activity of COX-2 promoter increases obviously after *H pylori* addition. pGL3-Basic-COX-2-promoter can be used to identify and detect the level of COX-2 in cells.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Promoter; Vector; *Helicobacter pylori*; Dual-Luciferase

Li Q, Zhou LH, Wang Y, Sun J, Gao H, Fan ZZ. Construction of pGL3-Basic-COX-2-promoter reporter gene vector and detection of its function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3498-3504

摘要

目的: 构建COX-2基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter, 并进行功能鉴定。

方法: 根据已知人的COX-2基因启动子序列设计两端引物, 扩增人基因组DNA中的COX-2启动子。载体质粒pGL3-Basic和COX-2

■同行评议者

陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

启动子分别用限制性内切酶Hind III和Bgl II双酶切, 将COX-2基因启动子插入到pGL3-Basic报告载体中。构建的pGL3-Basic-COX-2-promoter重组质粒和内参质粒pRL-SV40瞬时共转染胃癌MKN45细胞, 加入100倍细胞数量的H pylori共培养不同时间后, 检测双荧光素酶的活性。

结果: 成功构建COX-2基因启动子重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter, 质粒测序及酶切结果完全正确。瞬时转染实验显示, COX-2启动子在MKN45细胞中的转录表达随时间的变化而升高, 转染后40 h的双报告基因活性是转染后8 h的3.5倍($P<0.01$); 加入H pylori共培养后, 同时时间点的荧光素酶活性明显升高($P<0.05$ 或 0.01), 转染后40 h的活性是转染后8 h的5倍($P<0.01$)。

结论: pGL3-Basic-COX-2-promoter在胃癌MKN45细胞中能被转录激活, 加入H pylori刺激后COX-2活性显著增强, pGL3-Basic-COX-2-promoter可以用来鉴定和检测细胞中COX-2的水平。

关键词: 环氧合酶2; 启动子; 质粒; 幽门螺杆菌; 双荧光素酶

李琦, 周利红, 王炎, 孙珏, 高虹, 范忠泽. pGL3-Basic-COX-2-promoter报告基因重组质粒的构建及其功能鉴定. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3498-3504
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3498.asp>

0 引言

环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2), 又称环氧合酶, 在肿瘤发生、发展和转移的整个过程中起着重要的作用, 参与了肿瘤形成的多个环节。COX-2可由癌基因的激活或抑癌基因的失活而被活化, 活化的COX-2可催化花生四稀酸形成能抑制细胞凋亡的前列腺素(prostaglandins, PGs), 使细胞增殖与凋亡失衡, 从而促进肿瘤的发生发展^[1-3]。因此, 对肿瘤组织或肿瘤细胞中COX-2活性检测可以作为监测肿瘤的发生发展的一个重要手段, 同时COX-2在肿瘤细胞中的表达水平也可以作为抗肿瘤药物筛选的一个重要指标^[4]。幽门螺杆菌(H pylori)在慢性胃病或胃癌的形成中起着关键的作用, 1994年WHO将其列为胃癌的I类致癌因子, H pylori感染是导致胃癌发生的高危因素之一^[5]。为探讨H pylori对胃癌细胞COX-2表达的影响, 本研究构建了COX-2启动子重组质粒

pGL3-Basic-COX-2-promoter, 将其共转染胃癌细胞, 并与H pylori共培养后进行双荧光素酶活性的测定, 来检测H pylori对胃癌细胞COX-2启动子活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 MKN45细胞株购自中科院上海细胞所、H pylori引自上海交通大学附属仁济医院消化病研究所; 大肠杆菌感受态细胞DH5 α 、载体质粒pGL3-Basic、内参质粒pRL-SV40由华东理工大学药学院药理研究室刘建文教授馈赠。人血基因组DNA纯化试剂盒、组织/细胞基因组DNA纯化试剂盒购自深圳尚能生物科技有限公司; DNA片段中量纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒购自美国Axygen公司; Taq DNA聚合酶、dNTP、T4连接酶、限制性内切酶Bgl II和Hind III购自日本TaKaRa公司; 转染脂质体Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; 胰蛋白酶、新生牛血清、RPMI 1640干粉培养基购自美国Gibco公司; 琼脂粉(Agar)、胰蛋白胨(Tryptone)、酵母浸出粉(Yeast Extract)购自英国Oxoid公司; 双荧光素酶检测试剂盒(dual luciferase assay system)与化学发光仪(GloMax 20/20 Luminometer)购自美国Promega公司。电泳仪(Miniprotean III型)与凝胶成像系统(Gel-Doc EQ)购自美国Bio Rad公司, 银质梯度PCR仪(Mastercycler)、生物分光光度计(RS232c)、高速低温离心机(Centrifuge 5804R)购自德国Eppendorf公司, CO₂细胞培养箱(Galaxy S+英国RS Biotech公司), 荧光倒置显微镜(CKX41/CKX-RFA, 日本Olympus公司), 空气浴摇床(SI50, 上海欧比特仪器有限公司), 电热恒温培养箱(DNP 9032, 上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 含有COX-2启动子基因组DNA提取自正常人外周血白细胞或人胃癌MKN45细胞, 采用血液基因组DNA纯化试剂盒或组织、细胞基因组DNA纯化试剂盒的操作方法进行提取, 结果用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度及完整性, 利用分光光度计测定产物在260 nm的吸收值, 以计算其浓度。

1.2.2 引物设计与合成: 根据已知人的COX-2基因启动子序列设计两端引物(PCR引物合成由上海美季生物技术有限公司完成): 上游(5'端)引物: 包含COX-2基因启动子互补碱基, 一个Hind

■ 研发前沿

COX-2在肿瘤发生、发展和转移的整个过程中起着重要的作用, 参与了肿瘤形成的多个环节。肿瘤细胞中COX-2的表达可作为抗肿瘤药物靶向筛选的一个重要指标, 寻找快速、灵敏、高效的筛选方法成为目前的一个研究热点。

■相关报道

研究发现胃癌组织中COX-2的过度表达与*H pylori*感染呈显著相关, Lim *et al*研究显示*H pylori*可诱导COX-2表达, 认为*H pylori*感染是增加胃癌发生危险性的可能机制之一. Sheu *et al*通过内镜活检免疫组化检测*H pylori*感染胃癌患者及根除*H pylori*后COX-2的表达, 发现*H pylori*感染胃癌患者COX-2呈高表达, 根除*H pylori*一年后COX-2表达在萎缩性胃炎部位消失. Sung *et al*通过对17例存在肠化生的*H pylori*感染患者根除*H pylori*治疗一年后检测COX-2的变化, 发现*H pylori*的根除导致COX-2表达的下调.

III识别位点, 三个保护碱基, 5'-CCCAAGCTTCC TGGACGTGCTCTGAC-3'. 下游(3'端)引物: 包含COX-2基因启动子互补碱基, 一个*Bgl* II 识别位点, 二个保护碱基, 5'-GAAGATCTTCCTCGA CCCTCTAAAGACG-3'.

1.2.3 PCR扩增COX-2启动子: 以基因组DNA为模板, 利用常规PCR反应进行扩增; 反应条件为95℃预变性3 min; 循环为94℃变性30 s, 65℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 共进行30个循环, 72℃终末延伸5 min. 扩增产物取5 μL用7 g/L琼脂糖凝胶电泳检测; 剩余PCR产物用DNA片段中量纯化试剂盒回收纯化备用.

1.2.4 重组质粒的构建: 用pGL3-Basic载体质粒转化常规制备的大肠杆菌DH5α感受态细胞, 进行大量扩增; 试剂盒抽提法大量制备pGL3-Basic质粒, 电泳检测质粒的纯度和含量. 分别用限制性内切酶*Hind* III和*Bgl* II对回收的含COX-2启动子PCR产物和pGL3-Basic载体质粒进行双酶切, 试剂盒直接回收大片段的酶切产物. 将酶切回收后的pGL3-Basic载体质粒和COX-2基因启动子目的片段在0.2 mL的离心管中进行连接反应, 16℃酶连过夜.

取10 μL连接产物直接转化100 μL大肠杆菌DH5α感受态细胞. 经过含有氨苄青霉素的LB平板固体培养基中选择培养. 从转化子的平板上随即挑取10个菌落, 经过不含氨苄青霉素的LB液体培养基扩增培养, 培养后用试剂盒抽提法提取质粒备用; 经过酶切、PCR、测序鉴定.

1.2.5 质粒共转染胃癌MKN45细胞: 将培养于含有100 mL/L新生牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素RPMI 1640完全培养基(37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度)中人胃癌MKN45细胞株, 按 1×10^4 个细胞/孔的量在96空板中接种指数生长期的细胞, 在37℃ 5% CO₂培养箱中过夜培养, 直到细胞到80%汇片.

在EP管中配置重组质粒PGL3-Basic-COX-2 promoter、内参载体质粒pRL-SV40、转染脂质体Lipofectamine 2000复合物. 将重组质粒PGL3-Basic-COX-2 promoter、内参载体质粒pRL-SV40各5 μL/well(96well)稀释至25 μL/well不含血清和抗生素的RPMI 1640中, 用加样枪混合均匀. 然后将脂质体悬液(0.5 μL/well)加入25 μL/well不含血清和抗生素的RPMI 1640中, 在室温孵育5 min, 最后将两者混合在一起, 充分混匀静置20 min, 使质粒与脂质体充分结合.

分别吸去接种到96孔板中的培养液, 用不

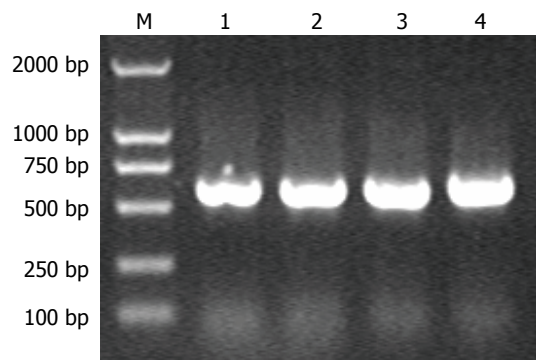


图1 COX-2基因启动子片段的克隆. M: Marker DL2000; 1-4: COX-2基因启动子片段(562 bp).

含血清和抗生素的RPMI 1640洗一次, 在每个孔中加入60 μL的质粒/脂质体混合物. 在37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养3-5 h后, 吸弃培养板中的转染培养液, 向各孔加入100 μL有血清无抗生素的RPMI 1640培养液, 在37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养18-24 h. 第2天将*H pylori*处理组孔中的细胞分别加入*H pylori* PBS混悬液(*H pylori* : MKN45 = 100 : 1), 处理后8、16、24、32、40、48 h收集样品, 进行双荧光素酶活性检测.

1.2.6 双荧光素酶报告基因活性测定: 将转染有pGL3-Basic-COX-2-promoter和pRL-SV40的MKN45细胞经过一定时间的培养后收集, 吸弃培养基, 用PBS洗1次. 加入裂解液20 μL/孔, 室温摇动15 min. 按照双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Assay System)的操作说明书, 取100 μL Luciferase Assay Buffer II于1.5 mL的离心管中, 设定化学发光仪延迟2 s, 发光仪测读10 s, 将全部细胞裂解液加入到离心管中, 用加样枪轻轻抽吸2-3次混匀, 不要旋涡振动, 将离心管放入GloMax 20/20 Luminometer化学发光仪中测读萤火虫荧光素酶发光值; 将离心管移出发光仪, 加入100 μL Stop & Glo Reagent, 快速旋涡混匀后, 将离心管重放回发光仪中测读海肾荧光素酶发光值.

统计学处理 统计数据用mean±SD表示, 采用SPSS13.0软件的One-way ANOVA进行统计学分析. $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 COX-2启动子扩增结果 从人血液白细胞或胃癌MKN45细胞中提取出基因组DNA, 设计COX-2启动子序列引物后, 对基因组DNA进行PCR扩增, 得到COX-2启动子基因562 bp目的序列(图1).

Query 54	CTTCCTCGACCTCTAAAGACGTACAGACCAGACACGGCGGCGGCGGGAGAGGGGAT	113
Sbjct 19220425	CTTCCTCGACCTCTAAAGACGTACAGACCAGACACGGCGGCGGCGGGAGAGGGGAT	19220484
Query 114	TCCCTGCGCCCCCGACCTCAGGGCCGCTCAGATTCTTGAGAGGAAGCCAAGTGTCTT	173
Sbjct 19220485	TCCCTGCGCCCCCGACCTCAGGGCCGCTCAGATTCTTGAGAGGAAGCCAAGTGTCTT	19220544
Query 174	CTGCCCTCCCCCGGTATCCCATCCAAGGCGATCAGTCCAGAACTGGCTCTCGGAAGCGCT	233
Sbjct 19220545	CTGCCCTCCCCCGGTATCCCATCCAAGGCGATCAGTCCAGAACTGGCTCTCGGAAGCGCT	19220604
Query 234	CGGGCAAAGACTGCGAAGAAGAAAAGACATCTGGCGGAAACCTGTGCGCTGGGGCGGTG	293
Sbjct 19220605	CGGGCAAAGACTGCGAAGAAGAAAAGACATCTGGCGGAAACCTGTGCGCTGGGGCGGTG	19220664
Query 294	GAACTCGGGGAGGAGAGGGAGGGATCAGACAGGAGAGTGGGGACTACCCCTCTGCTCCC	353
Sbjct 19220665	GAACTCGGGGAGGAGAGGGAGGGATCAGACAGGAGAGTGGGGACTACCCCTCTGCTCCC	19220724
Query 354	AAATTGGGGCAGCTTCTGGGTTTCCGATTTTCTATTCCGTGGGTAAAAAACCTGCC	413
Sbjct 19220725	AAATTGGGGCAGCTTCTGGGTTTCCGATTTTCTATTCCGTGGGTAAAAAACCTGCC	19220784
Query 414	CCCATCGGGCTTACGCAATTTTTTAAGGGGAGAGGAGGGAAAAATTTGTGGGGGTACG	473
Sbjct 19220785	CCCATCGGGCTTACGCAATTTTTTAAGGGGAGAGGAGGGAAAAATTTGTGGGGGTACG	19220844
Query 474	AAAAGGCGGAAAGAAACAGTCATTTTCGTACATGGGCTTGGTTTTCACTCTTATAAAAAG	533
Sbjct 19220845	AAAAGGCGGAAAGAAACAGTCATTTTCGTACATGGGCTTGGTTTTCACTCTTATAAAAAG	19220904
Query 534	GAAGGTTCTCTCGGTTAGCGACCAATTGTCATACGACTTGCAGTGAGCGTCAGGAGC-CG	592
Sbjct 19220905	GAAGGTTCTCTCGGTTAGCGACCAATTGTCATACGACTTGCAGTGAGCGTCAGGAGCACG	19220964
Query 593	TCCAGGAA 600	
Sbjct 19220965	TCCAGGAA 19220972	

图2 构建好的pGL3-Basic-COX-2-promoter重组质粒及序列比对结果。

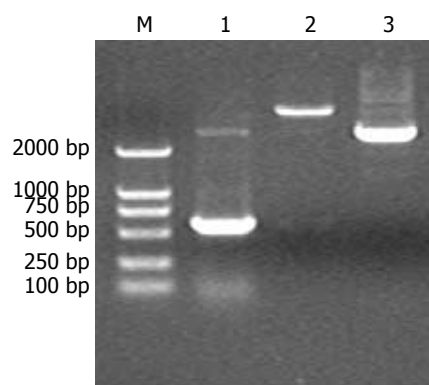


图3 酶切鉴定pGL3-Basic-COX-2-promoter载体质粒。M: Marker DL2000; 1: 重组质粒PCR扩增结果(562 bp); 2: 重组质粒双酶切结果(4818+562 bp); 3: 重组质粒(5380 bp)。

2.2 重组质粒测序及酶切鉴定 重组质粒DNA测序由上海美季生物技术有限公司完成, 结果与GenBank(gi|4506264)中人COX-2基因启动子序列完全匹配(图2)。同时, 将构建好的pGL3-Basic-COX-2-promoter重组质粒用限制性内切酶*Bgl* II和*Hind* III进行双酶切鉴定, 酶切产物电泳可见约4818 bp和562 bp的条带, 与插入的COX-2启动子目的片段和线性pGL3-Basic大小完全

一致(图3)。

2.3 重组质粒的功能鉴定 重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter和内参质粒pRL-SV40共转染人胃癌MKN45细胞后, 测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶报告基因活性, 并将两者的比值作为衡量COX-2启动子活性的依据, pRL-SV40作为内参可以消除由于细胞数目及转染效率等不同所带来的组间差异。结果显示, 与载体质粒pGL3-Basic相比, 重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter转染MKN45细胞后, COX-2的表达显著增强, 两者相比, 具有显著的统计学意义($P < 0.001$)(图4)。

2.4 *H. pylori*对COX-2启动子活性的影响 将重组质粒与内参质粒转染MKN45细胞4 h后, 吸弃转染培养液常规培养16-24 h, 分别加入*H. pylori* PBS混悬液(*H. pylori*: MKN45 = 100:1), 处理后8、16、24、32、40、48 h收集样品, 进行双荧光素酶活性检测。结果显示, pGL3-Basic-COX-2-promoter转染MKN45细胞后, COX-2启动子的活性随时间的变化呈现明显的上升趋势, 在转染40 h后达到最大值, 与转染8 h组相比活性增高3.5倍($P < 0.01$)。转染有pGL3-Basic-COX-2-

■创新盘点

本研究采用基因重组技术将COX-2基因启动子连接到具有多克隆位点的pGL3-Basic载体质粒上, 构建能够瞬时表达COX-2活性的重组质粒, 为研究抗肿瘤药物的作用靶点提供了实验平台。

■应用要点

同时检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性来反应COX-2基因启动子的转录活性,可应用于批量筛选以COX-2基因为靶向的抗肿瘤药物,具有靶点明确、高效快速、反应灵敏等特点。

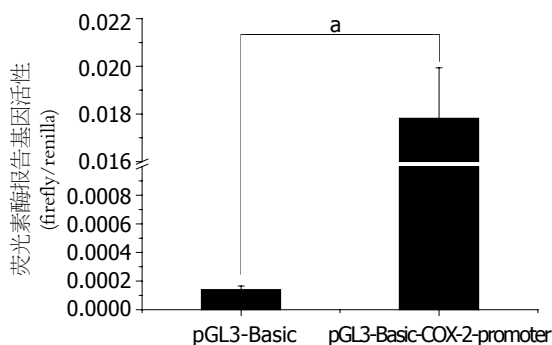


图4 重组质粒转染MKN45细胞后COX-2启动子的表达。^a $P < 0.001$ 。

promoter的MKN45细胞与*H. pylori*共培养16 h后, COX-2启动子的活性明显增强,并随时间的变化呈上升的趋势,40 h达到最大值,与转染8 h组相比活性增高5倍($P < 0.01$),各时间点之间都有明显的统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图5)。

3 讨论

环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)是前列腺素生物合成的重要限速酶,可将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物^[6],目前研究发现COX至少有COX-1和COX-2两种同工酶^[7]。COX-1为结构型(constitutive)基因,在正常组织和细胞内表达,参与维持其正常的生理功能;COX-2为诱导型(inducible)基因,静息时不表达,当细胞受到各种诱导因子刺激时表达上调,迅速合成,是炎症过程中一个重要的诱导酶,并参与肿瘤的发生及发展,可作为炎症及肿瘤的一个重要的治疗靶分子^[4,6,9]。COX-2的表达在不同的组织、不同的状况下变动很大,他的主要产物是环前列腺素和PGE₂^[8]。COX-2基因全长8.3 kb,由10个外显子和9个内含子组成,定位于第1号染色体1q25.2-25.3,由5'端0.8 kb的转录起始点上游区,6 kb的蛋白质编码区以及1.5 kb 3'端非编码区组成,转录调控序列包括TATA box序列、CRE(cAMP responsive element)反应元件、Ets-1转录因子位点和C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)反应元件各1个,激活蛋白质-2(activator protein, AP-2)位点、核转录因子NF-κB(nuclear factor-kappa B)位点各2个,SP1位点3个,其mRNA约4.5 kb,基因编码603或604个氨基酸,含有17个氨基酸残基构成的信号肽^[9-10]。COX-2发现于广泛存在于各种肿瘤细胞中,主要定位于核膜,COX-2产生的PGs产物可进入核内,调节靶细胞基因的转录水平和影响下游的

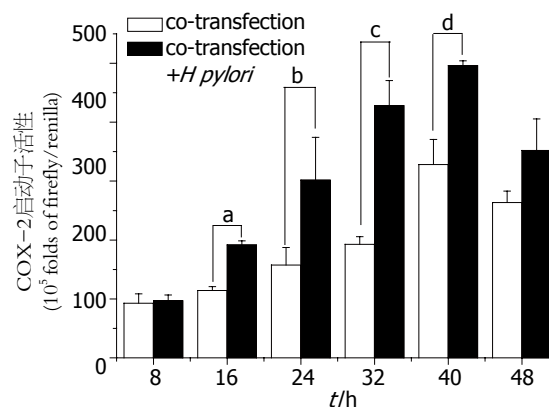


图5 *H. pylori*在不同的时间点对COX-2启动子活性的影响。^{a,c} $P < 0.05$; ^{b,d} $P < 0.01$ 。

信号转导。COX-2在肿瘤组织中高表达,如结直肠癌、Lewis肺癌、食道癌、膀胱癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、口腔癌、乳腺癌等^[11-16],表达强度与肿瘤组织类型和分化程度密切相关。

人类*H. pylori*是一种革兰阴性、螺旋状微生物,在一极有5-6根带鞘鞭毛,该微生物主要存在于胃黏膜的黏液层,有时向前穿过黏液层到达其下的上皮细胞。自从1983年从人胃黏膜中分离出该细菌以来,*H. pylori*已被认为是慢性活动性胃炎、十二指肠球部溃疡的重要致病因素,是胃癌的高危因素之一^[17]。1998年, Sawaoka *et al*^[18]首先进行了27例无症状健康体检者胃窦黏膜COX-2表达情况,证实了*H. pylori*感染诱导胃黏膜COX-2表达。此后,国内外相继又有研究人员用不同方法从mRNA、蛋白水平证实了*H. pylori*感染的胃癌组织COX-2表达水平上调^[19-20]。国内有相关研究认为^[21],COX-2的过表达是胃癌发生的早期事件,随着癌前病变的进展COX-2蛋白表达递增,COX-2不仅与早期胃癌的发生有关,同时与胃癌的恶性进展密切相关。卢启明 *et al*^[22]进行的流行病学研究提示,*H. pylori*感染可导致胃黏膜萎缩,肠上皮化生及异型增生,特别是VagA+菌株为高毒菌株,与胃癌及癌前病变关系更为密切。Caputo *et al*^[23]研究报道, VagA+*H. pylori*菌株可促进MKN28胃癌细胞COX-2过表达、上调VEGF mRNA及其蛋白表达,COX-2抑制剂可阻断*H. pylori*上调VEGF。Chen *et al*^[24]对71例胃癌切除标本COX-2表达、血管浸润及*H. pylori*感染状况单因素和多因素分析结果显示,COX-2表达的上调与*H. pylori*感染相关,与血管浸润高度一致。因此,*H. pylori*感染可能通过COX-2途径参与了*H. pylori*相关胃炎向癌前病变和胃癌的演进过程,增加COX-2的表达可能是*H. pylori*引起胃癌发生

的机制之一。

本研究在前期工作的基础上, 通过构建COX-2基因启动子萤火虫荧光素酶重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter, 并与含海肾荧光素酶的内参质粒pRL-SV40共转染胃癌细胞MKN45细胞, 运用双荧光素酶报告基因法(dual-luciferase reporter assay), 通过检测荧光素酶的表达量反映启动序列的活性, 探讨*H pylori*对胃癌细胞中COX-2基因启动子活性的影响及*H pylori*对胃癌细胞COX-2表达的作用。证实COX-2在胃癌细胞中可以稳定表达, 其活性受各种刺激因子的影响, *H pylori*便是其中最为常见的因素之一, *H pylori*激活pGL3-Basic-COX-2-promoter重组质粒中COX-2启动子的转录, 是胃癌细胞共转染重组质粒后COX-2过表达的重要原因。重组质粒pGL3-Basic-COX-2-promoter不仅可以用来检测不同的刺激因子对肿瘤组织或肿瘤细胞中COX-2表达的影响, 而且可以作为一个平台筛选以COX-2为靶基因的抗肿瘤药物, 是研究和筛选抗肿瘤药物的一种很有潜力的靶标, 其具体的实验可行性有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Ko SC, Chapple KS, Hawcroft G, Coletta PL, Markham AF, Hull MA. Paracrine cyclooxygenase-2-mediated signalling by macrophages promotes tumorigenic progression of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 7175-7186
- 2 Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2: 544-551
- 3 Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Tanabe T, Daly JM. Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 3977-3982
- 4 Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 96-102
- 5 Yamac D, Ayyildiz T, Coşkun U, Akyürek N, Dursun A, Seckin S, Koybasioglu F. Cyclooxygenase-2 expression and its association with angiogenesis, *Helicobacter pylori*, and clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 527-536
- 6 Sheehan KM, O'Connell F, O'Grady A, Conroy RM, Leader MB, Byrne MF, Murray FE, Kay EW. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 619-625
- 7 Zidar N, Odar K, Glavač D, Jerše M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med* 2008; 24 [Epub ahead of print]
- 8 Jia RP, Xu LW, Su Q, Zhao JH, Li WC, Wang F, Xu Z. Cyclooxygenase-2 expression is dependent upon epidermal growth factor receptor expression or activation in androgen independent prostate cancer. *Asian J Androl* 2008; 10: 758-764
- 9 Haile RW, Yochim JM, Cortessis VK, Lin J, Levine AJ, Diep A, Danenberg K, Danenberg P. A molecular/epidemiologic analysis of expression of cyclooxygenases 1 and 2, use of nonsteroidal antiinflammatory drugs, and risk of colorectal adenoma. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 4: 390-395
- 10 von Rahden BH, Brücher BL, Langner C, Siewert JR, Stein HJ, Sarbia M. Expression of cyclo-oxygenase 1 and 2, prostaglandin E synthase and transforming growth factor beta1, and their relationship with vascular endothelial growth factors A and C, in primary adenocarcinoma of the small intestine. *Br J Surg* 2006; 93: 1424-1432
- 11 Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 990-996
- 12 Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 293-297
- 13 Denkert C, Köbel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 893-903
- 14 Cheng J, Imanishi H, Liu W, Nakamura H, Morisaki T, Higashino K, Hada T. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2004; 95: 666-673
- 15 Sudbø J, Ristimäki A, Sondresen JE, Kildal W, Boysen M, Koppang HS, Reith A, Risberg B, Nesland JM, Bryne M. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. *Oral Oncol* 2003; 39: 497-505
- 16 Kase S, Osaki M, Honjo S, Hashimoto K, Adachi H, Tsujitani S, Ito H. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human esophageal mucosa, dysplasia and carcinoma. *Pathobiology* 2004; 71: 84-92
- 17 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2232-2240
- 18 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sun W, Gunawan ES, Hori M. *Helicobacter pylori* infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59: 313-316
- 19 Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157:

■同行评价

本研究设计合理, 科学性强, 书写规范、流畅, 具有较好的参考价值。

- 729-735
- 20 Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Tsukui T, Miyake K, Futagami S, Kishida T, Fukuda Y, Yamanaka N, Kobayashi M. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* 2000; 46: 782-789
- 21 孙为豪, 俞谦, 曹大中, 欧希龙, 俞婷, 钱斌, 朱峰, 孙运良. 幽门螺杆菌感染和环氧合酶-2表达在胃癌发生中的作用. *肿瘤* 2004; 24: 38-41
- 22 卢启明, 张丽萍, 姜瑞, 张岫兰, 李淑兰, 曹萍, 石丽清, 陈翔, 薛群基. 胃癌高发区人群CagA+幽门螺杆菌与胃黏膜病变的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 408-410
- 23 Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco Cdel V, Ricci V, Ciardiello F, Romano M. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2015-2021
- 24 Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Chang KJ, Lee PH. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *J Surg Oncol* 2006; 94: 226-233

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^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (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 2008-11-08)

含Apoptin基因重组腺病毒的构建及鉴定

陈澍, 金宁一, 李霄, 刘立明, 贾鹏, 刘妍, 高鹏, 陆蕴松, 迟宝荣

陈澍, 刘妍, 迟宝荣, 吉林大学第一附属医院消化内科 吉林省长春市 130021

金宁一, 李霄, 刘立明, 贾鹏, 中国人民解放军军事医学科学院全军基因工程重点实验室 吉林省长春市 130062

高鹏, 吉林省人民医院血液科 吉林省长春市 130021

陆蕴松, 吉林大学第三医院骨科 吉林省长春市 130033

陈澍, 2006年吉林大学博士, 主要从事肿瘤基因治疗研究.

吉林省科技发展计划项目资助, No. 20060566

作者贡献分布: 此课题由陈澍, 金宁一, 李霄, 刘立明, 贾鹏, 刘妍, 高鹏及迟宝荣设计; 研究过程由陈澍, 李霄, 刘立明, 贾鹏, 刘妍, 高鹏及陆蕴松操作完成; 数据分析由陈澍与李霄完成; 本论文写作由陈澍完成.

通讯作者: 金宁一, 130062, 吉林省长春市, 中国人民解放军军事医学科学院全军基因工程重点实验室. ningyij@163.com

电话: 0431-86985921 传真: 0431-87983322

收稿日期: 2008-09-04 修回日期: 2008-10-10

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Construction and identification of the recombinant adenovirus expressing Apoptin gene of chicken anemia virus

Lu Chen, Ning-Yi Jin, Xiao Li, Li-Ming Liu, Peng Jia, Yan Liu, Peng Gao, Yun-Song Lu, Bao-Rong Chi

Lu Chen, Yan Liu, Bao-Rong Chi, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Bethune Faculty of Medical Sciences of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Ning-Yi Jin, Xiao Li, Li-Ming Liu, Peng Jia, Key Laboratory of Genetic Engineering, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China

Peng Gao, Department of Hematology, People's Hospital of Jilin Province, Changchun 130021, Jilin Province, China
Yun-Song Lu, Department of Osteology, the Third Hospital Affiliated to Bethune Faculty of Medical Sciences of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China

Supported by: the Science and Technology Development Planning Program of Jilin Province, No. 20060566

Correspondence to: Dr. Ning-Yi Jin, Key Laboratory of Genetic Engineering, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China. ningyij@163.com

Received: 2008-09-04 Revised: 2008-10-10

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To construct a recombinant adenovirus carrying Apoptin gene so as to provide a basis for further studying the molecular mechanism of Apoptin gene in inducing tumor cell apoptosis.

METHODS: The plasmid pVAX1-Apoptin was

digested by endonuclease *Bam*H I and *Spe* I, and the obtained Apoptin segment was inserted into vector pacAd5 CMV K-N pA to construct a shuttle plasmid pacAd5-Apoptin. After *Pac* I digestion and linearized process, the plasmid pacAd5-Apoptin and pAD (genome plasmid) were co-transfected into AAV-293 cells by liposome mediation. The DNA containing Apoptin gene of the recombinant adenovirus was identified by plaque purification, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The titer of the obtained adenovirus was also examined.

RESULTS: The recombinant adenovirus expressed Apoptin gene and the molecular weight of the protein was about 13 kDa, which was consistent with the CVA-positive control. The protein of Apoptin could be effectively expressed in the recombinant adenovirus, and this protein had response to the CAV-positive serum. The titer of the recombinant virus was 10^{11} PFU/L.

CONCLUSION: The adenovirus containing Apoptin gene is successfully constructed, and the virus titer is able to meet the requirements of *in vitro* and *in vivo* experiments.

Key Words: Apoptin gene; Adenovirus vector; Genetherapy; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Chen L, Jin NY, Li X, Liu LM, Jia P, Liu Y, Gao P, Lu YS, Chi BR. Construction and identification of the recombinant adenovirus expressing Apoptin gene of chicken anemia virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3505-3509

摘要

目的: 构建携凋亡素(Apoptin)基因重组腺病毒, 为进一步研究Apoptin基因抗肿瘤作用分子机制建立基础.

方法: 利用*Bam*H I 和*Spe* I 双酶切质粒pVAX1-Apoptin, 获得Apoptin片段并连接入pacAd5 CMV K-N pA, 构建含Apoptin基因的穿梭质粒pacAd5-Apoptin. 利用*Pac* I 单酶切对pacAd5-

■背景资料

癌症是一个具有极复杂生物生命变化发生机制的过程, 也是严重威胁人类健康的主要疾病之一. 目前肿瘤患者数量庞大, 并随着诊断手段的发展而逐年增加. 目前对恶性肿瘤的治疗仍多采用手术治疗辅以放疗的方法, 效果不尽人意, 且有严重不良反应. 基因治疗是近年肿瘤治疗研究热点, 有别于传统方法, 着眼于调动机体自身的抗癌能力, 通过增强固有的抗肿瘤机制达到抑制肿瘤细胞及根治肿瘤的目的, 因此被认为是最有希望攻克癌症的疗法.

■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

■研究前沿

目前,肿瘤基因治疗药物的应用前景已不仅取决于其杀伤肿瘤细胞的有效性,而更加侧重于制剂的抑瘤特异性.由鸡贫血病毒(CAV)上VP3基因编码的凋亡素(Apoptin)能够特异性诱导包括肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌等人源肿瘤发生凋亡,是目前研究的热点.

Apoptin和腺病毒基因组质粒(pAd5)进行线性化处理后应用脂质体介导法共转染AAV-293细胞,分别利用蚀斑纯化和RT-PCR、Western blot等方法对重组病毒进行筛选和鉴定,并测定所获得重组病毒的滴度.

结果: 所构建重组腺病毒中的Apoptin基因得到了正确转录,表达产物的相对分子质量约为13 kDa,与CVA阳性对照一致;所获得重组腺病毒可有效表达Apoptin蛋白,该蛋白与CAV阳性血清具有反应原性,重组病毒滴度为 10^{11} PFU/L.

结论: 成功构建含Apoptin基因的重组腺病毒,所获得重组病毒的滴度可以满足体内外实验要求.

关键词: Apoptin基因;腺病毒载体;基因治疗;逆转录-聚合酶链反应;免疫印迹法

陈灏,金宁一,李霄,刘立明,贾鹏,刘妍,高鹏,陆蕴松,迟宝荣.含Apoptin基因重组腺病毒的构建及鉴定.世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3505-3509
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3505.asp>

0 引言

随着分子生物学、分子遗传学、免疫学等相关学科的发展和渗透,基因治疗特别是肿瘤基因治疗技术迅速发展,多种肿瘤基因治疗方法在理论和技术上已趋成熟,并从实验及基础研究过渡到临床试用阶段.目前,肿瘤基因治疗药物的应用前景已不仅取决于其杀伤肿瘤细胞的有效性,而更加侧重于制剂的抑瘤特异性^[1-4].由鸡贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)上VP3基因编码的凋亡素(Apoptin)能够特异性诱导包括肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌等人源肿瘤发生凋亡,而对成纤维细胞、角质化细胞、平滑肌细胞等正常没有影响^[5-7].这种特异性地诱导转化细胞和肿瘤细胞凋亡作用不依赖于野生型p53也不受Bcl-2过度表达的影响.而且Apoptin基因较小,可以插入多种载体,具有成为新的肿瘤研究策略的潜力^[7-10].因此,本研究以腺病毒为载体,构建携Apoptin基因的重组腺病毒,为进一步的体内外实验提供基础.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌感受态菌DH5 α 、CAV、AAV-293细胞和质粒pVAX1-Apoptin^[11]、pTKEGFP、pacAd5 CMV K-N pA、pAd5均由

本实验保存.胎牛血清、DMEM、opti MEM培养基购自Gibco公司;碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鸡IgY、碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠IgG购自华美生物工程公司; β -actin mAb、CAV阳性血清由本实验室制备并保存;脂质体Lipofectamine2000、TRIzol、Oligo(dT)购自Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和质粒转染: AAV-293细胞在DMEM培养液(含100 mL/L胎牛血清,100 U/L青霉素,100 U/L链霉素)中,于37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂条件下培养至对数生长期,2.5 g/L胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^8 并接种于6孔(2 mL/孔)细胞培养板,培养24 h后用于转染或病毒接种.通过脂质体介导法将10 μ g线性化的pacAd5-Apoptin和pAd5共转染AAV-293细胞,即在500 μ L opti MEM中,加入10 μ L Lipofectamine2000并混匀;另取500 μ L opti MEM加入线性化产物并混匀,两者混合后于室温下作用30 min,将上述混合液滴加入AAV-293细胞中,于37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂条件下培养6 h.同时设pTKEGFP转染阳性对照.

1.2.2 穿梭质粒构建: 用BamH I和Spe I分别双酶切质粒pVAX1-Apoptin和pacAd5 CMV K-N pA.回收约366 bp的Apoptin线性化的pacAd5 CMV K-N pA,两者连接后转化大肠杆菌感受态菌DH5 α ,挑菌后小量提取质粒,并用BamH I和Spe I双酶切进行鉴定.实验方法参照分子克隆^[12].

1.2.3 含Apoptin基因的重组腺病毒构建: 用Pac I对PacAd5-Apoptin和pAd进行酶切线性化处理,酶切产物用无水乙醇沉淀回收,并将线性化产物共转染AAV-293细胞,培养7-10 d后挑取病毒蚀斑,经3次冻融后用AAV-293细胞进行蚀斑扩增,经扩增的重组病毒用于RT-PCR和Western blot鉴定.

1.2.4 RT-PCR检测: 培养接种重组病毒后的AAV-293细胞至80%-90%发生病变时用TRIzol抽提总RNA,以Oligo(dT)为引物进行反转录以合成cDNA.以3 μ L cDNA为模板,以Apoptin特异引物进行PCR检测. PCR扩增的反应体系为: 2.5 μ L 10 $\times$ Buffer, 0.5 μ L 10 mmol/L dNTP, 上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, 1 μ L Taq DNA聚合酶, 加水到25 μ L. Apoptin反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳. 以CAV感染细胞作为阳性对照, 以未

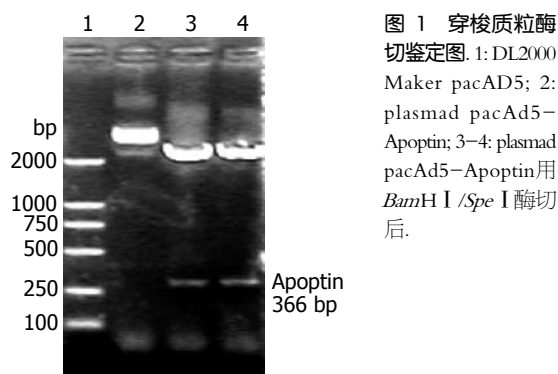


图1 穿梭质粒酶切鉴定图: 1: DL2000 Maker pacAD5; 2: plasmid pacAd5-Apoptin; 3-4: plasmid pacAd5-Apoptin用 *Bam*H I /*Spe* I 酶切后。

感染重组病毒的AAV-293细胞作为阴性对照。

1.2.5 Western blot检测: 培养接种重组病毒后的AAV-293细胞至80%-90%发生病变时收获细胞, 经预冷磷酸盐缓冲液洗涤, 收集至含400 μ L裂解缓冲液(50 mmol/L Tris, pH7.4, 250 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 20 mmol/L β -磷酸甘油, 5 mmol/L NaF, 1 μ g/mol亮肽酶素, 200 mg/L胰岛抑素, 1 mg/L胃酶抑素)离心管中, 冰浴30 min后于样品缓冲液(50 mmol/L Tris, pH7.4, 100 mmol/L二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%甘油)中煮沸3 min, 12 000 *g*, 离心10 min, 上清液经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜于含5%脱脂乳封闭2 h, 先后与CAV阳性血清和AP标记的羊抗鸡IgY或 β -actin mAb和AP标记的羊抗鼠IgG温育2 h, 并于NBT和BCIP溶液中显色。CAV感染细胞的提取物作为阳性对照, 未感染重组病毒的AAV-293细胞提取物作为阴性对照。

1.2.6 重组腺病毒的滴度测定: 鉴定正确的重组病毒扩增后做连续10倍梯度稀释, 并接种于24孔板培养的AAV-293细胞, 培养3-5 d, 以出现细胞病变的最大稀释倍数为依据, 按以下公式计算病毒滴度: 病毒滴度 = 细胞病变数 $\times$ 稀释倍数/病毒接种量(mL)。

2 结果

2.1 pacAd5-Apoptin的构建 穿梭质粒pacAd5-VP3经*Bam*H I 和*Spe* I 双酶切后出现366 bp条带(图1), 成功构建了含Apoptin基因的穿梭质粒。

2.2 重组腺病毒蚀斑筛选 pTKEGFP与线性化的pacAd5-VP3和pAd5分别转染AAV-293细胞转染, 培养24 h后, 可观察到pTKEGFP转染孔细胞呈现明亮绿色荧光(图2), 质粒已成功转染入AAV-293细胞内。继续培养7-10 d后, pacAd5-Apoptin和pAd5共转染孔出现细胞病毒, 重组病

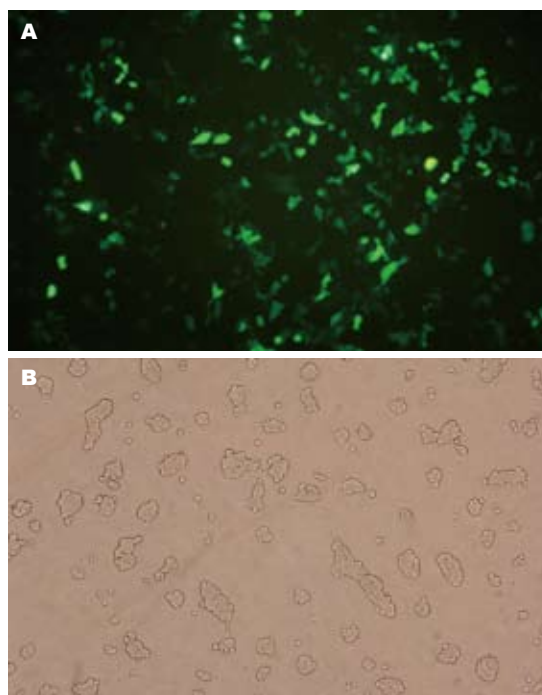


图2 质粒转染AAV-293细胞结果。A: pTKEGFP转染细胞; B: 正常细胞。

毒已包装完成(图3)。

2.3 重组腺病毒RT-PCR鉴定 对重组腺病毒感染AAV-293细胞的总RNA进行RT-PCR检测, 可扩增出与CAV感染细胞大小一致的条带, 重组腺病毒中的Apoptin基因得到了正确转录(图4)。

2.4 重组腺病毒Western blot鉴定 可见相对分子质量13 kDa的特异条带, 与CVA阳性对照一致。所获得重组腺病毒可有效表达Apoptin蛋白, 该蛋白与CAV阳性血清具有反应原性(图5)。

2.5 重组腺病毒滴度 对经筛选和鉴定正确的重组腺病毒进行滴度测定, 重组腺病毒滴度约为 10^{11} PFU/L。

3 讨论

基因治疗的本质就是目的基因、载体与转染的问题, 其关键就是目的基因的选择。宗旨在于将外源基因导入肿瘤细胞, 使之表达目的蛋白质以达到治疗肿瘤的效果。腺病毒载体具有滴度高、感染范围广、DNA不整合到宿主染色体、可插入7-8 kb的外源DNA片段等优点, 目前已成为基因治疗、基因功能研究、反义治疗、疫苗开发等领域最为常用的载体之一^[13]。但重组腺病毒污染野生型病毒的问题一直没有得到很好的解决。本研究采用RAPAd I 重组腺病毒系统^[14]进行重组腺病毒的构建, 该系统将与腺病毒复制和包装相关信号序列从腺病毒基因组骨架质

■创新盘点

本研究利用RAPAd I 重组腺病毒系统成功构建了表达Apoptin基因的重组腺病毒。实验结果表明, 本研究所构建的重组腺病毒能够有效表达Apoptin基因, 并且所表达Apoptin基因与CAV阳性血清具有反应原性。

■应用要点

腺病毒载体具有滴度高、感染范围广、DNA不整合到宿主染色体、可插入7-8 kb的外源DNA片段等优点,目前已成为基因治疗、基因功能研究、反义治疗、疫苗开发等领域最为常用的载体之一。

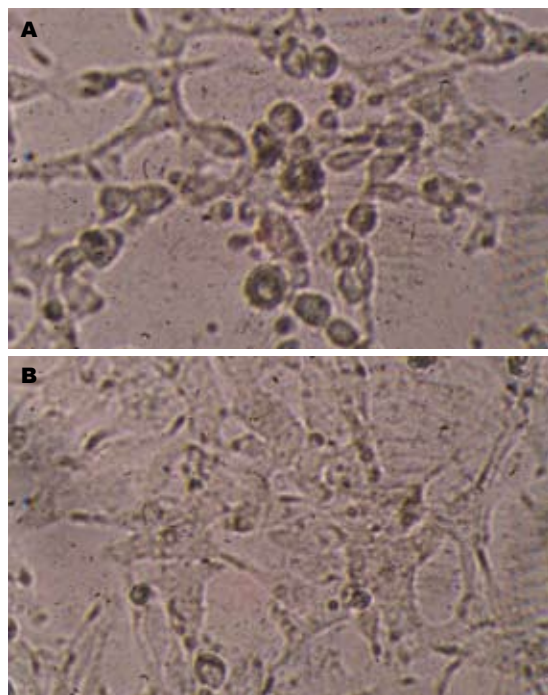


图3 重组腺病毒包装后形成细胞病变结果. A: 病变细胞; B: 正常AAV-293细胞.

粒内敲除,并转移至穿梭质粒中,使得只有腺病毒基因组骨架质粒与穿梭质粒重组后,腺病毒才能够包装并增殖.因此,应用RAPAd I系统所构建的重组腺病毒在理论上都是经过同源重组的,这大大降低了野生型腺病毒污染的机会.

细胞凋亡(apoptosis)又称为细胞程序性死亡,是细胞自主死亡的过程,也是凋亡相关基因调控的结果.近年研究发现,病毒感染是调节细胞凋亡的重要因素,病毒感染后不仅可通过自身基因的表达激活或抑制细胞凋亡的发生,也可与细胞凋亡调节基因一起共同参与凋亡的调控.放疗和化疗是目前常用的肿瘤非手术疗法,其机制是通过野生型 $p53$ 的介导细胞凋亡.触发CAV诱导肿瘤细胞凋亡的因子是由该病毒VP3基因编码的Apoptin蛋白.目前,Apoptin识别恶性转化细胞的确切机制尚不十分明确,有待进一步探讨.但有研究表明Bcl-2家族成员能够促进Apoptin的功能而不是抑制其作用,说明Apoptin诱导肿瘤细胞凋亡的途径与经典凋亡通路存在差别^[15-19]. Apoptin含有一段核定位信号,使其能够进入转化细胞或恶变细胞的细胞核内^[20],同时引起这类细胞凋亡.而对正常细胞,Apoptin只存在于核周围的细胞质而不进入细胞核,不引起正常细胞的凋亡,对正常细胞无毒性^[21-26].有研究表明,Apoptin的核定位可能是其诱发细胞凋亡的前提之一^[20,27-29].由于大部分肿瘤细胞具有

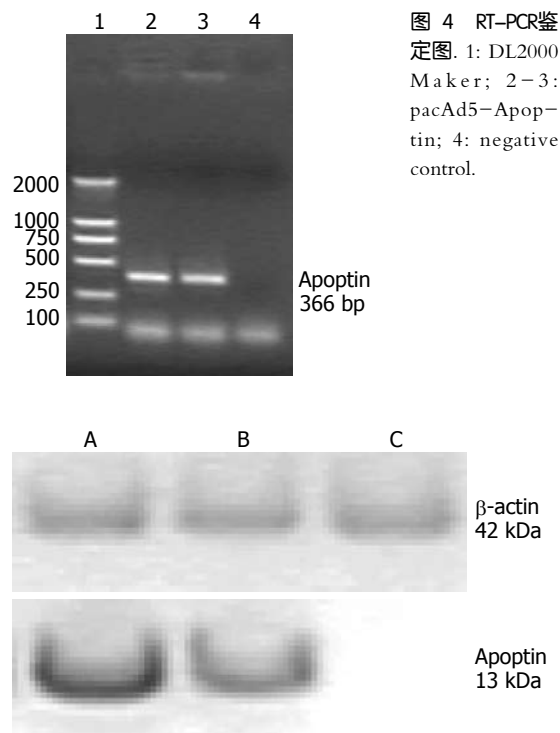


图4 RT-PCR鉴定图. 1: DL2000 Maker; 2-3: pacAd5-Apoptin; 4: negative control.

图5 Western blot鉴定Apoptin表达. A: 重组腺病毒感染细胞; B: Apoptin感染细胞; C: 正常细胞.

$p53$ 突变或缺失,使得传统抗肿瘤方法效果不佳,因此,这种非 $p53$ 依赖性使凋亡蛋白质作为抗肿瘤药物有很好的前景.

为进一步探讨Apoptin基因诱导肿瘤细胞凋亡及区分恶性细胞和正常细胞的机制,本研究利用RAPAd I重组腺病毒系统成功构建了表达Apoptin基因的重组腺病毒.实验结果表明,本研究所构建的重组腺病毒能够有效表达Apoptin基因,并且所表达Apoptin基因与CAV阳性血清具有反应原性.重组腺病毒滴度为 10^{11} PFU/L,能够满足体内外研究的需要.

4 参考文献

- 1 Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 187-215
- 2 Maddika S, Wiechec E, Ande SR, Poon IK, Fischer U, Wesselborg S, Jans DA, Schulze-Osthoff K, Los M. Interaction with PI3-kinase contributes to the cytotoxic activity of apoptin. *Oncogene* 2008; 27: 3060-3065
- 3 Maddika S, Bay GH, Krocak TJ, Ande SR, Maddika S, Wiechec E, Gibson SB, Los M. Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death. *Cell Prolif* 2007; 40: 835-848
- 4 Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, Zimmerman R, Visser M, Voskamp P, Zhang YH, Noteborn M. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation. *Annu Rev Pharmacol*

- Toxicol* 2008; 48: 143-169
- 5 Oro C, Jans DA. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus. *Curr Drug Targets* 2004; 5: 179-190
 - 6 李霄, 金宁一, 连海, 陈立刚, 孙丽丽, 李萍. Apoptin基因对人胃癌细胞BGC-823的抑制效应及与凋亡信号转导的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2991-2996
 - 7 Rohn JL, Noteborn MH. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. *Apoptosis* 2004; 9: 315-322
 - 8 van der Eb MM, Pietersen AM, Speetjens FM, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Noteborn MH, Hoebe RC. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 53-61
 - 9 Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, Voorhoeve M, Rommelaere J, Noteborn MH, Cornelis JJ. Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 958-965
 - 10 Li X, Jin N, Mi Z, Lian H, Sun L, Li X, Zheng H. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 2006; 119: 2948-2957
 - 11 李霄, 金宁一, 连海, 管国芳, 孙丽丽, 李雪梅, 郑洪玲. 表达新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶基因重组禽痘病毒的构建及其抑瘤作用. *科学通报* 2006; 51: 2252-2257
 - 12 Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 16-68
 - 13 Bernt KM, Ni S, Tieu AT, Lieber A. Assessment of a combined, adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 4343-4352
 - 14 Anderson RD, Haskell RE, Xia H, Roessler BJ, Davidson BL. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 2000; 7: 1034-1038
 - 15 Burek M, Maddika S, Burek CJ, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Los M. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 2006; 25: 2213-2222
 - 16 Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, Bazan V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7: viii115-viii123
 - 17 Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Bhardwaj N, Sylvester A. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumours in chicken. *J Gen Virol* 2006; 87: 2933-2940
 - 18 Schoop RA, Kooistra K, Baatenburg De Jong RJ, Noteborn MH. Bcl-xL inhibits p53- but not apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Cancer* 2004; 109: 38-42
 - 19 Peng DJ, Sun J, Wang YZ, Tian J, Zhang YH, Noteborn MH, Qu S. Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 66-73
 - 20 Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 10-19
 - 21 Danen-Van Oorschot AA, Zhang YH, Leliveld SR, Rohn JL, Seelen MC, Bolk MW, Van Zon A, Erkeland SJ, Abrahams JP, Mumberg D, Noteborn MH. Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 27729-27736
 - 22 Alvisi G, Poon IK, Jans DA. Tumor-specific nuclear targeting: promises for anti-cancer therapy? *Drug Resist Updat* 2006; 9: 40-50
 - 23 Poon IK, Oro C, Dias MM, Zhang J, Jans DA. Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 7059-7064
 - 24 He X, Zhang Q, Liu Y, He P. Apoptin Induces Chromatin Condensation in Normal Cells. *Virus Genes* 2005; 31: 49-55
 - 25 Gdynia G, Lehmann-Koch J, Sieber S, Tagscherer KE, Fassl A, Zentgraf H, Matsuzawa S, Reed JC, Roth W. BLOC1S2 interacts with the HIPPI protein and sensitizes NCH89 glioblastoma cells to apoptosis. *Apoptosis* 2008; 13: 437-447
 - 26 Han SX, Ma JL, Lv Y, Huang C, Liang HH, Duan KM. Secretory Transactivating Transcription-apoptin fusion protein induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3642-3649
 - 27 Heilman DW, Teodoro JG, Green MR. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. *J Virol* 2006; 80: 7535-7545
 - 28 Tavassoli M, Guelen L, Luxon BA, Gäken J. Apoptin: specific killer of tumor cells? *Apoptosis* 2005; 10: 717-724
 - 29 Wang QM, He FC. [Molecular mechanism of specific induction of apoptosis in tumor cells by apoptin] *Ai Zheng* 2005; 24: 509-512

同行评价

本研究为肿瘤治疗的前沿课题, 有重要的临床应用前景, 所用方法先进, 实验结果照片清晰, 分辨性好, 讨论较客观, 行文流畅, 具有较好的学术价值。

编辑 史景红 电编 何基才

实时荧光定量RT-PCR对胃癌组织中hPMS2 mRNA的检测及其临床意义

徐光香, 刘希双, 杨 堃

■背景资料

hPMS2是一种重要的错配修复基因,其功能缺陷与多种肿瘤的发生密切相关。错配修复基因表达失调可能是错配修复基因功能丧失的主要原因。本文通过研究胃癌中错配修复基因hPMS2 mRNA的水平,探讨hPMS2基因异常转录在胃癌发生过程中的作用。

徐光香, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科 山东省青岛市 266003

杨堃, 青岛大学医学院附属医院分子生物学实验室 山东省青岛市 266003

徐光香, 2006级青岛大学医学院消化科在读硕士, 主要从事胃癌方面的研究。

青岛市科技计划资助项目, No. 06-2-2-5-nsh-3

作者贡献分布: 此课题由徐光香, 刘希双及杨堃设计; 研究过程由徐光香操作完成; 研究所用器材及分析工具由杨堃提供; 数据分析及本论文写作由徐光香与刘希双完成。

通讯作者: 刘希双, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科。liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2008-09-18 修回日期: 2008-10-11

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Detection of hPMS2 mRNA in gastric cancer using real-time fluorescent quantitative RT-PCR and its clinical significance

Guang-Xiang Xu, Xi-Shuang Liu, Kun Yang

Guang-Xiang Xu, Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Kun Yang, Laboratory of Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Qingdao, No. 06-2-2-5-nsh-3

Correspondence to: Dr. Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2008-09-18 Revised: 2008-10-11

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of DNA mismatch repair gene hPMS2 and its clinical significance in gastric cancer.

METHODS: Real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the level of hPMS2 mRNA respectively in 41 cases of gastric cancer and 37 cancer-adjacent mucosa samples of atrophic gastritis and 25 cases of chronic atrophic gastritis and 20 cases of chronic superficial gas-

tritis. The human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) gene was used as a reference for normalization of the expression level.

RESULTS: The expression levels of hPMS2 mRNA in gastric cancer, the corresponding cancer-adjacent mucosa, chronic atrophic gastritis and chronic superficial gastritis were 28.33 ± 14.05 , 16.88 ± 10.67 , 7.25 ± 8.72 and 1.78 ± 1.34 , respectively. Significant differences were detected among the four groups ($F = 31.82$, $P = 0.00$). The expression level of hPMS2 mRNA was markedly higher in gastric cancer than in the other tissues ($P < 0.01$), and significantly higher in the corresponding cancer-adjacent mucosa than in nonneoplastic mucosa ($P < 0.01$), but no significant difference was detected between chronic atrophic gastritis and chronic superficial gastritis. The expression of hPMS2 in gastric cancer had no obviously relationship with the size, the degree of infiltration of tumor nor the metastasis of lymph node.

CONCLUSION: The abnormal transcription of hPMS2 gene may be related to gastric cancer, but not involved in the development of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; DNA mismatch repair gene; hPMS2 mRNA; Real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

Xu GX, Liu XS, Yang K. Detection of hPMS2 mRNA in gastric cancer using real-time fluorescent quantitative RT-PCR and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3510-3514

摘要

目的: 探讨DNA错配修复基因hPMS2在胃癌组织中的表达水平及其临床意义。

方法: 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对41例胃癌患者的癌组织、37例癌旁萎缩性胃炎组织、25例慢性萎缩

■同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科; 田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院

性胃炎组织及20例慢性浅表性胃炎组织中hPMS2 mRNA进行定量检测,以三磷酸甘油醛脱氢酶基因(hGAPDH)为内参照。

结果:胃癌组织、癌旁萎缩性胃炎组织、慢性萎缩性胃炎组织及慢性浅表性胃炎组织中hPMS2 mRNA的含量分别是 28.33 ± 14.05 , 16.88 ± 10.67 , 7.25 ± 8.72 和 1.78 ± 1.34 ,四组相比差异有显著性($F = 31.82$, $P = 0.00$)。胃癌组织中hPMS2 mRNA含量明显高于其他三组;癌旁萎缩性胃炎组织中含量明显高于非胃癌患者的胃炎组织,差异均有显著性($P < 0.01$);而非胃癌患者的慢性萎缩性胃炎组织中hPMS2 mRNA的含量与慢性浅表性胃炎组织相比差别无显著性。hPMS2 mRNA含量与肿瘤的大小、浸润深度、有无淋巴结转移关系不明显,差异均无显著性。

结论:hPMS2基因的异常转录可能与胃癌的发生有关,而与胃癌的发展关系不大。

关键词:胃癌;错配修复基因;hPMS2 mRNA;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应

徐光香, 刘希双, 杨堃. 实时荧光定量RT-PCR对胃癌组织中hPMS2 mRNA的检测及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3510-3514
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3510.asp>

0 引言

错配修复基因(mismatch repair genes, MMR genes)属管家基因,负责对细胞内错配碱基进行修复,其中任何一个或多个的变异都会引起DNA错配修复错误致肿瘤易感^[1]。有报道称hPMS2体系的突变是人类遗传性非息肉性结肠癌(hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC)和Turcot's综合征(Turcot's syndrome, TS)的少见原因之一^[2]。迄今为止,国内外对hPMS2在胃癌发生发展中的作用研究尚少。本研究采用实时荧光定量RT-PCR技术检测在人胃癌、癌旁萎缩性胃炎、慢性萎缩性胃炎及慢性浅表性胃炎组织中hPMS2 mRNA的水平,探讨hPMS2基因与胃癌发生、发展的关系,进一步了解胃癌发生发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2005-08青岛大学医学院附属医院普外科手术切除的胃癌组织41例,男28例,女13例,年龄35-80(中位年龄59)岁,术前未经放化疗。每例均取相应癌旁组织,即距离癌组织边

缘5 cm的胃组织,选择其中的慢性萎缩性胃炎组织作为癌旁萎缩性胃炎组,共37例。胃镜活检25例慢性萎缩性胃炎组织,男10例,女15例,年龄37-75(中位年龄55)岁;慢性浅表性胃炎组织20例,男5例,女15例,年龄33-75(中位年龄54)岁。将新鲜组织置液氮速冻后存于-70℃冰箱备用。全部病例均经病理检验证实。引物采用FastPCR设计, hPMS2上游引物为5'-GCA CTG AGC GAT GTC ACC ATT-3',下游引物是5'-TTC CTT ATG GCG CAC AGG TAG T-3', PCR产物长度为171 bp。内参hGAPDH上游引物为5'-TCA TGG GTG TGA ACC ATG AGA A-3',下游引物为5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3', PCR产物长度为146 bp,均由上海生工生物工程技术有限公司合成。hPMS2的TapMan荧光探针序列5'(FAM)-TAT CCA GAA AAC CCC CTA CCC CCG C(TAMRA)-3',内参hGAPDH的TapMan荧光探针序列5'(FAM)-TCA TCA GCA ATG CCT CCT GCA CCA(TAMRA)-3'均由大连宝生物有限公司合成。荧光定量RT-PCR试剂购于大连宝生物有限公司。

1.2 方法 采用TRIzol法提取总RNA。10 μL逆转录反应体系: 5×PrimeScript™ Buffer 2 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer 0.5 μL, Random 6 mers 0.5 μL, Total RNA 2 μL, RNase Free dH₂O 4.5 μL。反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 2 min, -20℃保存备用。20 μL PCR反应体系: Premix Ex Taq™ 10 μL, 上下游引物各0.7 μL, 0.8 μL荧光探针溶液, ROX Reference Dye II 0.4 μL, cDNA溶液2 μL, dH₂O 5.4 μL。PCR扩增条件: 95℃ 10 min预变性; 95℃ 5 s, 60℃ 45 s, 共40个循环。7500 Real-Time PCR System仪器反应,反应结束后,由7500 Real-Time PCR软件自动记录荧光曲线并分析计算出Ct值。建立hGAPDH作为内对照,检测被测样品RNA的完整性和可靠性。结果的计算: $\Delta\Delta C_t = (\text{样品} C_t \text{均值} - \text{内参照} C_t \text{均值}) - (\text{对照样品} C_t \text{均值} - \text{对照内参照} C_t \text{均值})$, 然后取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即代表被检样品初始hPMS2 mRNA的含量。

统计学处理 采用SPSS11.5软件处理系统进行统计学分析。hPMS2 mRNA的相对含量以mean±SD表示。统计学方法采用单因素方差分析及t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPMS2 mRNA的含量 胃癌组织、癌旁萎缩

■研究前沿

错配修复基因在胃癌发生中作用逐渐受到重视,其中对hMLH1、hMSH2及hMSH6基因的研究较充分,对hPMS2基因在胃癌中的变化也受到越来越多的关注。错配修复基因表达异常有可能成为判断胃癌是否发生的一项新指标。

■创新盘点

本文应用实时荧光定量RT-PCR技术从mRNA水平阐述hPMS2基因在胃癌组织中存在转录异常。

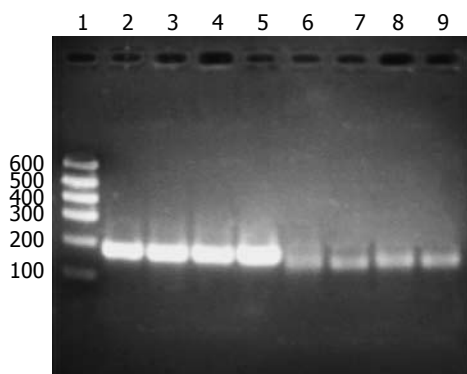


图1 hPMS2和hGAPDH的RT-PCR产物电泳图。1: DNA Marker; 2: 胃癌组织; 3: 癌旁萎缩性胃炎组织; 4: 慢性萎缩性胃炎组织; 5: 慢性浅表性胃炎组织; 6-9: 2-5的相应内参照hGAPDH。

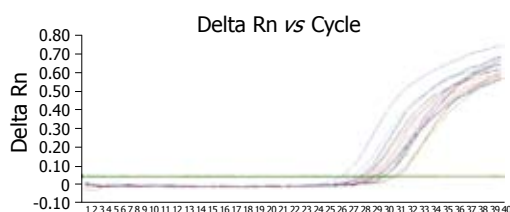


图2 实时荧光扩增曲线。

性胃炎组织、非胃癌患者的慢性萎缩性胃炎组织及慢性浅表性胃炎组织中均检测到hPMS2及hGAPDH基因的表达(图1-2)。hPMS2 mRNA在胃癌组织、癌旁萎缩性胃炎组织、非胃癌患者的慢性萎缩性胃炎组织及慢性浅表性胃炎组织中hPMS2 mRNA的含量分别为 28.33 ± 14.05 , 16.88 ± 10.67 , 7.25 ± 8.72 和 1.78 ± 1.34 , 依次降低。四组间相比差异有显著性($F = 31.82$, $P = 0.00$); 采用SNK法各组间相比: 胃癌组织中含量明显高于其他三组; 癌旁萎缩性胃炎组织中含量明显高于非胃癌患者的胃炎组织, 差异均有显著性($P = 0.00$); 慢性萎缩性胃炎组织中含量与慢性浅表性胃炎组织相比, 差异无显著性($P = 0.071$)。

2.2 不同临床参数胃癌组织中hPMS2 mRNA水平 hPMS2 mRNA含量在不同大小肿瘤组织、不同程度浸润癌组织、有无淋巴结转移癌组织中的差异均无统计学意义(表1)。

3 讨论

DNA错配修复(MMR)系统由一系列能特异修复DNA碱基错配的酶分子组成。目前从人体细胞中共分离克隆到9个MMR基因, 其通过编码不同的MMR蛋白, 特异性识别并修复错配碱基, 保持遗传物质的稳定性。MMR基因发生异常时, 无法修复DNA复制过程中出现的碱基错配, 造成

表1 不同临床参数胃癌组织中hPMS2 mRNA的含量

临床参数	n	hPMS2 mRNA水平	t	P
肿瘤大小(cm)				
<5	13	43.28 ± 18.08	1.190	0.24
>5	28	33.21 ± 21.82		
浸润深度				
浆膜内	7	36.28 ± 25.94	0.138	0.89
浆膜外	34	34.73 ± 20.72		
淋巴结转移				
有	11	38.43 ± 25.25	0.530	0.59
无	30	33.96 ± 20.00		

细胞内遗传物质突变率增加, 产生遗传不稳定性, 引起细胞恶性转化。现已发现90%的HNPCC患者存在一个或多个MMR基因的变异, 主要是hMLH1、hMSH2及hMSH6基因的甲基化或突变^[3-5], 而在其他散发性肿瘤如卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、肝癌、乳腺癌以及膀胱癌中亦可检测到一个或多个MMR基因的变异^[6-8]。

hPMS2基因位于染色体7p22上, 包含15个外显子。正常组织中hPMS2蛋白位于细胞核内, 在消化道上皮细胞、卵巢和睾丸组织中含较高^[9-10]。hPMS2蛋白氨基末端片段具有与DNA结合的活性, 与hMLH1蛋白形成hMutL- α 异源二聚体, 结合到DNA链上启动错配修复; 同时hPMS2基因也通过介导DNA损伤细胞的凋亡发挥抗肿瘤作用^[11]。目前对hPMS2基因在肿瘤中的研究主要集中在hPMS2 DNA的突变上。多项研究提出在HNPCC和Turcot's综合征中检测到hPMS2 DNA存在多位点突变^[2,12-13]; Balogh *et al*^[14]发现在原发性乳腺癌中hPMS2基因亦存在多处移码或缺失突变, 但尚未发现突变热点。本研究应用实时荧光定量RT-PCR技术对胃癌组织、癌旁萎缩性胃炎组织、慢性萎缩性胃炎组织及慢性浅表性胃炎组织中hPMS2 mRNA进行定量检测。

研究结果显示, 在胃癌及癌旁萎缩性胃炎组织中hPMS2 mRNA含量明显高于非胃癌患者胃炎组织中含量, 提示胃癌及癌旁萎缩性胃炎组织中hPMS2基因转录增加。张媛 *et al*^[15]发现hPMS2 mRNA在宫颈癌细胞中亦增加。多项研究证实在胃癌组织中hMLH1启动子区的甲基化导致hMLH1基因失活, 使组织中仅表达少量的hMLH1蛋白^[16-17]。本研究证实hPMS2基因在胃癌及癌旁萎缩性胃炎组织中不但没有失活反而存在过度激活现象。hPMS2基因过度激活的可能机制: 机体细胞在正常生理状态下, 不存在遗

传物质的变异, 所以hPMS2基因处于低转录状态; 细胞在增殖过程中一旦出现遗传物质的错配, hPMS2基因则被激活, 修复错配的基因, 但hPMS2基因可能存在突变产生不全蛋白导致错配基因不能修复^[18], 从而形成恶性循环, 增加的错配基因进一步激活hPMS2基因, 导致hPMS2 mRNA含量增加. Balogh *et al*^[14]曾提出在乳腺癌组织中因hPMS2基因的移码或点突变, 导致转录的mRNA出现错误, 产生缺陷蛋白导致不能修复错配基因, 其研究结果亦支持上述推论. 但胃癌组织中hPMS2基因过度激活的具体机制还有待进一步研究.

癌旁组织细胞与癌细胞处于同一内外环境中, 有相同的遗传物质, 被看作肿瘤易发组织^[19-20]. 我们研究数据显示癌旁萎缩性胃炎组织中hPMS2 mRNA含量明显高于非胃癌患者的萎缩性胃炎组织及浅表性胃炎组织, 更接近胃癌组织中的含量, 提示hPMS2基因转录异常积累到一定水平后可促使组织向癌的演变, 这可能是胃癌术后残胃发生癌变的机制之一, 但其作用机制尚不明确. 对胃癌术后患者定期复查hPMS2 mRNA含量, 有望早期预测残胃癌变的可能性, 以便早期采取防治措施, 减少残胃再发癌.

慢性萎缩性胃炎是一种癌前疾病, 其发生胃癌的危险明显高与普通人群^[19-20]. 我们研究发现hPMS2 mRNA的含量在慢性萎缩性胃炎组织中与在慢性浅表性胃炎组织中差异无显著性, 但萎缩性胃炎组织中含量高于浅表性胃炎组织, 更接近于癌组织, 提示hPMS2基因转录异常的积累有可能是部分萎缩性胃炎组织向癌组织转化的促进因素之一, 这一结论还有待加大样本量进一步研究.

慢性浅表性胃炎部分可进展成慢性萎缩性胃炎, 而后者有较高发生癌的危险性^[21]. 本研究结果显示, hPMS2 mRNA在浅表性胃炎组织、萎缩性胃炎组织及癌组织中的含量逐渐增加, 即随着组织损伤的加重, hPMS2基因转录异常增加, 反映了异常基因的积累促使癌发生的过程. 但在不同大小的肿瘤组织、不同浸润程度癌组织、有无淋巴结转移及不同病理分级癌组织中hPMS2基因的转录水平差异均无显著性 ($P>0.05$), 提示hPMS2基因转录失调可能只与肿瘤的发生相关, 与肿瘤的发展相关性不大. 所以应用实时荧光定量RT-PCR技术对hPMS2 mRNA进行定量检测有望对胃癌的早期发现, 早期治疗提供依据.

胃癌的发生是一个多因素、多步骤、多阶段发展过程, 涉及癌基因、抑癌基因、凋亡相关基因等的改变. hPMS2基因改变在胃癌发生中的作用逐渐受到重视, 但其作用机制还有待进一步研究. 因本实验是对hPMS2 mRNA的定量检测, 未对其全部序列进行测定, 且hPMS2 mRNA在翻译成蛋白质的过程中受多种因素的调节, 所以hPMS2 mRNA的表达不能代表hPMS2蛋白的水平, 应对其从基因到蛋白表达和作用的各个环节做进一步分析研究, 以明确hPMS2 mRNA在胃癌组织中增加的机制.

4 参考文献

- 1 Buermeyer AB, Deschênes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 533-564
- 2 De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano MI, Belli G, Iannelli A, Ciciliano F, Izzo P. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19: 1719-1723
- 3 Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6870-6875
- 4 Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460
- 5 Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740
- 6 Bhattacharyya N, Chen HC, Grundfest-Broniatowski S, Banerjee S. Alteration of hMSH2 and DNA polymerase beta genes in breast carcinomas and fibroadenomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 429-435
- 7 Esteller M, Catusas L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1767-1772
- 8 Jin TX, Furihata M, Yamasaki I, Kamada M, Liang SB, Ohtsuki Y, Shuin T. Human mismatch repair gene (hMSH2) product expression in relation to recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1999; 85: 478-484
- 9 Nicolaides NC, Carter KC, Shell BK, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW. Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics* 1995; 30: 195-206
- 10 Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Kim HK, Christen RD, Howell SB. Expression of the DNA mismatch repair proteins hMLH1 and hPMS2 in normal human tissues. *Br J Cancer* 1997; 76: 890-893
- 11 Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JY. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription

■应用要点

hPMS2 mRNA的检测有望对胃癌的早期发现, 早期治疗提供依据.

■同行评价

文章立题尚可, 实验设计虽然简单, 但是科学合理, 方法先进, 结果分析有据, 讨论充分, 书写规范, 具有较好的临床参考价值.

- factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2420-2425
- 12 Truninger K, Menigatti M, Luz J, Russell A, Haider R, Gebbers JO, Bannwart F, Yurtsever H, Neuweiler J, Riehle HM, Cattaruzza MS, Heinemann K, Schär P, Jiricny J, Marra G. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128: 1160-1171
- 13 Nicolaides NC, Littman SJ, Modrich P, Kinzler KW, Vogelstein B. A naturally occurring hPMS2 mutation can confer a dominant negative mutator phenotype. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1635-1641
- 14 Balogh GA, Heulings RC, Russo J. The mismatch repair gene hPMS2 is mutated in primary breast cancer. *Int J Mol Med* 2006; 18: 853-857
- 15 张媛, 王泽华. 肿瘤错配修复基因PMS₂在子宫颈癌细胞中的表达及意义. *华中科技大学学报(医学版)* 2008; 37: 123-124
- 16 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095
- 17 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164
- 18 Yao Y, Tao H, Kim JJ, Burkhead B, Carloni E, Gasbarrini A, Sepulveda AR. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004; 84: 915-922
- 19 Sipponen P. Atrophic gastritis as a premalignant condition. *Ann Med* 1989; 21: 287-290
- 20 Correa P. Chronic gastritis as a cancer precursor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984; 104: 131-136
- 21 You WC. [Gastric mucosal lesions and their transition rates in high risk population of gastric cancer] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1991; 13: 100-102

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 2008-11-08)

Pim-3异常表达在胃癌中的意义

胡志方, 黄缘, 钟琼, 简捷

胡志方, 黄缘, 钟琼, 简捷, 南昌大学第二附属医院消化内科
江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

钟琼, 江西省肿瘤医院 江西省南昌市 330006

胡志方, 2006级南昌大学第二附属医院在读硕士, 主要从事消化系肿瘤基因治疗的基础和临床研究。

作者贡献分布: 胡志方与黄缘对此文所做贡献均等。此课题由胡志方, 黄缘, 钟琼及简捷设计; 研究过程由胡志方与黄缘操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由黄缘提供; 数据分析由胡志方, 钟琼及简捷完成; 本论文写作由胡志方完成。

通讯作者: 黄缘, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室。

huang9815@yahoo.com

电话: 0791-6292163 传真: 0791-6292163

收稿日期: 2008-07-21 修回日期: 2008-09-25

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-08

Significance of aberrant Pim-3 expression in gastric carcinoma

Zhi-Fang Hu, Yuan Huang, Qiong Zhong, Jie Jian

Zhi-Fang Hu, Yuan Huang, Jie Jian, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Qiong Zhong, Jiangxi Province Tumor Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huang9815@yahoo.com

Received: 2008-07-21 Revised: 2008-09-25

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the role of Pim-3 aberrant expression in the development of gastric carcinoma.

METHODS: Semi-quantitative RT-PCR method and immunohistochemistry method were used to detect the expression of Pim-3 in 40 gastric carcinoma tissues and 20 adjacent normal tissues. We also compared relationship between Pim-3 expression and the clinicopathological parameters of gastric carcinoma.

RESULTS: Pim-3 mRNA expression was enhanced in gastric carcinoma compared with non-cancerous mucosa (0.287 ± 0.058 vs 0.053 ± 0.055 , $P < 0.001$). Protein expression of Pim-3 was

significantly higher in moderately differentiated adenocarcinoma tissue than in poorly differentiated adenocarcinoma tissue. Pim-3 expression was closely correlated with lymphatic metastasis and venous invasion ($r = 0.385, 0.412, P = 0.014, 0.008$).

CONCLUSION: Pim-3 can be seen as the biological marker for early phase of gastric carcinoma and a prognostic factor to predict the prognosis of cancer.

Key Words: Pim-3; Gastric carcinoma; Aberrant expression; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry method

Hu ZF, Huang Y, Zhong Q, Jian J. Significance of aberrant Pim-3 expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3515-3518

摘要

目的: 探讨Pim-3的异常表达在胃癌发展过程中的作用。

方法: 使用半定量RT-PCR法和免疫组化法检测40例胃癌组织及20例癌旁正常组织标本Pim-3的表达, 并比较Pim-3的表达与胃癌临床病理参数的关系。

结果: 与正常胃黏膜相比, Pim-3 mRNA的表达量在胃癌组织中更高(0.287 ± 0.058 vs 0.053 ± 0.055 , $P < 0.001$)。中分化腺癌中Pim-3蛋白的表达高于低分化腺癌组织中的表达, 两者比较差异显著(50% vs 20% , $P < 0.05$)。Pim-3的表达与淋巴转移、静脉转移密切相关($r = 0.385, 0.412, P = 0.014, 0.008$)。

结论: Pim-3可作为胃癌早期的生物标志物, 并可预示肿瘤的预后。

关键词: Pim-3; 胃癌; 异常表达; 逆转录酶链式反应; 免疫组化法

胡志方, 黄缘, 钟琼, 简捷. Pim-3异常表达在胃癌中的意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3515-3518
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3515.asp>

■背景资料

Pim-3作为一种丝/苏氨酸蛋白激酶Pim家族中的成员, 能磷酸化众多特异性底物, 在细胞增殖、分化、凋亡中发挥着重要的调控作用。科研人员在肝癌、胰腺癌、结肠癌中均发现Pim-3高表达。因此, Pim-3可能成为抗肿瘤治疗的一个新靶点。探讨Pim-3在胃癌中的表达情况将有助于从一个新的方面揭示胃癌的发生机制, 为将来能早期诊断和治疗胃癌提供理论依据。

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

■研发前沿

科研人员发现Pim-3与消化系统肿瘤的发生有密切联系,在不同肿瘤中Pim-3的作用机制存在差异,研究Pim-3对胃癌发生的作用途径正被广泛关注。

0 引言

胃癌的发生是胃黏膜细胞增生和凋亡失衡的结果,他是一个循序渐进的过程。癌变过程是长期的细胞生物学行为由正常演变为异常的过程,涉及多种肿瘤相关基因的参与。丝/苏氨酸激酶Pim家族有3个成员^[1]。Pim-1、Pim-2和Pim-3,能磷酸化众多特异性底物,分别在细胞增殖、分化、凋亡中发挥着重要的调控作用^[2]。目前,国内外研究者在肝癌^[3]、胰腺癌^[4]、结肠癌^[5]领域对Pim-3基因的研究已有较大的进展,在胃癌的研究中对该基因的研究报道尚不多。本研究拟应用半定量RT-PCR及免疫组化法检测Pim-3基因在人胃癌组织中的基因及蛋白水平的表达,探讨该基因异常表达在胃癌发生发展中的作用及机制,为胃癌的诊断及治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 40例胃癌组织来自南昌大学第二附属医院普通外科手术标本,其中20例中分化腺癌,20例低分化腺癌。患者手术前均未接受过化疗。20例癌旁正常组织,来源于患者肿瘤边缘2 cm以外区域,经切片病理染色分析证实无癌变细胞。时间均为2007-05/2008-05。新鲜组织离体后分两部分,一部分立即用液氮保存,待提取总RNA,一部分用甲醛固定,石蜡包埋,待免疫组化染色。患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、转移情况等资料来源于本院病案室。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR法: 应用TRIzol试剂,按照说明书提取胃癌组织、癌旁正常胃组织总RNA。逆转录反应合成cDNA。取4 μL产物进行PCR扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s; 57℃ 45 s; 72℃ 45 s; 72℃ 7 min, 35个循环。Pim-3上游引物序列: 5'-TCTCCAAGTTCGGCTCCCT-3'; 下游引物序列: 5'-TCACCCGCTCCTTCACCAC-3'。本引物扩增产物为232 bp, 内参β-actin上游引物序列: 5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'; 下游引物序列5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3', 内参扩增产物为740 bp, 反应结束后取产物于10 g/L琼脂糖凝胶中电泳。应用天能Gis凝胶成像系统分析, PCR产物量以吸光度/面积表示, 以Pim-3产物量/β-actin产物量的比值作为Pim-3 mRNA表达量的最终结果。

1.2.2 免疫组化法: 将经过石蜡包埋的标本行4 μm厚切片, 每例连续作3张切片, 1张常规HE染色, 另2张用于免疫组织化学染色(采用SP免疫组

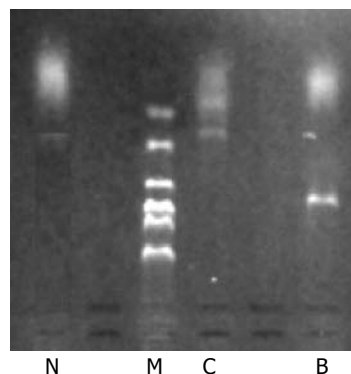


图1 Pim-3基因mRNA的半定量RT-PCR检测结果。B: β-actin条带; C: 胃癌组织; M: Marker2000; N: 癌旁正常组织。

表1 各种胃癌组织Pim-3蛋白表达水平 (n = 20)

分组	Pim-3蛋白的表达				阳性率(%)
	-	+	++	+++	
中分化胃癌	10	2	4	4	50 ^a
低分化胃癌	16	2	2	0	20 ^c
癌旁正常组织	20	0	0	0	0

^aP<0.05 vs 低分化胃癌; ^cP<0.05 vs 癌旁正常组织。

织化学法), 用PBS液代替一抗作为阴性对照。实验流程按试剂盒说明步骤进行, 切片经60℃恒温箱烤30 min, 二甲苯脱蜡水洗, 蒸馏水泡5 min, 阻断内源性过氧化物酶, 一抗, 二抗, 酶标SP, DAB显色。苏木素复染, 透明封固, 镜检。主要试剂为羊抗人Pim-3多克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 浓度为1:200。Pim-3阳性定位于细胞质, 细胞质染成棕黄色为阳性细胞, 每张切片选取5个具有代表性的高倍视野。计数500个细胞中的阳性细胞数。依据《全国免疫组织化学技术及诊断标准化专题研讨会》标准, 按阳性细胞所占比例进行分级: <25%为(-), 25%-50%为(+), 51%-75%为(++), >75%为(+++)。

统计学处理 用SPSS12.0软件行相关数据分析, 分别用t检验和Spearman相关分析方法分析相应组数据, 当P<0.05时有统计学意义。

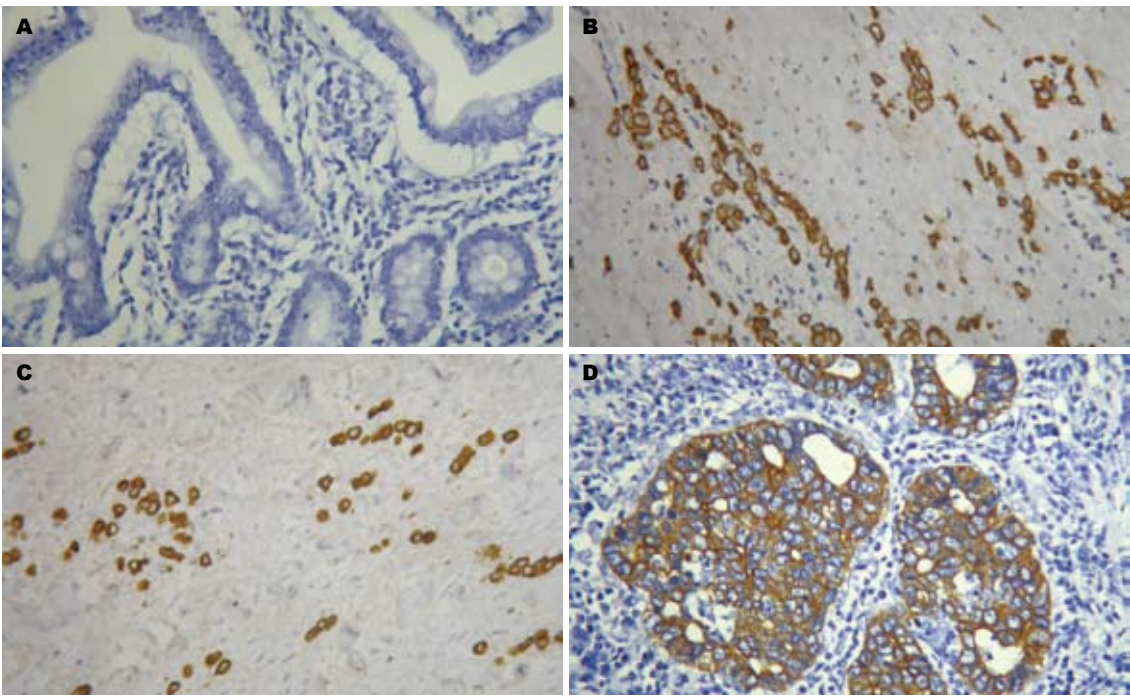
2 结果

2.1 Pim-3基因mRNA的半定量RT-PCR检测结果 胃癌组织mRNA的表达量是0.287±0.058, 癌旁正常组织的是0.053±0.055, 两组经t检验分析P<0.001, 有统计学意义(图1)。

2.2 Pim-3蛋白表达的免疫组化结果 中分化胃癌的蛋白阳性率是50%, 低分化胃癌的蛋白阳性率是20%, 癌旁正常组织的蛋白阳性率是0。中分化胃癌与低分化胃癌Spearman相关分析比较, 有统计学意义(P = 0.024), 低分化胃癌与癌旁正常组织相

■相关报道

研究已发现Pim-3在正常肝、胰、结肠组织中不表达, 在癌组织中高表达, 尤其在结肠腺瘤中的表达最高。



■创新盘点
本研究分别通过半定量RT-PCR和免疫组化方法发现Pim-3在正常胃组织中不表达,在分化程度越高的胃腺癌组织中表达更高,并发现Pim-3的表达与淋巴转移、静脉转移密切相关。

图 2 Pim-3蛋白表达(免疫组化×200). A: 癌旁组织; B: 低分化腺癌; C: 低分化腺癌; D: 中分化腺癌.

表 2 Pim-3蛋白的表达与临床病理资料的Spearman相关分析							
临床病理特点	n	Pim-3蛋白的表达				阳性率(%)	
		-	+	++	+++		
性别							0.237
男	25	14	3	5	3	40.0	0.141
女	15	12	1	1	1	26.7	
年龄							0.159
<60	18	13	2	2	1	27.8	0.327
≥60	22	13	2	4	3	40.9	
肿瘤大小(cm)							0.036
<4	19	12	1	5	1	36.8	0.827
≥4	21	14	3	1	3	33.3	
浸润深度							0.166
黏膜下层	10	5	1	2	2	50.0	0.327
固有肌层	12	8	2	2	0	33.3	
浆膜层	18	13	1	2	2	27.8	0.385
淋巴转移							
-	26	20	3	2	1	23.1	0.014
+	14	8	1	4	3	57.1	
静脉转移							0.412
-	30	23	2	3	2	23.3	0.008
+	10	3	2	3	2	70.0	
淋巴结转移病灶							0.046
-	22	15	2	2	3	31.8	0.777
+	18	11	2	4	1	38.9	

关分析比较,有统计学意义($P=0.036$,表1,图2).

2.3 Pim-3蛋白的表达与临床病理资料的关系

Pim-3蛋白的表达与肿瘤大小、浸润黏膜深度、淋巴结转移灶无明显相关性,与淋巴转移($r=0.385$, $P=0.014$)、静脉转移($r=0.412$, $P=0.008$)明显相关(表2).

■同行评价

本研究选题新颖,研究方法较先进,统计正确,结论较客观,学术价值较好。

3 讨论

肿瘤的发生发展是多基因参与的复杂过程,包括癌基因的异常激活和抑癌基因失活,从1997年人们发现Pim基因来,对该基因的研究逐渐深入。研究人员已发现Pim激酶家族能使促凋亡分子Bad发生磷酸化而失活^[6],同时使抗凋亡家族Bcl-X_L、Bcl-2的表达增加,从而导致肿瘤细胞的失控生长,且Pim蛋白对某些正常或肿瘤细胞的增殖或细胞周期都具有调节功能,能增强细胞的抗凋亡作用^[7]。Pim-1最初是在鼠的T细胞淋巴瘤中被鉴定出来的一种癌基因,当MMLV前病毒插入PIM-1基因的3'UTR区(3'-untranslated regions)可使Pim-1 mRNA稳定性增加,而上调Pim-1蛋白的表达,最终导致T细胞淋巴瘤的产生。Pim-3最初由Feldman *et al*以大鼠细胞系PC12去极化诱导的基因而被首先报道。他在哺乳动物细胞中与Pim-1的序列具有72%的同源性,在功能上也与前二者相似。Fujii *et al*^[3]发现Pim-3 mRNA在人的心脏、骨骼肌、大脑、脾脏、肾脏、胎盘、肺和外周血白细胞中存在,在心肌和骨骼肌中呈高表达;相反,在结肠、胸腺、肝脏和小肠的正常组织中不表达,还证实了Pim-3蛋白在人肝细胞癌的癌旁组织、一部分癌组织及再生的胆管细胞中表达,且在癌旁组织中表达较癌组织高。那么,Pim-3在另一内胚层来源器官胃中的表达情况如何呢?在本研究中,通过半定量RT-PCR方法检测Pim-3基因mRNA的表达,发现胃腺癌Pim-3基因mRNA的表达明显高于在正常胃黏膜中的表达($P<0.001$),Pim-3基因mRNA在正常胃黏膜中基本不表达,可能是在正常胃黏膜细胞中Pim-3 mRNA不稳定,而在胃癌变组织中Pim-3 mRNA稳定性增加,使促凋亡分子Bad发生磷酸化而失活,从而导致肿瘤细胞的失控生长,因此,我们认为Pim-3是种理想的胃癌的生物标志物。另外,我们又通过免疫组化的方法检测Pim-3蛋白的表达,发现Pim-3蛋白在分化程度高的胃癌组织中的表达明显高于在分化程度低的胃癌组织中的表达($P<0.05$)。而Popivanova *et al*^[5]发现分化越高的结肠腺癌组织里Pim-3蛋白表达阳性率越高,这和本研究结果类似。可能原癌基因激活后,蛋白表达增多,使促凋亡分子Bad发生磷酸化,抑制了细胞凋亡,导致组织细胞异常增生,即在肿瘤早期阶段起作用,在肿瘤后期基因的稳定性降低,使蛋白的

表达下降。我们认为Pim-3可能是细胞对生长因子发生反应的早期基因,其高表达可能是胃癌发生过程中的一个早期事件。从Pim-3蛋白和一些病理资料的相关性分析结果来看,Pim-3蛋白的表达与肿瘤大小、浸润黏膜深度、淋巴结转移灶无明显相关性,与淋巴转移($P=0.014$)、静脉转移($P=0.008$)明显相关,这和Zheng *et al*^[8]的研究结果相似,不同的是我们发现Pim-3蛋白的表达和性别($P=0.141$)无明显相关,我们知道如果肿瘤细胞发生淋巴转移或静脉转移则患者的预后不良的几率就会增高,因此,一定程度上Pim-3可被认为是种能预示肿瘤预后的预后因子。

总之,Pim-3在正常胃组织中不表达,在胃癌组织里的表达明显增高,其高表达可能是胃癌发生过程中的一个早期事件,可被认为是种反映胃癌早期阶段的生物标志物,并且可被认为是种能预示肿瘤预后的预后因子。

4 参考文献

- 1 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298: 1912-1934
- 2 Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J Exp Med* 2005; 201: 259-266
- 3 Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 114: 209-218
- 4 Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 6741-6747
- 5 Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N. Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 321-328
- 6 Yan B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ, Lilly M. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 45358-45367
- 7 Bachmann M, Möröy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 726-730
- 8 Zheng HC, Tsuneyama K, Takahashi H, Miwa S, Sugiyama T, Popivanova BK, Fujii C, Nomoto K, Mukaida N, Takano Y. Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 481-488

编辑 李军亮 电编 何基才

恩替卡韦治疗非霍奇金淋巴瘤相关性HBV再激活34例

冯洪玲, 唐克诚, 李 谦, 袁桂玉, 杨积明

冯洪玲, 唐克诚, 李谦, 袁桂玉, 杨积明, 天津市传染病医院
天津市肝病研究所 天津市 300192

冯洪玲, 硕士, 住院医师, 主要从事肝脏疾病治疗及研究.

作者贡献分布: 冯洪玲与唐克诚对此文所作贡献均等; 此文临床资料由唐克诚提供; 研究设计由袁桂玉与杨积明完成; 本论文写作由冯洪玲与李谦完成.

通讯作者: 冯洪玲, 300192, 天津市, 天津市传染病医院, 天津市肝病研究所重症肝炎科. fenghongling1116@sohu.com
电话: 022-27468210

收稿日期: 2008-09-15 修回日期: 2008-10-16

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-08

Efficacy of entecavir in treating non-Hodgkin's lymphoma-associated-related HBV reactivation: an analysis of 34 cases

Hong-Ling Feng, Ke-Cheng Tang, Qian Li,
Gui-Yu Yuan, Ji-Ming Yang

Hong-Ling Feng, Ke-Cheng Tang, Qian Li, Gui-Yu Yuan,
Ji-Ming Yang, Tianjin Infectious Disease Specialty Hospital,
Tianjin Hepatopathy Research Institute, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Hong-Ling Feng, Tianjin Infectious
Disease Specialty Hospital, Tianjin Hepatopathy Research
Institute, Tianjin 300192, China. fenghongling1116@sohu.com
Received: 2008-09-15 Revised: 2008-10-16
Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: The evaluate the efficacy of entecavir (ETV) in treating non-Hodgkin's lymphoma-associated (NHL) chronic hepatitis B reactivation.

METHODS: Clinical data of NHL patients with HBV reactivation were analyzed retrospectively. Thirty-four patients were assigned to 2 groups, of which, group A ($n = 18$) was treated with ETV 1.0 mg/d and group B ($n = 16$) was treated with ETV 0.5 mg/d. All patients were followed-up for 24 wk. Disease evolution, incidence of interrupting chemotherapy, mortality, liver function, adverse events and clinical outcome were closely monitored. Quantitative analysis of serum HBV-DNA using real-time PCR was performed at week 2, 4, 8, 12, 24 after treatment respectively. Serum HBV marker was investigated at week 12 after anti-virus treatment.

RESULTS: After 24 weeks' therapy, the inci-

dences of chemotherapy on schedule and interrupting chemotherapy between group A and group B showed statistically significant difference ($\chi^2 = 7.438, 4.636; P = 0.006, 0.031$); while the hepatitis-related mortality rate and fatality rate between the two groups showed no significant difference. At week 2, the mean HBV DNA level decreased in both groups, lower in group A ($t = 15.724, P = 0.000$). At week 4, 8, 12, HBV DNA level continuously decreased, especially in group A. Serum ALT levels were markedly reduced in both groups, especially in group A. Each group had one case of adverse events.

CONCLUSION: ETV at a dose of 1.0 mg shows a good prospect in antiviral therapy for NHL-associated hepatitis B virus reactivation.

Key Words: Entecavir; Hepatitis B virus; Hepatitis B virus reactivation; Therapy

Feng HL, Tang KC, Li Q, Yuan GY, Yang JM. Efficacy of entecavir in treating non-Hodgkin's lymphoma-associated-related HBV reactivation: an analysis of 34 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3519-3522

摘要

目的: 探讨恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)相关性HBV再激活的疗效.

方法: 将34例NHL相关性HBV再激活患者分为2组, ETV 1.0 mg/d组(A组, $n = 18$), ETV 0.5 mg/d组(B组, $n = 16$). 观察患者病情变化、化疗中断、病死率及临床转归. 于治疗后2、4、8、12、24 wk, 采用实时PCR定量监测血清HBV DNA水平, 采用微粒酶免疫法, 于抗病毒治疗后12 wk检测血清HBV标志物. 并检测肝功能变化, 观察抗病毒治疗中不良事件发生情况.

结果: 经ETV治疗后24 wk, A组与B组患者按期继续化疗发生率、发生化疗中断差异均有统计学意义($\chi^2 = 7.438, 4.636, P = 0.006, 0.031$); 两组发生肝炎相关病死率、死亡率差别无统计学意义. 治疗2 wk患者血清

■背景资料

随着肿瘤发病率的升高以及细胞毒化学药物的广泛应用, 越来越多携带HBV的肿瘤患者会接受化疗. 据相关文献报道, 携带HBV的肿瘤患者尤其是NHL患者化疗后会引起HBV再激活. 此类免疫受损患者的抗病毒治疗已成为研究热点, 但尚无统一共识.

■同行评议者

唐霓, 副研究员, 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

■研发前沿

亚太地区、美国及我国的《慢性乙型肝炎防治指南》均推荐,对于接受肿瘤化疗、免疫抑制剂治疗的慢性乙型肝炎患者,在启动治疗同时应用LVD预防性抗病毒治疗。然而,并非所有接受化疗的患者都发生HBV再激活,以及LVD治疗存在的潜在缺点如:耐药变异、撤退性肝炎等,并且随着HBV再激活机制的进一步阐明,新一代核苷类似物药物ETV将在此治疗领域具有美好的前景。

■相关报道

过去曾试图用干扰素预防和治疗HBV的再激活,但直接抗病毒作用不够强大,且其不良反应明显,因而未得到广泛应用。Yeo *et al*报道在HBV再激活期间,应用LVD抗病毒治疗,但仍有20%的HBV相关性病死率,这归咎于抗病毒治疗的滞后性。另外,最新的个案报道此类患者应用ETV取得了较佳疗效。

HBV DNA水平较前下降, A组效果更佳($t = 15.724, P = 0.000$)。治疗后4、8、12 wk患者血清HBV DNA水平继续下降。两组患者血清ALT水平均下降, A组效果更佳。两组中各有1例出现ETV相关不良事件。

结论: 剂量为1.0 mg/d的ETV对于NHL相关性HBV再激活的抗病毒治疗具有良好的前景。

关键词: 恩替卡韦; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒再激活; 治疗

冯洪玲, 唐克诚, 李谦, 袁桂玉, 杨积明. 恩替卡韦治疗非霍奇金淋巴瘤相关性HBV再激活34例. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3519-3522

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3519.asp>

0 引言

我国是乙型病毒性肝炎高发区, 慢性HBV感染率高达10%, 而NHL患者HBV感染率更高达3%-30%。恶性肿瘤尤其是NHL伴慢性HBV感染者化疗后再激活的发生率明显增加, 使患者被迫延期或者中止化疗, 甚至引起肝炎相关死亡^[1]。然而, HBV再激活^[2]并无统一的诊断标准, 目前以HBV DNA水平作为再激活的标志, 通常被定义为在化疗和(或)免疫抑制治疗过程中, 或紧随其后发生的HBV DNA升高10倍以上或其绝对值 $>10^{12}$ copies/L。目前, 此类免疫受损患者的抗病毒治疗已成为研究热点, 但尚无统一共识。ETV为高度特异性抑制HBV复制的新一代核苷酸类似物, 本文系回顾性研究, 讨论了ETV在HBV再激活中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2007-11在本院就诊的慢性HBV携带的NHL患者, 共34例, 其中男性23例, 女性11例。年龄28-61(平均年龄 44.35 ± 7.99)岁。所有患者均为初次化疗, 且均除外肝脏肿瘤浸润及合并其他肝炎病毒感染。NHL诊断符合2008年NCCN修订的《NHL临床实践指南》; 慢性HBV诊断符合2005-12制订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[3]。肝功能指标参照WHO急性毒性评价标准, 其中I度2例, II度5例, III度15例, IV度12例。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 所有患者均行CHOP化疗方案(环磷酰胺+阿霉素/米托蒽醌+长春新碱+泼尼松); 出现肝功能异常后, 采用双环醇、谷胱甘肽、胸腺肽、促肝细胞生长素及人血白蛋白等保肝支

持治疗; 检测到HBV再激活时, 应用ETV抗病毒治疗。ETV由美国百时美施贵宝公司生产, 剂型每片0.5 mg。

1.2.2 分组: 根据抗病毒药物ETV的剂量不同, 将患者分为两组: 分别为ETV1.0 mg/d组(A组), 共18例, 其中男11例, 女7例, 平均年龄 44.94 ± 8.15 岁; ETV 0.5 mg/d组(B组), 共16例, 其中男12例, 女4例, 平均年龄 44.39 ± 8.28 岁。两组在年龄、性别、病情程度等方面差异无显著性。

1.2.3 指标检测: 观察患者病情变化、按期继续化疗、发生化疗中断、病死率等情况。肝功能检测使用美国贝克曼(Beckman-CX9)全自动生化分析仪型号的检测仪器, 贝克曼公司试剂, 批号M506419。于抗病毒治疗前、治疗后2、4、8、12、24 wk空腹采血送检。采用实时PCR定量(Cobas Taqman HBVTM)检测血清HBV DNA, 使用Systems公司试剂, 最低检测值为 10^6 copies/L。于治疗前、治疗后2、4、8、12、24 wk时检测血清HBV DNA水平; 并观察HBV DNA转阴所需时间。采用微粒酶免疫法, 于抗病毒治疗后12 wk检测血清HBV标志物。观察应用ETV治疗期间, 不良事件发生情况。

统计学处理 死亡病例视为自然脱落, 资料不列入统计分析。所得数据采用SPSS11.5统计分析软件处理。计数资料采用 χ^2 检验、秩和检验。计量资料采 t 检验。

2 结果

2.1 临床转归 经ETV治疗后24 wk, 患者按期继续化疗发生率为A组77.78%、B组31.25%, 差别有统计学意义; 发生化疗中断, A组11.11%、B组43.75%, 差异有统计学意义; 两组发生肝炎相关病死率、死亡率差别无统计学意义(表1)。

2.2 病毒学应答 治疗2 wk患者血清HBV DNA水平较前下降, A组效果更佳(表2)。治疗后4、8、12 wk患者血清HBV DNA水平继续下降。治疗后4 wk, 两组HBV DNA转阴率, A组33.33%(6/18), 均秩为25.81, B组无转阴病例, 均秩为8.83, $Z = 4.545, P = 0.000$; 治疗后8 wk, A组44.44%(8/18), 均秩为21.94, B组6.67%(1/15), 均秩为9.50, $Z = 3.804, P = 0.000$; 治疗后12 wk, A组52.94%(9/17), 均秩为21.24, B组15.38%(2/13), 均秩为8.00, $Z = 4.227, P = 0.000$, 差别有统计学意义。治疗12 wk后, 共检测到11例患者血清HBV DNA转阴: 其中A组9例, 所需平均时间 5.21 ± 0.91 wk; B组2例转阴病例分别出现在治疗后

表 1 治疗后24 wk两组患者临床转归情况 $n(\%)$

分组	n	继续按期 化疗	化疗 中断	肝炎相关 病死率	死亡率
A组	18	14(77.78)	2(11.11)	1(5.60)	2(11.11)
B组	16	5(31.25)	7(43.75)	2(12.50)	4(25.00)
χ^2		7.438	4.636	0.508	1.124
P		0.006	0.031	0.476	0.289

表 2 治疗2 wk时两组患者HBV DNA(log10 copies/mL)变化

分组	n	HBV DNA		
		治疗前	治疗后2 wk	治疗后下降值
A组	18	7.05 ± 1.20	3.94 ± 0.54	3.40 ± 1.16
B组	16	6.88 ± 1.30	5.28 ± 0.51	1.86 ± 0.68
t		1.033	15.724	6.001
P		0.303	0.000	0.000

■创新盘点

本文探讨了ETV治疗NHL相关性HBV再激活的疗效,并依据ETV抗病毒治疗存在的明确量效关系,按剂量分为ETV 1.0 mg/d组及ETV 0.5 mg/d组,进行回顾性分析,这在国内尚无报道。

表 3 治疗后两组患者血清ALT变化

	ALT (U/L)			
	治疗2 wk	治疗4 wk	治疗8 wk	治疗12 wk
A组	197.83 ± 56.64	149.02 ± 39.40	43.01 ± 18.86	33.25 ± 5.66
B组	279.29 ± 63.78	184.03 ± 37.71	58.76 ± 28.05	51.20 ± 7.36
t	4.544	3.063	4.199	4.793
P	0.000	0.033	0.000	0.000

8、12 wk. 另外,共检测到2例HBeAg阴转,均出现在A组. 治疗后24 wk,继续监测未发现HBV DNA反弹.

2.3 生化学应答 治疗2、4、8、12 wk时患者血清ALT水平均较前下降,A组效果更佳(表3). 治疗后12 wk,两组血清ALT转阴率,A组47.06%(8/17),B组38.46%(5/13); 治疗后24 wk, A组56.25%(9/16),B组41.67%(5/12),A组高于B组,但无统计学意义.

2.4 安全性评价 两组中各有1例出现ETV相关不良事件,分别表现为乏力及咽部不适,且均缓解.

3 讨论

HBV再激活是指慢性HBV感染合并肿瘤时接受细胞毒性或免疫抑制剂治疗期间出现HBV复制,可导致细胞连续性坏死或肝功能进行性下降,最终产生程度不一的损坏,轻者表现为肝炎症状,重者出现暴发性肝功能衰竭. HBV再激活可能由病毒和宿主两方面因素决定^[4]: 一方面传统的细胞毒性药物如皮质类固醇和蒽环类药物与病毒再激活最为关联: 这可能因为HBV DNA中含有糖皮质激素的应答元件,能促进HBV再感染. 同时,糖皮质激素可以溶解淋巴细胞,也降低了B淋巴细胞和T淋巴细胞的功能,而蒽环类药物如阿霉素以计量方式在体外可以刺激HepG2.215细胞分泌HBV DNA; 另一方面,由于患者应用免疫抑制剂而导致免疫受损,HBV再激活的机制可能包括通过增加感染HBV病毒的肝细胞的数量来增强HBV复制. 在停用免疫抑制剂治疗、恢复了免疫活性后,有活性的免疫

细胞通过攻击靶肝细胞,而产生迅速的免疫介导的感染细胞的大量破坏,而产生一系列的临床表现; 此外,在纤维化胆汁淤积性肝炎中发现HBV再激活,可以直接诱发病毒复制,从而迅速引起肝细胞消散^[5-6]. 由此,临床上在发现HBV再激活时,急需一种强效的、可以在短时间内抑制病毒复制和兼具免疫调节功能的抗病毒药物,来拮抗由于HBV复制而引起的直接或间接的肝细胞损伤.

ETV是新一代鸟嘌呤核苷酸类似物,大量临床资料表明其具有很强的抗病毒活性,优于拉米夫定(lamivudine, LVD)和阿德福韦酯(adeфовир, ADV)^[7-10]. 本研究显示,在口服ETV最初2 wk,血清HBV DNA水平即迅速下降,超过2个log10; 且在治疗4、8、12wk的持续检测中仍在下降,治疗12 wk时HBV DNA转阴率达36.67%; 而在治疗后24 wk的监测中,未发现病毒反弹病例. 提示对于此类免疫受损后HBV再激活的特殊人群,ETV也显示出了抗病毒能力强,起效快,并能长期有效的抑制病毒复制及病毒反弹等优越性. 考虑一方面与ETV特殊的抗病毒机制有关: 他可以作用于HBV DNA复制的起始、逆转录和DNA正链合成等阶段; 另一方面ETV亦可对肝内cccDNA有一定的抑制作用^[11]且在停药后仍起作用,而肝内cccDNA具有HBV再激活的临床重要性^[12]; 另外,可能的机制是,免疫受损患者在停用免疫抑制剂后,恢复活性的免疫细胞对HBV再激活的高免疫应答状态,协同清除肝细胞内cccDNA,及ETV可能兼具的免疫调节作

■同行评价

本文拟对恩替卡韦治疗非霍奇金淋巴瘤相关性HBV再激活的疗效进行观察,立题较新颖,临床实验设计总体合理可行,实验数据的分析和处理恰当,学术价值较好。

用^[13-14],共同抑制病毒复制。此外,在本研究结果中值得注意的是:治疗2 wk后,ETV 1.0 mg/d组HBV DNA水平即明显降低,平均下降达3.40 log10,其HBV DNA转阴率、ALT复常率均高于0.5 mg/d组,提示ETV在降低HBV病毒载量及恢复血清ALT方面存在明确的量效关系而抗病毒相关的不良事件发生率、病毒反弹等与剂量无相关性,这与Yao *et al*^[15]报道的结果相一致。并且,继续监测至治疗后24 wk,研究结果显示在提高患者继续按期化疗、降低化疗中断率方面,ETV 1.0 mg/d组效果优于0.5 mg/d组。以上均提示口服ETV 1.0 mg/d,对于免疫受损的HBV抗病毒治疗,可能是较佳的选择。

本研究亦对患者因HBV再激活致化疗中断、发生肝炎相关性死亡及病死率等进行观察。结果显示发生HBV相关性病死率低于Yeo *et al*^[16]报道应用LVD的数据(8.82% vs 20%),治疗后患者继续按期化疗的比率高于何义富 *et al*^[17]的报道(55.88% vs 9.5%),导致化疗中断的比率亦低于报道(26.47% vs 37.1%)。而其他相关报道由于病例选择和免疫抑制剂、化疗方案等不同而致数据报道等不同,及本研究受观察时间短、样本例数少等局限性,尚难以评价ETV的长期疗效。

临床上关于此类特殊人群ETV抗病毒的长期疗效、病毒反弹、病毒耐药,尤其是在实践中与抗肿瘤治疗并用是否加剧治疗毒性等,均需要更长期的随访来判定。

4 参考文献

- 陈钰, 谢青, 沈志祥. 恶性淋巴瘤治疗相关性乙型肝炎病毒再激活. 内科理论与实践 2007; 2: 8-12
- 贾继东. 免疫抑制治疗与乙型肝炎病毒再激活. 中华内科杂志 2006; 45: 443-444
- 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 翁书强, 王满. 拉米夫定对免疫受损诱导HBsAg携带者HBV再激活的预防作用. 中国实用医药杂志 2007; 2: 32-34
- Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology* 1992; 16: 1338-1342
- Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6909-6913
- Honkoop P, De Man RA. Entecavir: a potent new antiviral drug for hepatitis B. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 683-688
- Shaw T, Locarnini S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 853-871
- Yao GB, Zhu M, Wang YM, Xu DZ, Tan DM, Chen CW, Hou JL. [A double-blind, double-dummy, randomized, controlled study of entecavir versus lamivudine for treatment of chronic hepatitis B] *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2006; 45: 891-895
- 侯金林. 恩替卡韦: 慢性乙型肝炎治疗的新选择. 肝脏 2005; 10: 164-166
- 罗生强, 张玲霞. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的最新进展. 中国新药杂志 2006; 15: 1023-1028
- Hui CK, Bowden S, Jackson K, Au WY, Fong DY, Lie AK, Chim CS, Liang R, Lau GK. Clinical significance of intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients who received cytotoxic chemotherapy. *Blood* 2005; 105: 2616-2617
- 卢高峰, 唐芙爱, 郑鹏远, 马军, 白经修. 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1292-1296
- 张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 姜惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明. 拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1693-1698
- Yao GB, Zhang DF, Wang BE, Xu DZ, Zhou XQ, Lei BJ. [A study of the dosage and efficacy of entecavir for treating hepatitis B virus] *Zhonghua Ganzangbing Za Zhi* 2005; 13: 484-487
- Yeo W, Steinberg JL, Tam JS, Chan PK, Leung NW, Lam KC, Mok TS, Johnson PJ. Lamivudine in the treatment of hepatitis B virus reactivation during cytotoxic chemotherapy. *J Med Virol* 1999; 59: 263-269
- 何义富, 王风华, 李宇红, 林旭滨, 姜文奇. 拉米夫定在预防乙型肝炎携带的淋巴瘤患者化疗后肝炎发生中作用. 临床肝胆病杂志 2006; 22: 445-447

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

肝型脂肪酸结合蛋白研究进展

刘鹏, 陆怀秀, 殷正丰

刘鹏, 殷正丰, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科
医院分子肿瘤实验室 上海市 200438
陆怀秀, 中国人民解放军海军总医院口腔科 北京市 100037
国家“973”计划资助项目, No. 2002CB513100
作者贡献分布: 本文写作由刘鹏与陆怀秀完成; 殷正丰审核。
通讯作者: 殷正丰, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室。
yinzfk@yahoo.com.cn
电话: 021-25070859 传真: 021-25070859
收稿日期: 2008-09-08 修回日期: 2008-10-10
接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Advance in liver-type fatty acid binding protein

Peng Liu, Huai-Xiu Lu, Zheng-Feng Yin

Peng Liu, Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China
Huai-Xiu Lu, Department of Stomatology, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Supported by: the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program), No. 2002CB513100
Correspondence to: Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. yinzfk@yahoo.com.cn
Received: 2008-09-08 Revised: 2008-10-10
Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) is an important member of FABP family, and mainly expressed in liver, intestine and kidney. In the past, it was found that L-FABP was related to the absorption, translocation and redistribution of long-chain fatty acid in intestine and cell compartments. Recent studies indicated L-FABP is one pivotal signal molecular related to alcoholic or non-alcoholic fatty liver, kidney parenchymal injury, diabetes, ischemia injury and so on. In regard to its small molecular weight and membrane infiltration ability, L-FABP may be a high-sensitive marker of liver or kidney injury. Here, we review the research progress in the physical function, regulation mechanism and clinical application of L-FABP.

Key Words: Liver-type fatty acid binding protein;

Regulation mechanism; Tissue injury

Liu P, Lu HX, Yin ZF. Advance in liver-type fatty acid binding protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3523-3527

摘要

肝型脂肪酸结合蛋白(liver type fatty acid binding protein, L-FABP)是脂肪酸结合蛋白家族的重要成员, 主要在肝脏、小肠及肾脏表达。既往研究其主要与机体脂肪酸的吸收及转运、细胞内的长链脂肪酸的转运及细胞器内的再分布等密切相关。近年发现肝型脂肪酸结合蛋白具有信号转导分子的功能, 是机体能量代谢的重要环节, 进一步的研究证明与酒精性、非酒精性脂肪肝损伤、肾间质损伤、糖尿病、器官缺血损伤等密切相关。鉴于其小的分子量及良好的细胞膜通透性, 有望成为较好的肝、肾组织损伤的敏感指标。本文就近年肝型脂肪酸结合蛋白的生理功能、调控机制以及临床应用进展作一综述。

关键词: 肝型脂肪酸结合蛋白; 调控机制; 组织损伤

刘鹏, 陆怀秀, 殷正丰. 肝型脂肪酸结合蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3523-3527
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3523.asp>

0 引言

自1971年脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)被发现以来, 陆续分离并鉴定了9种不同类型的脂肪酸结合蛋白: 肝脏型(L-FABP)、小肠型(I-FABP)、心肌型(H-FABP)、脂肪细胞型(A-FABP)、表皮型(E-FABP)、回肠型(IL-FABP)、脑细胞型(B-FABP)、周围神经髓磷脂型(M-FABP)和睾丸型(T-FABP)^[1]。其中L-FABP得到最为广泛、深入的研究, 已被阐明的基本功能包括参与小肠脂肪酸的吸收及转运、细胞内长链脂肪酸的转运及细胞器内再分布利用、胆汁酸、胆固醇等物质的代谢等^[2-6]。随着转基因及基因敲除动物模型、蛋白结构解析技术和蛋白质组学技术等应用于L-FABP的研究, 人们对

■背景资料

L-FABP主要在肝细胞、小肠黏膜细胞和肾小管上皮细胞表达, 其基本功能包括参与机体脂肪酸的吸收、细胞内的长链脂肪酸转运及细胞器内的再分布等。近年研究证实L-FABP与脂肪肝、肾间质损害、糖尿病、器官缺血损伤等密切相关。因而L-FABP有望成为治疗脂肪肝、减轻器官氧化损伤等的药物作用靶点。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院
消化内科

■研发前沿

L-FABP的表达受基因和药物两种作用途径控制, 鉴于其转运和促进脂肪酸代谢以及抗氧化的生理功能, 开发有效的调控药物是当前研究的热点与难点. 有关其抗氧化的机制以及抗氧化损伤的临床意义有待进一步更深入的研究.

L-FABP的分子结构、分布定位、生物功能、表达调控以及与疾病的关系等都有了更为全面的了解.

1 L-FABP的分子特点

1.1 L-FABP的基因结构 不同种属L-FABP基因的定位不同, 如人源L-FABP位于2p11, 小鼠位于6C1, 褐鼠则在4q33. 其基因结构高度保守, 由4个外显子和3个内含子组成. 来源于鼠类肝细胞的L-FABP基因, 在其启动子上游132位与下游21位处存在正向和反向的顺式作用元件, 包含了肝细胞核因子-1(hepatocyte nuclear factor-1, HNF-1)与TATA、CCAAT盒子. 不同器官、组织L-FABP的表达受其基因上的抑制子与增强子调控, 如抑制和增强回肠和结肠表达L-FABP的序列分别位于启动子上游1600-4000位点与351-597位点, 而抑制肾脏表达L-FABP的序列位于启动子上游133-186位点^[7].

1.2 L-FABP的蛋白结构 不同类型FABP的氨基酸序列高度同源(20%-70%), 三级结构也高度相似^[8-9]. X射线衍射晶体和核磁共振分析结果表明, L-FABP由10个反向平行的 β 链和2个短的 α 螺旋组成一个 β 折叠桶. 后者稳定性较强, 空间构型不易受到化学修饰、大分子荧光物质和基因诱变的影响. 空间大小可容纳2-3个脂肪酸分子, 上方的两个 α 螺旋构成入口结构. L-FABP可以结合2个长链脂肪酸分子, 而其他FABP只能结合1个. 产生这种差异的原因主要是不同的FABP在其入口 α -II螺旋与 β 折叠C和D结合处具有不同的结构形式^[10].

2 L-FABP的分布定位

L-FABP是人体内表达最多的FABP, 主要分布于肝脏、小肠、肾脏与胰腺, 其中肝脏细胞和小肠刷状缘细胞中尤为丰富, 占细胞质蛋白总量3%-5%^[11]. 在禁食条件下, L-FABP多表达于细胞靠近肠道内腔面的边缘部分; 给予进食或高脂饮食条件下, L-FABP则在细胞质内平均分布, 这与其吸收和转运饱和与非饱和长链脂肪酸的功能密切相关^[12]. 由于过去只发现L-FABP具有结合和运输脂肪酸的简单功能, 因此认为L-FABP仅表达于细胞质. 后来Huang *et al*^[13]发现在肝细胞胞核中也表达F-FABP, 甚至有人将F-FABP基因转染至细胞核研究L-FABP参与细胞信号转导的作用.

3 L-FABP的生物功能

3.1 结合并转运脂肪酸 脂肪酸进入肠壁细胞、脂

类物质由血液进入肝细胞转化代谢、脂肪酸在细胞器之间的运输等均需要L-FABP参与. L-FABP能转运多于¹⁴C的饱和与非饱和脂肪酸, 并且有两个结合位点. 位于中心的是一个主要结合位点, 以羧基与精氨酸及两个丝氨酸残基相互结合; 另一个则靠近分子结构入口, 其羧基朝向入口并与分子周围的溶质相接触. 两个位点结合饱和脂肪酸具有相同的亲和力, 但中心位点结合非饱和脂肪酸的亲和力却是入口位点的10倍^[10]. 新近研究发现, 入口位点结合脂肪酸依赖于中心位点与脂肪酸的首先结合以及细胞微环境的变化^[14-15]. 此外, L-FABP还结合、运输血红素、维生素A及癌抗原等物质. 这体现了肝脏多样而复杂的生理功能.

3.2 参与细胞信号转导 尽管早已观察到L-FABP可在细胞核与细胞器内表达, 但对其生理功能并不清楚. 最近Hagan *et al*^[16]通过人工细胞膜实验观察到L-FABP可与磷脂微囊结合, 并实现细胞器之间的再分布, 进入细胞核后可引起细胞质内非脂化脂肪酸浓度升高. 以前认为脂肪酸可导致过氧化物酶增殖体激活受体 α (peroxisome proliferation activated receptor- α , PPAR- α)激动, 近来研究发现L-FABP也参与了该机制, 即L-FABP实际上起到了配体的作用^[17]. Schachtrup *et al*^[18]亦证实L-FABP基因启动子序列包含过氧化物酶增殖体增殖物受体反应元件. 此外有证据表明, L-FABP可与丝裂原物质以及癌抗原结合, 进入细胞核后引起细胞增殖, 促进细胞恶性转化, 因此认为其具有核转录因子的作用. 尽管目前尚缺乏L-FABP作为信号转导分子的直接证据, 但上述研究结果表明L-FABP可能不仅仅简单地作为载体蛋白, 其分子信号转导作用值得进一步研究.

3.3 作为内源性抗氧化及解毒物质 将L-FABP基因转染至Chang Liver细胞表达, 结果L-FABP可以减轻双氧水、缺氧等所导致的氧化应激损伤^[19]. 在肝脏胆道梗阻的动物模型研究中, 给予传统的抗高脂药物氯贝丁脂可上调L-FABP的表达水平, 并减轻肝脏的胆汁淤滞性氧化损伤^[20]. 在肝脏酒精损伤过程中, 如果给予PPAR- α 激动剂提高L-FABP浓度, 则可减轻酒精所致的过氧化毒性作用^[21-22]. L-FABP的抗氧化功能可能与蛋白结构中大量的半胱氨酸、甲硫氨酸残基有关. 这些残基可参与巯基的氧化还原, 提高还原性谷胱甘肽的生成率. 但Feng *et al*^[23]发现, 在大鼠非酒精性脂肪肝形成过程中, L-FABP水平逐渐升高, 以后逐渐降低. 作者认为起初表现为适应反应, 后期失代偿则表现为肝脏损伤. 因此, 进一步研究L-FABP的

■相关报道

国外对L-FABP的基因序列及蛋白结构的研究已较为深入, 有关其参与机体脂肪代谢的研究较多. 将L-FABP基因转染至Chang Liver细胞并表达, 结果显示L-FABP可以减轻缺氧等所导致的氧化应激损伤.

抗氧化及解毒机制,将有助于阐明L-FABP在脂肪肝、肝脏缺血/再灌注损伤等临床常见病理过程中的作用。

4 L-FABP的表达调控

既往认为影响L-FABP表达的因素包括血液脂肪酸水平,激素(尤其是类固醇激素)水平,某些药物(如过氧化物增殖酶体受体激动剂)等。近来又发现了多种调控途径。

已经证明,环境的氧应激水平可影响细胞内L-FABP表达,细胞微环境氧自由基浓度可以升高L-FABP水平^[24]。除了氯贝丁脂等降血脂药物外,许多新提纯的植化药物也可激动过氧化物增殖酶体受体,间接引起L-FABP水平升高,进而对某些氧化损害产生保护作用。Kim *et al*^[25]发现橘梗多苷可通过上调L-FABP水平减轻和延缓酒精所致的肝脏损伤和脂肪肝的形成。其机制主要与该药物抑制了细胞色素P450E1有关。另有研究发现,非诺贝特和罗西格列酮分别通过激动PPAR- α 与PPAR- γ 减轻非酒精性脂肪的损伤和病变程度。其机制与上调促进脂肪转运和代谢的L-FABP及其他脂肪代谢酶系密切相关^[26-27]。不同性别个体之间L-FABP水平存在差异,这与性激素水平有关。类固醇激素(如地塞米松)可抑制肝细胞表达L-FABP,加重肝细胞的氧应激损伤,生长激素亦可以通过非依赖PPAR途径下调L-FABP,减缓脂肪肝的形成^[28-29]。而食用富含维生素B及甲硫氨酸的食物可有效降低酒精性肝损伤动物肝脏的L-FABP和炎症因子水平,起到保护作用^[30]。最近一个重要的进展是证明了L-FABP与PPAR受体之间的相互作用,L-FABP可引起PPAR受体激动,进而导致L-FABP合成增加。两者构成了正反馈环状调节通路,其机制和生理意义有待进一步研究^[31-32]。

基因调节途径则是近年来L-FABP表达调控机制的主要研究进展。关键基因位点的干预比药物干预更加高效和准确。例如,锌指转录因子GATA-4、GATA-5和GATA-6可以结合L-FABP启动子上游128位点,从而上调L-FABP表达^[33-34]。而用PPAR α -视黄醇X受体与PGC1 β 联合转染肝细胞,可抑制L-FABP与甘油三酯转运蛋白表达,阻止脂肪肝形成,并有效减轻酒精性肝损伤^[35-36]。在L-FABP基因敲除动物模型中,脂肪酸 β 氧化功能减弱,并且在禁食及喂饲高脂饮食条件下不易形成脂肪肝^[37]。另外还发现^[38],L-FABP与脂膜形成脂蛋白微囊以出芽的形式输出脂蛋

白是肝细胞内质网合成脂蛋白的重要限速步骤。因此,L-FABP在脂蛋白合成方面具有重要功能。

5 L-FABP的临床应用

由于L-FABP分子质量较小(14.4 kDa),在肝细胞、肾小管细胞受到损伤时,细胞膜通透性变化可使其快速溢出,因此L-FABP可作为一个敏感、特异的组织损伤标志物^[39-40]。Pelsers *et al*^[41]报道,肝移植术后患者在发生排斥反应的当天,所有患者血清L-FABP均明显增加(>50%),而 α 谷胱甘肽S-转移酶升高者为91%,ALT升高者仅占40%。并且L-FABP增加早于急性排斥反应,甚至比 α 谷胱甘肽S-转移酶、ALT明显提前。提前时间的中位数L-FABP为2 d, α 谷胱甘肽S-转移酶为1 d,ALT则晚于2 d。提示L-FABP是一个早期监测肝细胞损伤的有用生化标志。后来的研究进一步表明,应用L-FABP作为肝细胞损伤的标志物,对于评估尸体供肝的缺血损害程度以及评估肝切除术中导致肝损害的关键因素等,都具有较高的敏感性和特异性^[42-43]。

L-FABP最引人注目的临床应用进展是作为慢性和急性肾损伤的分子标志。L-FABP主要表达在近曲小管,其功能尚不明。在肾脏疾病出现大量蛋白尿、缺血和毒性损害时,推测L-FABP参与尿夜游离脂肪酸的重吸收,促进 β 氧化供能,从而减轻氧应激损伤。Kamijo *et al*^[44]在研究慢性非糖尿病肾病时发现,肾功能恶化患者的尿L-FABP水平显著升高。其后进行的多中心队列研究进一步发现,在预测慢性肾病进展方面,尿L-FABP较尿蛋白有较高的敏感度(93.8% vs 68.8%),但其特异性较差(62.5% vs 93.8%)。因此尿L-FABP对于筛选肾病恶化具有较大优势,其敏感度高于尿蛋白及葡糖胺酶等常用指标^[45]。随着研究的逐步深入,尿L-FABP在检测局灶性肾小球坏死^[46]、糖尿病肾病、冠脉造影剂所致肾病^[47]、心脏转流术后急性肾损伤^[48]以及肾脏移植缺血再灌注损伤方面^[49]均显示了较好的预测作用。由于肝细胞含有大量的L-FABP,在肝移植合并肾损伤或者伴有肝肾疾病时,L-FABP的检测特异性和敏感度受到限制。但新近报道血清L-FABP的变化并不影响尿L-FABP的数值^[50]。因此尿L-FABP仍可作为一个较有应用前景的急慢性肾脏损伤分子标志。

6 结论

尽管目前对于L-FABP的细胞内外功能、调控因

■创新盘点

本文全面阐述了L-FABP的结构与生理功能、基因与药物调控的机制以及临床应用。较为集中地阐明了L-FABP在脂肪肝、肝肾组织损伤等病理过程中的作用及意义。

■应用要点

由于L-FABP分子量较小(14.4 kDa),在肝细胞、肾小管细胞受到损伤时,细胞膜通透性变化可使其快速溢出,因此L-FABP可作为一个敏感、特异的组织损伤标志物。将来可与肝酶、肌酐等现有的化验指标联合应用,成为临床有用的肝肾功能指标。

素以及与糖尿病、肥胖症、高脂血症以及某些肿瘤的关系尚未明了,但现有的研究已显示出L-FABP有望成为治疗上述疾病的有效药物靶点。因此,加强对L-FABP功能与调控机制的研究,开发以L-FABP为靶点的药物将是未来研究的重点内容。

7 参考文献

- 1 Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6062-6067
- 2 Martin GG, Huang H, Atshaves BP, Binas B, Schroeder F. Ablation of the liver fatty acid binding protein gene decreases fatty acyl CoA binding capacity and alters fatty acyl CoA pool distribution in mouse liver. *Biochemistry* 2003; 42: 11520-11532
- 3 Binas B, Erol E. FABPs as determinants of myocellular and hepatic fuel metabolism. *Mol Cell Biochem* 2007; 299: 75-84
- 4 Chuang S, Velkov T, Horne J, Porter CJ, Scanlon MJ. Characterization of the drug binding specificity of rat liver fatty acid binding protein. *J Med Chem* 2008; 51: 3755-3764
- 5 Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 13-18
- 6 Glatz JF, Luiken JJ, van Bilsen M, van der Vusse GJ. Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. *Mol Cell Biochem* 2002; 239: 3-7
- 7 Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 2006; 47: 39-48
- 8 Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 328-349
- 9 Owada Y. Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214: 213-220
- 10 He Y, Yang X, Wang H, Estephan R, Francis F, Kodukula S, Storch J, Stark RE. Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry* 2007; 46: 12543-12556
- 11 Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiwicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003; 36: 529-535
- 12 Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2323-2328
- 13 Huang H, Starodub O, McIntosh A, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 29139-29151
- 14 Wang H, He Y, Kroenke CD, Kodukula S, Storch

J, Palmer AG, Stark RE. Titration and exchange studies of liver fatty acid-binding protein with ¹³C-labeled long-chain fatty acids. *Biochemistry* 2002; 41: 5453-5461

- 15 Villarreal MA, Perduca M, Monaco HL, Montich GG. Binding and interactions of L-BABP to lipid membranes studied by molecular dynamic simulations. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1390-1397
- 16 Hagan RM, Worner-Gibbs J, Wilton DC. The interaction of liver fatty-acid-binding protein (FABP) with anionic phospholipid vesicles: is there extended phospholipid anchorage under these conditions? *Biochem J* 2008; 410: 123-129
- 17 Wolfrum C. Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2465-2476
- 18 Schachtrup C, Emmeler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J* 2004; 382: 239-245
- 19 Wang G, Gong Y, Anderson J, Sun D, Minuk G, Roberts MS, Burczynski FJ. Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology* 2005; 42: 871-879
- 20 Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 560: 61-68
- 21 Nanji AA, Dannenberg AJ, Jokelainen K, Bass NM. Alcoholic liver injury in the rat is associated with reduced expression of peroxisome proliferator-alpha (PPARalpha)-regulated genes and is ameliorated by PPARalpha activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 417-424
- 22 Akbiyik F, Cinar K, Demirpençe E, Ozsullu T, Tunca R, Hazirolu R, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O, Bozkaya H. Ligand-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 429-435
- 23 Feng AJ, Chen DF. [The expression and the significance of L-FABP and FATP4 in the development of nonalcoholic fatty liver disease in rats] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 776-779
- 24 Wang J, Wei Y, Wang D, Chan LL, Dai J. Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Ecotoxicology* 2008; 17: 213-220
- 25 Kim HK, Kim DS, Cho HY. Protective effects of *Platycodon radix* on alcohol-induced fatty liver. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1550-1552
- 26 Seo YS, Kim JH, Jo NY, Choi KM, Baik SH, Park JJ, Kim JS, Byun KS, Bak YT, Lee CH, Kim A, Yeon JE. PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 102-109
- 27 Guo Y, Jolly RA, Halstead BW, Baker TK, Stutz JP, Huffman M, Calley JN, West A, Gao H, Searfoss GH, Li S, Irizarry AR, Qian HR, Stevens JL, Ryan TP. Underlying mechanisms of pharmacology and toxicity of a novel PPAR agonist revealed using rodent and canine hepatocytes. *Toxicol Sci* 2007; 96:

- 294-309
- 28 Rajaraman G, Wang GQ, Yan J, Jiang P, Gong Y, Burczynski FJ. Role of cytosolic liver fatty acid binding protein in hepatocellular oxidative stress: effect of dexamethasone and clofibrate treatment. *Mol Cell Biochem* 2007; 295: 27-34
- 29 Rajaraman G, Burczynski FJ. Effect of dexamethasone, 2-bromopalmitate and clofibrate on L-FABP mediated hepatoma proliferation. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1155-1161
- 30 Gyamfi MA, Damjanov I, French S, Wan YJ. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 981-995
- 31 Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, Hostetler HA, Vespa A, Landrock D, Landrock KK, Payne HR, Kier AB. Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* 2008; 43: 1-17
- 32 Huang H, Starodub O, McIntosh A, Atshaves BP, Woldegiorgis G, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells. *Biochemistry* 2004; 43: 2484-2500
- 33 Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, Rowley CW, Heikinheimo M, Simon TC. Cooperative interactions among intestinal GATA factors in activating the rat liver fatty acid binding protein gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G297-G306
- 34 Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, Jacobsen CM, Wilson DB, Heikinheimo M, Simon TC. GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1086-G1099
- 35 Spann NJ, Kang S, Li AC, Chen AZ, Newberry EP, Davidson NO, Hui ST, Davis RA. Coordinate transcriptional repression of liver fatty acid-binding protein and microsomal triglyceride transfer protein blocks hepatic very low density lipoprotein secretion without hepatosteatosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 33066-33077
- 36 Gyamfi MA, He L, French SW, Damjanov I, Wan YJ. Hepatocyte retinoid X receptor alpha-dependent regulation of lipid homeostasis and inflammatory cytokine expression contributes to alcohol-induced liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 443-453
- 37 Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 2006; 44: 1191-1205
- 38 Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, Gheyi T, Storch J, Mansbach CM 2nd. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007; 282: 17974-17984
- 39 Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology* 2008; 245: 182-193
- 40 Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K. Urinary fatty acid binding protein in renal disease. *Clin Chim Acta* 2006; 374: 1-7
- 41 Pelsers MM, Morovat A, Alexander GJ, Hermens WT, Trull AK, Glatz JF. Liver fatty acid-binding protein as a sensitive serum marker of acute hepatocellular damage in liver transplant recipients. *Clin Chem* 2002; 48: 2055-2057
- 42 Monbaliu D, de Vries B, Crabbé T, van Heurn E, Verwaest C, Roskams T, Fevery J, Pirenne J, Buurman WA. Liver fatty acid-binding protein: an early and sensitive plasma marker of hepatocellular damage and a reliable predictor of graft viability after liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2005; 37: 413-416
- 43 van de Poll MC, Derikx JP, Buurman WA, Peters WH, Roelofs HM, Wigmore SJ, Dejong CH. Liver manipulation causes hepatocyte injury and precedes systemic inflammation in patients undergoing liver resection. *World J Surg* 2007; 31: 2033-2038
- 44 Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hikawa A, Hirano N, Hirata Y, Goto A, Omata M. Urinary fatty acid-binding protein as a new clinical marker of the progression of chronic renal disease. *J Lab Clin Med* 2004; 143: 23-30
- 45 Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, Numabe A, Takagi M, Hayakawa H, Tabei F, Sugimoto T, Mise N, Kimura K. Clinical evaluation of urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein as a marker for the monitoring of chronic kidney disease: a multicenter trial. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 125-133
- 46 Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Osada S, Koide H. Urinary liver-type fatty acid-binding protein levels for differential diagnosis of idiopathic focal glomerulosclerosis and minor glomerular abnormalities and effect of low-density lipoprotein apheresis. *Clin Nephrol* 2006; 65: 1-6
- 47 Nakamura T, Sugaya T, Node K, Ueda Y, Koide H. Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 439-444
- 48 Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E, Devarajan P. Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2008; 73: 465-472
- 49 Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2894-2902
- 50 Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, Numabe A, Takagi M, Hayakawa H, Tabei F, Sugimoto T, Mise N, Omata M, Kimura K. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem* 2006; 284: 175-182

同行评价

本文在参阅多篇国内外参考文献的基础上,对肝型脂肪酸结合蛋白的生理功能、调控机制以及临床应用进展作一综述,撰写较为规范,参考文献引用较新,科学性、创新性和可读性能较好地反映我国有关肝型脂肪酸结合蛋白研究的先进水平。

编辑 李军亮 电编 何基才

Survivin在胃癌中的表达及其靶向治疗

丁玉平, 邹赛英, 赵海华

■背景资料

Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白, 高表达于绝大多数肿瘤组织, 提示他是一个有潜在价值的肿瘤标志物和肿瘤治疗的新靶点。

丁玉平, 邹赛英, 赵海华, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐 830000

作者贡献分布: 文献检索, 资料分析和论文撰写由丁玉平完成; 选题审校由邹赛英完成; 邹赛英与赵海华对此文进行修改。

通讯作者: 邹赛英, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院病理科。

dingyuping117@163.com

电话: 0991-4992830

收稿日期: 2008-08-06 修回日期: 2008-09-30

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-08

Survivin expression in gastric carcinoma and its targeted therapy

Yu-Ping Ding, Sai-Ying Zou, Hai-Hua Zhao

Yu-Ping Ding, Sai-Ying Zou, Hai-Hua Zhao, Department of Pathology, Urumqi General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Command, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Sai-Ying Zou, Department of Pathology, Urumqi General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Command, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. dingyuping117@163.com

Received: 2008-08-06 Revised: 2008-09-30

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

Survivin is a protein highly expressed in a vast number of malignancies while minimally expressed in normal tissues. It plays an important role in inhibiting normal cell death and facilitating cancer cell growth. Studies in recent years indicated that Survivin expression is associated with the biological behaviours of gastric carcinoma. Due to this specific expression, Survivin has been considered as an "ideal target" for cancer therapy. Currently, several pre-clinical and clinical trials are ongoing to investigate the effects of interfering with Survivin function on cancer cells. This paper reviews the progress in Survivin expression in gastric carcinoma and its targeted therapy.

Key Words: Survivin; Gastric carcinoma; Targeted therapy

Ding YP, Zou SY, Zhao HH. Survivin expression in gastric carcinoma and its targeted therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3528-3532

摘要

Survivin在大多数肿瘤组织中表达, 但很少表达于正常组织。他在抑制细胞凋亡, 促进肿瘤生长方面发挥重要作用。近几年在胃癌的研究中提示Survivin的表达与胃癌的生物学行为密切相关。鉴于Survivin在肿瘤中表达的特异性, 他被认为是胃癌等肿瘤治疗的理想靶点, 当前以Survivin为靶点的生物治疗成为新的研究热点。本文就其近几年的研究现状作一综述。

关键词: Survivin; 胃癌表达; 靶向治疗

丁玉平, 邹赛英, 赵海华. Survivin在胃癌中的表达及其靶向治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16(31): 3528-3532

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3528.asp>

0 引言

肿瘤的发生发展是多阶段过程, 涉及多个基因突变与异常表达, 与细胞凋亡调控失衡相关。细胞凋亡(apoptosis)是一个主动由基因决定自动结束生命的过程, 受到严格的由遗传机制决定的程序性调控, 也称细胞编程性死亡, 该过程受凋亡促进因子和凋亡抑制因子的共同调节^[1]。Survivin是一种新近发现的结构独特的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs), 是IAPs家族中相对分子量最小的成员, 具有抑制细胞凋亡、调节细胞周期和细胞分裂的多重功能。Survivin参与肿瘤的发生、发展过程, 提示他是一个有潜在价值的肿瘤标志物和肿瘤治疗的新靶点^[2]。

1 Survivin研究现状

1.1 基本结构 Survivin基因是1997年由耶鲁大学的Altieri研究组^[3], 用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)cDNA, 在人类基因组杂交筛选中分离并克隆出来的。其基因定位于染色体17q25, 靠近端粒, 全长14.7 kb, 由4个外显子和3个内含子组成; mRNA长1619 nt 属于IAPs家族, 是IAP家族中最小的成员, 编码蛋白由142个氨基酸残基构成, 分子质量有16.5

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室; 陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

kDa. 结构上与其他IAP蛋白略有不同, 每个单体分子N端仅含有一个部分保守的单拷贝杆状病毒IAP重复序列(baculoviral IAP repeat, BIR)结构域. BIR分子被插入序列(cys46-Pro47-Thr48 3个氨基酸构成)分成二等份, 且羧基末端缺少锌指结构, 被 α 螺旋结构(42个氨基酸构成)代替, 该螺旋结构在G₂/M期与组成有丝分裂纺锤体的微管特异性结合, 抑制细胞凋亡, 维持有丝分裂的正常进行^[4]. 研究发现在人类有3种不同抗凋亡特性的新的Survivin的剪接变构体, 即Survivin- Δ Ex3、Survivin-2B和Survivin-3B. 通过转染三种剪接变构体对凋亡的调控, 显示Survivin- Δ Ex3保留抗凋亡特性, 而Survivin-2B的抗凋亡能力明显降低, Survivin-3B含有单个对凋亡抑制非常重要的BIR, 但是缺乏羧基末端螺旋结构, 提示Survivin-3B可能与细胞增殖无关^[5-6].

1.2 Survivin功能 首先Survivin蛋白调节细胞凋亡, 大致有两种途径: 外源性途径和内源性途径. 外源性凋亡途径又称死亡受体途径, 是通过细胞膜上的死亡受体(如TNF、Fas)激活, 使细胞发生凋亡, 该途径的启动酶是Caspase-8; 内源性凋亡途径又称线粒体途径, 该途径的启动酶是Caspase-9, 执行酶是Caspase-3^[7]. 其次, Survivin表达具有明显的周期依赖性, 过表达会导致细胞加快向S期转换, 抑制G₁期静止, 从而促进细胞增殖. 其机制可能是细胞生长信号诱导Survivin表达, Survivin竞争性的与Cdk4/P16INK4a复合物结合, 把p16INK4a从复合体中游离出来, 并形成Survivin/Cdk复合物, 从而直接或间接地激活Cdk2/Cy2clinE复合物, 导致Rb蛋白磷酸化, 以启动细胞有丝分裂. Survivin不仅与细胞膜凋亡、周期依赖有关, 还与细胞分化有关^[8]. 通过突变分析发现^[9], Survivin的二聚体结构和环绕天冬氨酸-71的疏水界面是其抗凋亡和保持倍体性所必须的, 这是Survivin既抗凋亡又调节细胞分化双重作用的结构基础. 干扰Survivin的功能可引起多向性细胞分化缺陷和凋亡. 此外Survivin参与了血管形成过程, 血管形成的核心是血管内皮细胞的分裂增殖, 应用血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导静止期的内皮细胞分裂, 检测Survivin表达水平, 结果提示血管内皮细胞内Survivin含量升高^[10]. 另外有研究发现VEGF-C与Survivin在胃癌中的表达呈正相关^[11], 可提示Survivin在血管形成的中间环节中有重要意

义, 但其具体作用机制有待继续研究.

2 Survivin与胃癌

2.1 Survivin基因多态性与基因表达 Survivin特异表达于人和鼠的胚胎发育组织, 同时高表达于绝大多数肿瘤组织. Chiou *et al*^[12]研究却发现Survivin亦表达于成人或鼠正常胃黏膜中. 在人和鼠胃黏膜中, Survivin主要表达于黏膜表面上皮细胞的细胞核中, 而在人类主细胞和壁细胞中Survivin在细胞核和胞质中均有表达. Kania *et al*^[13]报道在正常的胃黏膜中Survivin mRNA有极低程度表达, 但无Survivin蛋白表达, 同时认为Survivin水平的改变在正常胃黏膜向胃癌的转化过程中发挥重要作用. 在胃癌组织中从mRNA水平检测Survivin, 大多实验都显示高表达.

新近研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-RFLP)检测胃癌患者和正常人血液中Survivin基因多态性, 同时采用实时定量逆转录聚合酶链反应(RQ-RT-PCR)对Survivin mRNA定量检测^[14]. 结果胃癌患者-31C等位基因和C/C基因型频率显著高于对照组, 但其表达强度在胃癌组织各基因型之间无显著性差异. 提示Survivin基因启动子-31C/C基因型和C等位基因与胃癌有关, 可能是肿瘤发生的易感因素之一.

2.2 Survivin与胃癌临床病理特征的关系 Survivin的表达, 与胃癌的分期, 分型, 及与淋巴结转移的相关性, 国内外学者结论不一. Lee *et al*^[15]研究了106例胃癌显示, Survivin mRNA在胃癌细胞的表达, 均与淋巴结转移, 肿瘤大小, 浸润深度, 分期密切相关, Survivin阳性者其生存期短. 在这方面也有不同观点, Miyachi K的结果显示, Survivin mRNA的表达与肿瘤的组织学类型, 肿瘤浸润深度无关, 而仅与淋巴结转移相关, 有淋巴结转移的患者其Survivin阳性率及表达水平均显著高于淋巴结阴性的患者($P<0.05$)^[16]; 还有学者研究表明Survivin mRNA的表达与临床病理特征包括组织学类型, 浸润深度, 淋巴结转移及分期均无相关性, 但Survivin低水平表达的患者生存期明显高于Survivin高表达的患者^[17]. 国内学者检测了Survivin及其拼接异构体Survivin-2B、Survivin- Δ Ex-3在胃癌中的表达与胃癌临床病理特征及预后之间的关系, Survivin的表达与上述各种临床病理特征之间均无相关性. Survivin高表达患者的生存曲线显著低于低表达的患者, 而Survivin-2B、Survivin- Δ Ex-3的表达

■研发前沿

一系列实验证实Survivin抑制细胞凋亡, 促进胃癌肿瘤细胞发生发展这一过程. 如今Survivin在胃癌中基因多态性的研究, 以及以Survivin为靶点的基因靶向治疗研究成为新的热点.

■相关报道

Ansell *et al*采用反义寡核苷酸(an antisense oligonucleotide, ASO)方法, 抑制Survivin的表达后, 发现DoHH2, RL和HT淋巴瘤细胞系与淋巴瘤异种移植瘤模型中, 肿瘤的发生发展受抑制. Yamamoto报道, 诱导直肠癌细胞表达EPR-1, 在显著下调Survivin表达的同时, 促进细胞凋亡; 动物实验亦发现EPR-1转导的皮下移植瘤体积明显减小.

■创新盘点

本综述对Survivin结构、功能进行概括,并介绍了Survivin在抑制肿瘤凋亡中的作用,重点论述其与胃癌发生发展关系,特别强调了其靶向治疗的新观点。

与生存无关,提示Survivin可能为独立的预后因子^[18]。有研究指出, Survivin核阳性者与较好的预后、较低的血管侵犯转移风险相关,可作为独立的预后评估指标;而胞质阳性者则与预后和肿瘤进程无明显相关,提示Survivin阳性表达局限于胞核内者,有利于阻滞胃癌的发展进程^[19]。

2.3 Survivin与胃癌其他相关因素的关系 Survivin的抗凋亡活性与胃癌其他相关因素也有关系,如胃泌素高,胃癌细胞抗凋亡的活性就是通过Survivin和BCL-2的表达上调实现的^[20]; Survivin的表达与HP感染关系亦密切; EBV利用潜在蛋白LMP2A激活NF-KappaB-Survivin途径,上调Survivin表达,促进胃癌的发生发展^[21]。还有研究结果显示非甾体抗炎药吲哚美辛能呈剂量限制性抑制鼠胃黏膜细胞及RGM-1细胞中Survivin的表达并引起严重的胃黏膜损伤^[22]。Survivin可能在调节细胞更新和维持胃黏膜完整性方面起重要作用,国内学者进一步证明吲哚美辛可能通过下调WNT通路中的 β -catenin抑制TCF4从而下调组织中Survivin的表达^[23]。

3 Survivin与肿瘤治疗

3.1 Survivin与化疗耐药 药物化疗是治疗恶性肿瘤最重要的手段之一,但随着抗肿瘤药物的广泛应用,耐药性成为临床肿瘤化疗失败最常见和最难克服的问题。胃癌是最难治疗的恶性肿瘤之一,常常对包括顺氯氨铂(CDDP)多种药物耐药, CDDP诱导的肿瘤细胞凋亡需经Caspase-3活化,因此Survivin可能参与了此药物耐受发生的机制。

为探讨Survivin在化疗耐药机制中的作用,应用顺铂处理胃癌细胞株(MKN45),结果提示肿瘤细胞可能通过高表达Survivin以对抗化疗药物诱导的细胞凋亡^[24];联合X线放疗与TAS106治疗使小鼠肿瘤明显抑制,其原因被证实很大程度上得益于TAS106对Survivin的抑制^[25];转染Survivin基因的野生型和显性负性突变至胃癌细胞中, Survivin的过表达使胃癌细胞株NUGC-3对药物诱导的凋亡敏感^[26]。因此, Survivin在胃癌中可以作为对顺氯氨铂敏感性的预测指标,同时下调Survivin mRNA的表达,可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

3.2 Survivin与基因治疗 利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术引起与其同源的mRNA特异性的降解,从而导致不同类型细胞的靶向基因表达明显降低,称为基因敲低(knock down)或基因沉默(gene silencing)。Ling *et al*^[27]使用小

分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和短发夹样RNA(short hairpin RNA, shRNA)等RNA干扰技术同样使Survivin基因沉默,并且发现Survivin的表达受抑可选择性诱导转染的肿瘤细胞凋亡。国内学者Miao *et al*^[28]也发现Survivin siRNA转染能诱导SGC-7901细胞的凋亡。另外采用反义寡核苷酸(An antisense oligonucleotide, ASO)方法,抑制Survivin表达,也使肿瘤的发生发展受到抑制^[29]。由于Survivin和EPR21位于染色体的同一基因簇,且两个基因的编码序列广泛互补,故通过两个天然反义转录物的相互作用可以调节细胞凋亡。该疗法可以克服反义寡核苷酸基因治疗存在的特异性差,基因传递不完全的缺点。此外, Survivin靶向治疗还可以与其他肿瘤基因如*bcl-2*、*p53*等的靶向治疗联合,发挥协同作用。

3.3 Survivin与肿瘤的免疫治疗 Survivin能诱导特异的CD8⁺细胞毒性T^[30]细胞,并且这种自发的Survivin反应性细胞毒性T细胞,可被MHC2肽复合物包被的磁珠纯化,从而对不同组织类型的HLA配型肿瘤具有细胞毒性,因此Survivin可以作为一个普遍存在的肿瘤抗原适用于广泛抗肿瘤免疫疗法的一个新靶蛋白。

Idenoue *et al*^[31]通过Survivin-2B80-88(AYACNTSTL)肽作为抗原,诱导人HLA-A24(+)乳腺癌、结直肠癌及胃癌的特异性自发性细胞毒T细胞(CTL)反应,以识别和杀伤肿瘤细胞,从而提出AYACNTSTL肽可能成为HLA-A24(+)肿瘤的疫苗,为进行肿瘤的免疫治疗提供了基础。

Survivin作为肿瘤治疗靶点的优点在于Survivin仅特异性地表达于肿瘤组织,在正常成人组织几乎不表达,使得应用Survivin特异性抗体免疫治疗以及反义Survivin基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性,靶向Survivin治疗可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖,而对正常组织几乎没有不良影响,这是靶向Survivin治疗所特有的优点。

4 结论

胃癌的发生过程,是一个多因素,多步骤的复合作用过程。Survivin是一新近发现的具有多重功能的细胞凋亡抑制因子,不仅能够抑制细胞凋亡,而且还能启动并调节细胞周期,且与部分肿瘤的血管生成相关。目前研究已揭示Survivin正常组织中常无表达,在人体内几乎所有的恶性

■应用要点

Survivin反义寡核苷酸技术优点在于高度的靶特异性、设计容易且合成简单,其靶向性为常规药物所不及,是目前最有可能应用于临床的基因疗法。

肿瘤中均有表达, 与包括胃癌在内的肿瘤发生发展、预后密切相关, 有望成为肿瘤有效诊治的新靶点。但Survivin如何实现对细胞凋亡和细胞周期的双重检测点的调控, 以及与其他癌基因、抑癌基因和凋亡相关基因的关系, 还不清楚; 针对靶向Survivin的治疗实验亦处于起始阶段。但是, 随着对Survivin研究的进一步深入, 靶向Survivin的阻断性抗体免疫治疗或基因治疗, 促进人类恶性肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤疗法及针对性开发相应新的抗肿瘤药物, 将对恶性肿瘤的治疗具有重大意义。

5 参考文献

- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8581-8589
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584
- Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer Lett* 2004; 216: 147-155
- Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 902-907
- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320
- Muchmore SW, Chen J, Jakob C, Zakula D, Matayoshi ED, Wu W, Zhang H, Li F, Ng SC, Altieri DC. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell* 2000; 6: 173-182
- O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398
- Sun YS, Ye ZY, Zhao ZS, Shi D, Zou SC. [Expression of vascular endothelial growth factor C and survivin in gastric carcinoma and their clinical implications] *Zhonghua Weichang Waikexue* 2006; 9: 264-267
- Chiou SK, Moon WS, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin expression in the stomach: implications for mucosal integrity and protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 374-379
- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 266-271
- Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. [Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma] *Ai Zheng* 2008; 27: 258-263
- Lee GH, Joo YE, Koh YS, Chung IJ, Park YK, Lee JH, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 957-963
- Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, Sunagawa M. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6: 217-224
- Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2004; 95: 44-51
- Meng H, Lu CD, Sun YL, Dai DJ, Lee SW, Tanigawa N. Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3245-3250
- Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116
- Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Ocker S, Hahn EG, Konturek SJ. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 17-32
- Hino R, Uozaki H, Inoue Y, Shintani Y, Ushiku T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res* 2008; 68: 1427-1435
- Chiou SK, Tanigawa T, Akahoshi T, Abdelkarim B, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. *Gastroenterology* 2005; 128: 63-73
- Zhu HX, Zhang G, Wang YH, Zhou CQ, Bai JF, Xu NZ. [Indomethacin induces apoptosis through inhibition of survivin regulated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal cancer cells] *Ai Zheng* 2004; 23: 737-741
- Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis* 2002; 7: 23-29
- Yasui H, Inanami O, Asanuma T, Iizuka D, Nakajima T, Kon Y, Matsuda A, Kuwabara M. Treatment combining X-irradiation and aribonucleoside anticancer drug, TAS106, effectively suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68: 218-228
- Pennati M, Binda M, De Cesare M, Pratesi G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zunino F, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 2004;

■名词解释

反义寡核苷酸技术(ASO): 将小分子与靶基因序列互补的寡核苷酸(DNA)导入细胞, 与mRNA结合, 激活核酶RNaseH, 促使mRNA降解, 抑制转录过程, 从而抑制靶基因的表达。

■同行评价

本文选题新颖,文献引用合理,问题阐述清楚,对读者认识Survivin分子在肿瘤中的作用有参考价值。

- 25: 1129-1136
- 27 Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques* 2004; 36: 450-454, 456-460
- 28 Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1170-1174
- 29 Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2004; 18: 616-623
- 30 Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Bröcker EB, Becker JC, thor Straten P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 5964-5968
- 31 Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H, Yamamoto M, Kurotaki T, Tsuruma T, Asanuma H, Kanaseki T, Ikeda H, Kashiwagi K, Okazaki M, Sasaki K, Sato T, Ohmura T, Hata F, Yamaguchi K, Hirata K, Sato N. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1474-1482

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 2008-11-08)

环氧合酶-2在溃疡性结肠炎中的作用

章仲恒, 姜 潇, 王建国

章仲恒, 姜潇, 王建国, 浙江大学附属邵逸夫医院消化内科
浙江大学邵逸夫临床医学研究所 浙江省杭州市 310029

作者贡献分布: 章仲恒完成大部分文献复习及文稿写作; 姜潇完成部分内容修改; 王建国校审。

通讯作者: 章仲恒, 310029, 浙江省杭州市, 浙江大学附属邵逸夫医院消化内科, 浙江大学邵逸夫临床医学研究所。

zh_zhang1984@hotmail.com

电话: 0571-87230687

收稿日期: 2008-07-11 修回日期: 2008-10-08

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Role of cyclooxygenase-2 in ulcerative colitis

Zhong-Heng Zhang, Xiao Jiang, Jian-Guo Wang

Zhong-Heng Zhang, Xiao Jiang, Jian-Guo Wang, Department of Gastroenterology, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to Zhejiang University; Sir Run Run Shaw Institute of Clinical Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Zhong-Heng Zhang, Department of Gastroenterology, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to Medicine of Zhejiang University; Sir Run Run Shaw Institute of Clinical Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China. zh_zhang1984@hotmail.com

Received: 2008-07-11 Revised: 2008-10-08

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) plays an important role in the development and prognosis of ulcerative colitis. First, it may initiate inflammatory process. Many studies show that expression of COX-2 is significantly increased in the lesion of ulcerative colitis. During regenerative phase, inhibition of COX-2 may hinder the healing process, and thereafter exacerbate symptoms. COX-2-induced regeneration is monitored under delicate systems. If the balance of this system is disturbed by unknown factors, dysplasia or even carcinoma may develop.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Ulcerative colitis; Carcinogenesis

Zhang ZH, Jiang X, Wang JG. Role of cyclooxygenase-2 in ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3533-3538

摘要

环氧合酶-2在溃疡性结肠炎的发生及预后有着

着重要的作用, 首先表现在启动炎症反应过程, 许多研究发现COX-2在溃结组织中的表达显著升高, 在炎症反应的组织修复期, 抑制COX-2则表现为使修复受阻, 病情加重. 另外COX-2介导的组织修复也需要在一定的严密系统调控下才能正常进行, 在各种未知因素的作用下, 这个平衡被打破, 就有可能出现不典型增生, 最终导致癌的发生.

关键词: 环氧合酶-2; 溃疡性结肠炎; 癌变

章仲恒, 姜潇, 王建国. 环氧合酶-2在溃疡性结肠炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(31): 3533-3538

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3533.asp>

0 引言

肿瘤与炎症或感染的病理生理截然不同, 这一结果是19世纪最重要的发现之一. 但到了20世纪末, 各种各样的证据表明这两个过程似乎不像组织病理学所提示的那样可以截然分开. 首先, 有许多慢性炎症过程可以显著提高肿瘤的发病率, 如Barrett食管、慢性溃疡性结肠炎. 其次, 许多肿瘤过度表达了炎症因子环氧合酶(COX)-2. 第三, 各种流行病学资料、动物实验、临床干预试验都表明, 阿司匹林和其他一些非甾体类消炎药(NSAIDs)能抑制肿瘤发生, 这最先在结直肠癌中观察到^[1]. 溃疡性结肠炎为研究炎症与肿瘤的关系提供了良好的模型, 环氧合酶是炎症反应中重要的酶, 探讨环氧合酶在溃疡性结肠炎中的作用有助于阐明肿瘤发生发展的其中一种途径, 并为临床上如何阻止溃疡性结肠炎恶变提供理论依据. 本文就对COX-2与溃疡性结肠炎的关系以及一些相关问题作一综述.

1 COX-2对溃疡性结肠炎的致病作用

COX有COX-1和COX-2两种同工酶. 前者为结构型, 主要存在于正常的血管、胃、肾等组织中, 在溃疡性结肠炎组织中表达于正常对照无显著差异, 参与血管舒缩、血小板聚集、胃黏膜血流、胃黏液分泌及肾功能调节. 后者为诱导型,

■背景资料

近年来有较多针对COX-2对溃疡性结肠炎的致病作用以及在癌变中的作用研究, 本文就这些最新成果作一综述.

■同行评议者

李永哲, 副教授. 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京协和医院检验科

■创新盘点

本文十分详尽地阐述了COX-2在溃结炎症及癌变过程中的作用,并融入了许多与正统观念不一致的实验研究,如许多动物及临床实验表明抑制COX-2可能阻止黏膜的修复。

与炎症有密切联系,可以被多种炎症递质和细胞因子所诱导,如胆汁酸、脂多糖、血清、高渗状态、白介素-1、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、转移生长因子、血小板激活因子等。各种损伤性化学、物理和生物因子激活磷脂酶A2或酰基水解酶水解细胞膜磷脂,生成花生四烯酸,后者经COX催化加氧生成前列腺素(PG2)。当下丘脑PGE2增加,使体温调定点上升,增加产热,减少散热,体温上升。PGE2和PGF2 α 有轻度而持久的致痛作用,也使痛觉感受器增敏。PGS可致血管扩张和组织水肿,也可与缓激肽等协同致炎。

溃疡性结肠炎是一种慢性非特异性炎症,炎症反复发作的过程中,黏膜不断被破坏和修复,致正常结构破坏。许多研究发现COX-2在该炎症发展过程中起重要作用^[2],由三硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎模型^J^[3],应用三硝基苯磺酸后24 h到1 wk内COX-2 mRNA的量可增加6倍。在对人溃疡性结肠炎组织的研究中也发现与对照组相比COX-2多在病变组织中表达显著增多,用免疫组化的方法测定COX-2蛋白含量和用反义PCR方法测定COX-2 mRNA含量都得出一致的结论^[4],而且有些研究得出内镜下炎症活动度分级与COX-2表达呈正相关。然而国内的一项研究却表明在I、II、III级溃疡性结肠炎之间COX-2表达差异无显著性意义,这可能与所采用的分级方法不同有关,前者为内镜下分级而后者采用tullelove组织学分级,但炎症反应使COX-2增高是不争的事实。而抑制COX-2能减轻肠道黏膜炎症^[5-6]。

显微镜下可见溃疡性结肠炎组织隐窝结构紊乱,主要表现为腺体变形、排列紊乱、数目减少等萎缩改变,伴杯状细胞减少和潘氏细胞化生。用免疫组化方法检测正常和溃结组织发现,COX-1在结肠隐窝下部上皮表达,而COX-2则出现在顶端上皮细胞(apical epithelial cells)和固有层单核细胞(lamina propria mononuclear),在间质炎性细胞中可见COX-2呈强阳性表达。COX-1表达区域刚好是增生活跃区域,这提示了当细胞分化成熟时便不再表达COX-1,COX-1表达主要在胞质内(cytoplasmic),而COX-2则在核周^[7]。

关于COX-2与溃疡性结肠炎之间的一些分子机制也做了广泛而细致的研究。目前认为COX-2属诱导型酶,与炎症有密切联系,可以被多种炎症递质和细胞因子所诱导^[8],如胆汁酸、脂多糖、血清、高渗状态、白介素-1、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、转移生长因子、血小

板激活因子等。这些递质和细胞因子主要通过激活被称作初始反应基因的NF- κ B途径来实现对COX-2的诱导^[1]。NF- κ B由一组诱导型核转录因子组成,位于COX-2 mRNA启动子中,作为宿主重要的调节因子,通过诱导和促进特定的细胞因子及化学因子的基因表达,调节炎症和免疫反应过程。炎症反应时,细胞因子IL-1 β 、TNF- α 、LPS及氧化剂(如氢过氧化物)水平升高,使NF- κ B不能与抑制蛋白I κ B结合,反而被蛋白酶水解,游离的NF- κ B迅速进入胞核,与靶基因的启动子或增强子区域B基序结合,调节靶基因包括编码促炎性细胞因子(TNF- α)、趋化因子、黏附分子和酶(如COX、NOS等)基因mRNA的合成,促进炎症反应。而IL-1 β 、TNF- α 等又作为NF- κ B的激活剂,反过来激活NF- κ B,建立一种正反馈自我调节环路,扩大炎症反应,延长慢性炎症进程,造成更严重的不良影响。如果抑制NF- κ B活性,则IL-1 β 和TNF- α 表达减少,也间接证实激活NF- κ B通路可能与疾病相关炎症反应增强有关。另一方面,COX-2的表达也可调节NF- κ B通路,这主要是由于COX-2指导与炎症消退有关的抗炎症性环前列腺素(cyclo-oxygenase pmstaglandins, cyPGs)的合成。COX-2调节NF- κ B通路的具体作用包括两个方面:(1)cyPCs的代谢产物15dPGJ2活化核受体超家族成员之一(PPAR γ),抑制NF- κ B调节基因的表达,发挥抗炎活性。(2)cyPGs本身也能直接抑制NF- κ B活性,其代谢产物PGA1,抑制TNF- α 诱导的I κ B α 磷酸化、NF- κ B DNA黏连及NF- κ B在淋巴细胞中的转移活化作用。正如NF- κ B调节COX-2的合成过程,通过cyPGs途径抑制的NF- κ B转移活化作用很可能是促进炎症消退负反馈环路的一部分^[9]。因此,可推测在炎症条件下正是这种正反馈与负反馈的失衡,加重炎症反应。

一氧化氮(NO)对COX-2活性的调节也是很重要的一个途径。研究发现^[10],表达COX-2的上皮细胞同时也表达诱导型一氧化氮合成酶(iNOS),上皮细胞在感染等外界因素作用下,使iNOS的局限性表达增多,进而使催化合成的NO明显增多,高水平的NO失去了与PG共同维持黏膜血流的作用,引起血管扩张,通透性增加;另有研究提示协同抑制COX-2和NO合成有助于结肠炎大鼠结肠黏膜炎症减轻^[11]。此外,iNOS还可以通过提高COX-2的活性,进一步促进NO的合成,过量表达的NO作为一种促炎因子,可直接或间接地导致黏膜损伤。机制可能与其形成的大量过硝酸盐有关,过硝酸盐可使细胞线粒体蛋白

硝酸化, 从而影响细胞呼吸; 而线粒体功能改变又激活了半胱氨酸蛋白酶介导的级联反应, 诱导细胞凋亡, 造成黏膜坏死. 尽管大多数学者通过研究证实COX-2可经多种途径导致结肠炎症, 如PGD介导炎症^[12], 但仍有学者提出相反观点. Ajuebor *et al*^[13]在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的鼠结肠炎模型中发现通过COX-2诱导的结肠炎可使PGD2合成加快, 若抑制COX-2可使PGD2合成减少, 使粒细胞浸润加倍; 而摄入PGD, 或DP受体激动剂(BW-245c)炎症明显减轻, 进而提出由COX-2诱导的PG是一种早期抗炎标志.

炎症反应是一种以损伤起始、愈合告终的复杂的病理过程, 因而其间必然包含了细胞增生及组织修复, 因此COX-2可能参与了其中炎症损伤后组织修复过程. 首先, COX-2可诱导组织产生大量前列腺素, 在大鼠气囊炎症模型中^[14]炎症组织COX-2表达明显增高, 且伴有前列腺素和白三烯增多, 特异性COX-2抑制剂NS-398可阻断前列腺素的合成. PGs又介导产生了一些临床表现, PGE2可能使上皮细胞氯离子分泌增多, 从而导致溃结患者的腹泻现象^[15]. PGE2是一种血管扩张剂, 这解释了溃结组织黏膜充血的表现. PGs还使痛觉神经纤维致敏. PGs对组织的保护作用则体现在保持黏膜血流、保护组织上皮免受cytotoxin介导的损伤^[16], PGE2还促进了损伤上皮细胞增生修复过程. 小鼠模型中COX-2抑制剂的使用会使结肠炎的小鼠炎症加重^[17], 使用1 wk后可发生结肠穿孔^[3], 另外的一些证据主要来自溃疡性结肠炎患者对非甾体类抗炎药的反应上. 许多临床试验都提示非甾体类抗炎药能明显加重炎症活动期患者的症状^[18-19], 但对于静息期患者使用非甾体类抗炎药则不会明显加重病情或使疾病复发. 一项初步的研究表明使用COX-2抑制剂不会显著加重病情^[20], 该研究中的27例患者中有2例患者病情加重, 而这两位加重患者被纳入研究时都有一定的基础炎症活动^[21], 进一步临床实验表明塞来西布(200 mg, bid)对于静息期患者没有明显毒副作用^[22], 一项包括32例患者的前瞻性研究也表明rofecoxib不会使病情加重但对于关节炎有好处^[23], Takeuchi的研究显示只有NSAID可使静息性溃结症状复发, 而患者对选择性COX-2抑制剂耐受良好^[24], Sandborn给予溃结缓解期患者14 d的塞来西布, 结果与对照组相比复发率没有明显提高^[25]. 这是否与用药时间或不同病期有关, 目前还不清楚. 鉴于选择性COX-2抑制剂对心血管系统的毒副作用^[26-27], 目前还无法开展更大规模的临床试验来证实选择性COX-2抑制剂对于炎

症性肠病的确切作用. 也许对于活动期的患者使用COX抑制剂有更严重危险性, 相反的, 由于COX-2只是作为修复过程的一部分, 在缓解期使用NSAIDs就可能降低危险性^[28-29].

2 COX-2在溃疡性结肠炎癌变中的致病作用

关于COX-2与肿瘤的关系最早来源与对大肠癌的研究. 最早人们观察到非载体类抗炎药能显著降低大肠癌的发病率, 并且在动物模型上验证了这一点^[30-33], celecoxib可使F344小鼠结肠肿瘤发生率减少90%以上^[34]. 2007年新英格兰医学杂志的一项前瞻性队列提供了相关的A类证据, 该研究显示使用COX-2抑制剂可减少癌变的发生率, 常规使用阿司匹林可以降低COX-2高表达组织中的结肠癌发病危险, 但对于COX-2不表达或表达较弱组织则该作用不明显^[35], 即阿司匹林或celecoxib作用是COX-2依赖的^[36]. 提示COX-2在肿瘤发展与形成过程中起一定作用.

在观察到NSAIDs能够降低大肠癌发病率后, Eberhart *et al*开始了对结肠癌及结肠息肉中COX-2表达水平的研究, 研究发现与对照组相比COX-2在85%-95%的结肠癌组织中表达明显增多, 而COX-1水平则无明显变化^[37]. 此后许多中心又作了较为细致广泛的研究, 结论与Eberhart相一致, 并且进一步观察到, 从腺瘤到癌的发展过程中COX-2的表达是逐步增多的.

有1篇对大肠癌的研究报道发现COX-2在腺瘤与腺癌中均有高表达(89.4%, 83%), 但两者没有显著差异, 且COX-2表达与异型增生程度、腺瘤大小、分化程度、Dukes分期、淋巴结转移无显著相关性, 但在腺癌和腺瘤周围的高度不典型增生病变中的COX-2表达显著增多, 这些事实提示COX-2可能仅在肿瘤发展的早期起作用^[38]. 但来自日本的一篇报道则提出了不同的结论. COX-2在仅有原发灶、伴淋巴结转移、伴肝转移的手术标本中阳性率分别为70.8%、92.0%、100%, 并且与肿瘤大小、浸润深度、分期、淋巴结转移显著相关, COX-2阳性的患者生存时间显著缩短, 故而COX-2可作为估计患者预后的一个独立指标^[39]. 到底COX-2对于推动肿瘤后期的发展是否有重要作用, 还是仅仅在肿瘤初期起作用, 还需要进行进一步研究.

COX-2不仅是启动炎症反应的关键酶, 且是肿瘤形成过程中的关键酶. 由于COX-1仅在细胞外网状结构中起作用而COX-2在细胞外网状结构和细胞核膜及核周区域均起作用, 因此

■应用要点

本文总结了目前有关该领域的最新研究成果, 有助于读者了解该领域发展及所要解决的问题, 为进一步探索指明方向.

■名词解释

COX: 有COX-1和COX-2两种同工酶。前者为结构型, 主要存在于正常的血管、胃、肾等组织中, 在溃疡性结肠炎组织中表达与正常对照无显著差异, 参与血管收缩、血小板聚集、胃黏膜血流、胃黏液分泌及肾功能调节。后者为诱导型, 与炎症有密切联系, 可以被多种炎症递质和细胞因子所诱导。

似乎COX-2催化产生的前列腺素更容易进入核内, 调节靶基因的转录, 改变细胞某些增殖和凋亡相关基因的表达, 促进肿瘤的形成。首先在结直肠癌中COX-2的过量表达与肿瘤血管形成(angiogenesis)有关, COX-2的表达程度与肿瘤微小血管的密度成正相关($P = 0.02$), 且与血管内皮生长因之VEGF有很好相关性($P = 0.004$), 已知VEGF是一种介导血管新生的重要介质^[40]。而肿瘤新生血管的形成对癌肿的发生发展都有重要的意义。

其次, 对小鼠模型研究发现COX-2的过量表达能引起肠上皮细胞的表形改变(phenotypic changes), 这些表型包括与细胞外基质黏附能力增强以及抗凋亡^[41], 其中APC是个抑癌基因, 与细胞周期和凋亡密切相关, APC变异在溃疡性结肠炎恶变中属于晚期事件, 而在散发性结肠癌中则为较早出现的分子事件, APC敲除小鼠是家族性腺息肉病的研究模型。APC基因敲除的杂合小鼠会产生大量表达COX-2的息肉, 而APC基因敲除的杂合小鼠同时中断(disrupt)COX-2基因会使息肉数量大大减少^[42], 这提示了COX-2与APC基因是导致恶变的同一条路径上的分子。

Sheng *et al*^[43]在研究中发现炎症介质LTD4和LTB4可使结肠细胞COX-2水平明显上调, PGs随之增多, 改变了正常结肠细胞中Bcl-2的分布, 并使Bcl-2水平升高。其主要机制是通过阻止BAD/BAX所诱导的线粒体膜外孔道的形成, 影响了细胞凋亡的负调整, 使细胞凋亡受抑制, 进而诱导肿瘤形成。这一结果间接表明COX-2代谢产物PGs在介导Bcl-2产生, 在细胞凋亡中发挥了作用, 而COX-2水平升高及Bcl-2水平上调很可能成为UC癌变的早期诊断标志。此后该小组又进一步研究证实了prostaglandin E2阻止了细胞凋亡并介导了Bcl-2表达^[44], 最新研究^[45]提示通过抑制COX-2, prostaglandin E2可被抑制进而阻止肿瘤发生发展。

以上曾谈到COX-2与NF- κ B能建立起正反馈自我调节环路, NF- κ B不仅在控制与炎症反应有关的基因表达中起作用, 而且是控制细胞增殖和凋亡的重要途径。由NF- κ B直接活化的抗细胞凋亡基因包括TNF受体相关因子(TNF和TRAF2)、Bcl-2同源体(A1/Bcl-1和IEX-1L)。TNF- α 诱导的细胞中TRAF1、TRAF2过度表达阻断了启动蛋白酶Caspase-8的活化作用, 使其丧失了早期激活细胞凋亡的作用。NF- κ B还能通过附着于A1/Bcl-1启动子的特定位置诱导其表

达, 进而抑制B淋巴细胞中抗原受体介导的细胞凋亡, 促进肿瘤细胞的增殖。同时, 在癌细胞核内有诱导作用的PPAR γ 受体可发生突变, 丧失其抑制NF- κ B活性的作用, 加速某些凋亡抑制基因的转录, 在细胞癌变的早期发挥作用。

关于溃疡性结肠炎相关性结肠癌中COX-2表达情况目前研究较少, Shattuck Brandt RL在小鼠模型中发现, 在IL-10(-/-)肿瘤和有炎症但大体观未见肿瘤的区域发现COX-2 mRNA和蛋白表达增高, 其中IL-10(-/-)小鼠是炎症性肠病和溃疡相关性大肠癌的良好研究模型, COX-2表达主要位于肿瘤溃疡区域的炎症细胞中, 但与前面所述一些研究不相符的是, 在肿瘤来源的上皮细胞中检测不到COX-2的表达, Oshima *et al*的研究^[42]也显示了COX-2表达位于间质细胞, APC敲除小鼠的COX-2基因座位用细菌lacZ基因替代, 结果LacZ表达出现在息肉间质细胞而非息肉上皮细胞中, COX-2表达还与肿瘤中表达 α -平滑肌肌动蛋白的区域有相关性, α -平滑肌肌动蛋白是上皮成肌纤维细胞(myofibroblast)的分子标志, COX-2的表达与上皮成肌纤维细胞的相关性在其他模型小鼠中也可见^[46]。成肌纤维细胞可能与组织对肿瘤侵袭的免疫反应有关。

Agoff *et al*直接检测溃疡相关大肠癌手术标本发现, COX-2在腺癌、高度不典型增生、中度不典型增生、低度不典型增生、未确定型和无不典型增生中表达的概率分别为: 83%, 100%, 100%, 60%和25%($P < 0.0001$, $RR = 0.53$), 不典型增生改变解释了53%的COX-2改变, 而炎症反应只解释了11%, COX-2在所有出现非整倍体现象的组织中表达都升高, 但仅在38%的二倍体样本中升高, 这说明了COX-2过量表达不仅仅用炎症来解释, 还与溃疡相关性不典型增生有一定关系^[47]。

此外, 5-ASA减少溃疡癌变发生率最直接到证据来自Fernando于2006年发表在*Gastroenterology*上的1篇文章, 该病例对照研究控制了诸如病程和病变范围等影响因素, 结果发现5-SAS能显著降低癌变率($OR = 0.2$, $P < 0.05$), 但该研究没有回答COX-2途径在其中所起的作用, 其所纳入研究的为三级医疗中心的患者, 样本选择上可能存在一定偏差。以往的多项研究结果与之相符^[48-49]。而来自2007年的一项研究则否定了这种作用^[50]。结论不一致可能与5-SAS本身复杂的药理作用有关, 再者所进行的研究还比较初步, 未能提供大规模的临床研究数据。

总之, COX-2在癌变过程中起到了一定作

用,但并不是唯一的一条通路,在溃疡性结肠炎中初步研究表明两者存在一定相关性,但具体的作用机制尚不明确。在临床上是否可以使用特异性COX-2抑制剂来预防溃疡性结肠炎患者发生癌变,这就需要处理好一个矛盾,即COX-2的产生是机体自我保护的一种机制,促进损伤组织增生修复,这必然会激活许多癌基因,一旦失控就很容易发生癌变。因此如何正确处理好该矛盾是处理溃疡性结肠炎患者的关键。

3 结论

COX-2在溃疡性结肠炎的发生及预后有着重要的作用,首先表现在启动炎症反应过程,在各种遗传因素及致炎环境因子的共同作用下,COX-2表达显著升高,表现为在溃疡组织中的表达显著升高,启动肠道黏膜的炎性损伤。然而在炎症反应的修复期,抑制COX-2则表现为使修复受阻,病情加重。另外COX-2介导的组织修复也需要在一定的严密系统调控下才能正常进行,在各种未知因素的作用下,这个平衡被打破,就有可能出现不典型增生,最终导致癌的发生。

4 参考文献

- Potter JD, Ulrich CM. COX-2 and gastric cancer: More on inflammation and neoplasia. *Gastroenterology* 2006; 130: 2198-2200
- Paiotti AP, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CT, Miszputen SJ, Franco M. Immunoeexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 911-918
- Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; 98: 2076-2085
- Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1170-1173
- Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, de la Lastra CA. Rosiglitazone, a PPARgamma ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 562: 247-258
- Oh PS, Lim KT. Plant originated glycoprotein has anti-oxidative and anti-inflammatory effects on dextran sulfate sodium-induced colitis in mouse. *J Biomed Sci* 2006; 13: 549-560
- Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 297-306
- Li MH, Jang JH, Surh YJ. Nitric oxide induces apoptosis via AP-1-driven upregulation of COX-2 in rat pheochromocytoma cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 890-899
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82
- Hughes FJ, Buttery LD, Hukkanen MV, O'Donnell A, MacLough J, Polak JM. Cytokine-induced prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase-2 activity are regulated both by a nitric oxide-dependent and -independent mechanism in rat osteoblasts in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274: 1776-1782
- Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Kumar D, Raviprakash V, Kataria M. Influence of simultaneous inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in experimental colitis in rats. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 188-195
- Cox DG, Crusius JB, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Pena AS, Canzian F. Haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6003-6008
- Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G238-G244
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3228-3232
- Weymer A, Huott P, Liu W, McRoberts JA, Dharmasathaphorn K. Chloride secretory mechanism induced by prostaglandin E1 in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 1985; 76: 1828-1836
- Wallace JL. Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 971-980
- Okayama M, Hayashi S, Aoi Y, Nishio H, Kato S, Takeuchi K. Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2095-2103
- Matuk R, Crawford J, Abreu MT, Targan SR, Vasiliasauskas EA, Papadakis KA. The spectrum of gastrointestinal toxicity and effect on disease activity of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 352-356
- Calvo N, Iversen E, Munck LK. [Intestinal side effects of COX-2 inhibitors] *Ugeskr Laeger* 2006; 168: 1343-1344
- El Miedany Y, Youssef S, Ahmed I, El Gaafary M. The gastrointestinal safety and effect on disease activity of etoricoxib, a selective cox-2 inhibitor in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 311-317
- Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 910-914
- Sandborn WJ, Stenson WF, Brynskov J, Lorenz RG, Steidle GM, Robbins JL, Kent JD, Bloom BJ. Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: a randomized, placebo-controlled, pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 203-211
- Reinisch W, Miehsler W, Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Lichtenberger C, Vogelsang H. An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1371-1380
- Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, Bjornsson

■同行评价

本文选题较好,内容全面,语言流畅,具有一定的学术价值。

- E, Bjarnason I. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 196-202
- 25 Sandborn WJ, Stenson WF, Brynskov J, Lorenz RG, Steidle GM, Robbins JL, Kent JD, Bloom BJ. Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: a randomized, placebo-controlled, pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 203-211
- 26 Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanus A, Konstam MA, Baron JA. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005; 352: 1092-1102
- 27 Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnoli M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 2005; 352: 1071-1080
- 28 Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Lucas S. Why do patients with ulcerative colitis relapse? *Gut* 1990; 31: 179-183
- 29 O'Brien J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1859-1861
- 30 Inoue T, Murano M, Abe Y, Morita E, Murano N, Yasumoto S, Toshina K, Nishikawa T, Maemura K, Hirata I, Katsu K. Therapeutic effect of nimesulide on colorectal carcinogenesis in experimental murine ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1474-1481
- 31 Liu ES, Ye YN, Shin VY, Wu WK, Wong BC, Cho CH. Interaction of cigarette smoking with cyclooxygenase-2 on ulcerative colitis-associated neoplasia in mice. *Cancer Invest* 2007; 25: 750-757
- 32 Kotakadi VS, Jin Y, Hofseth AB, Ying L, Cui X, Volate S, Chumanevich A, Wood PA, Price RL, McNeal A, Singh UP, Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Matesic LE, Auclair K, Wargovich MJ, Hofseth LJ. Ginkgo biloba extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1799-1806
- 33 Takeda J, Kitajima K, Fujii S, Horiuchi H, Hori H, Chibana Y, Okuyama T, Tominaga K, Ichikawa K, Ono Y, Teramoto T, Ohkura Y, Imura J, Shinoda M, Chiba T, Sakamoto C, Kawamata H, Fujimori T. Inhibitory effects of etodolac, a selective COX-2 inhibitor, on the occurrence of tumors in colitis-induced tumorigenesis model in rats. *Oncol Rep* 2004; 11: 981-985
- 34 Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-412
- 35 Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007; 356: 2131-2142
- 36 Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grösch S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1469-1478
- 37 Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188
- 38 Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Macclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 187: 295-301
- 39 Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471
- 40 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 1339-1347
- 41 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501
- 42 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803-809
- 43 Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-2259
- 44 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-366
- 45 Banning A, Florian S, Deubel S, Thalmann S, Müller-Schmehl K, Jacobasch G, Brigelius-Flohé R. GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1491-1500
- 46 Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 337-345
- 47 Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA, Taylor SL, Raaka S, Haggitt RC, Reed MW, Afonina IA, Rabinovitch PS, Stevens AC, Feng Z, Bronner MP. The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* 2000; 157: 737-745
- 48 Velayos FS, Loftus EV Jr, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* 2006; 130: 1941-1949
- 49 van Staa TP, Card T, Logan RF, Leufkens HG. 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut* 2005; 54: 1573-1578
- 50 Terdiman JP, Steinbuch M, Blumentals WA, Ullman TA, Rubin DT. 5-Aminosalicylic acid therapy and the risk of colorectal cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 367-371

血容量失血40%大鼠早期口服补液时胃排空率的变化及其影响因素

周国勇, 侯经文, 张立俭, 胡森, 盛志勇

周国勇, 侯经文, 张立俭, 胡森, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所 北京市 100037
军队“十一五”科研计划专项课题资助项目, No. 06Z055
作者贡献分布: 此课题由胡森与周国勇设计; 研究过程由周国勇、侯经文及张立俭操作完成; 研究用试剂及分析工具由胡森提供; 数据分析由周国勇完成; 本文写作由周国勇、胡森及盛志勇完成。

通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室。hs82080@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989391

收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-10-07

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Influencing factors for gastric emptying rate during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss

Guo-Yong Zhou, Jing-Yuan Hou, Li-Jian Zhang, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng

Guo-Yong Zhou, Jing-Yuan Hou, Li-Jian Zhang, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Supported by: the Special Foundation of the 11th Five-year Plan for Military Medical Project, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-22 Revised: 2008-10-07

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To observe the changes of plasma nitrogen monoxidum (NO), motilin (MTL) content and gastric emptying (GE) rate and to investigate the relationship between NO, MTL content and GE during early oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss.

METHODS: Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group (GES group, $n = 8$), hemorrhage with no resuscitation group (H group, $n = 8$) and hemorrhage with oral administration of a glucose-

electrolyte solution group (H + GES group, $n = 8$). Rats of H group and H + GES group were subjected to a 40% hemorrhagic injury from the right common carotid artery, while GES group only to a ligation of the artery. GES was intra-gastrically administrated with a total amount double of blood loss at 0.5 h and 1 h post-hemorrhage in GES group and H + GES group. Rats were sacrificed 4 h after hemorrhage/operation and blood samples were harvested for evaluation of plasma NO and MTL contents. Gastric emptying rates (GE) were determined using method of phenol red emptying.

RESULTS: Gastric emptying rate was significantly lower in H + GES group than in GES group. ($62.4\% \pm 11.4\%$ vs $92.4\% \pm 12.5\%$, $P < 0.01$). The plasma NO level was significantly higher ($105.7 \pm 13.2 \mu\text{mol/L}$ vs $53.6 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$, $75.4 \pm 10.5 \mu\text{mol/L}$, both $P < 0.01$) but plasma MTL content was significantly lower in H + GES group than in GES group or than in H group ($72.5 \pm 14.3 \text{ ng/L}$ vs $132.3 \pm 24.1 \text{ ng/L}$, $95.7 \pm 15.5 \text{ ng/L}$, both $P < 0.01$). Gastric emptying rate was negatively correlated with plasma NO content but positively correlated with plasma MTL content ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The results indicate that gastric emptying rate is lowered after early oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss, which might be caused by the increased plasma NO content and decreased plasma MTL content during hemorrhagic shock.

Key Words: Hemorrhage; Oral fluid resuscitation; Gastric emptying rate; Nitrogen monoxidum; Motilin

Zhou GY, Hou JY, Zhang LJ, Hu S, Sheng ZY. Influencing factors for gastric emptying rate during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3539-3542

摘要

目的: 观察40%血容量失血大鼠模型早期口服

■背景资料

口服液体复苏是战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下产生大批创伤伤员, 液体供应受限和(或)救治条件恶劣等原因难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施。休克时胃肠道处于严重缺血缺氧状态, 口服补液在发挥快速复苏作用的同时, 往往伴有胃排空及肠吸收功能的下降, 严重影响了口服复苏的效果。胃排空是口服复苏的首要限制因素, 一氧化氮(NO)、胃动素(MTL)是胃排空的主要影响因素。

■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

■相关报道

车晋伟 *et al* 通过比较口服液体复苏与静脉液体复苏的效果发现, 对小于35%体表面积的烧伤犬模型给予早期口服补液, 虽然血流动力学恢复滞后于静脉补液, 但在提高血容量和尿量、降低死亡率等方面完全可以达到与静脉补液相似的效果。

补液时胃排空(GE)率的变化及其与血浆一氧化氮(NO)、胃动素(MTL)水平的关系。

方法: ♂ SD大鼠24只, 随机分为假手术+葡萄糖-电解质溶液(GES)组(GES组, $n = 8$)、单纯失血组(H组, $n = 8$)、失血+GES组(H+GES组, $n = 8$)。氯胺酮-速眠新Ⅱ肌注复合麻醉后, 行右侧颈总动脉插管, H组和H+GES组按全身血容量的40%分2次间隔15 min放血, GES组不予放血。GES组和H+GES组大鼠在手术或失血后0.5 h及1 h分2次灌胃给予总计2倍预计放血量的GES。失血后4 h腹主动脉取血处死动物, 检测血浆NO和MTL水平, 酚红法测定胃排空率。

结果: 失血后4 h H+GES组胃排空率显著低于GES组($62.4\% \pm 11.4\%$ vs $92.4\% \pm 12.5\%$, $P < 0.01$)。H+GES组血浆NO水平显著高于GES组与H组($105.7 \pm 13.2 \mu\text{mol/L}$ vs $53.6 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$, $75.4 \pm 10.5 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.01$)。MTL含量显著低于GES组与H组($72.5 \pm 14.3 \text{ ng/L}$ vs $132.3 \pm 24.1 \text{ ng/L}$, $95.7 \pm 15.5 \text{ ng/L}$, 均 $P < 0.01$)。胃排空率与血浆NO水平呈负相关, 与MTL水平呈正相关($P < 0.01$)。

结论: 大鼠40%血容量失血早期口服补液时胃排空率降低, 其机制可能为失血性休克时血浆NO水平升高及MTL水平降低等因素有关。

关键词: 失血; 口服补液; 胃排空率; 一氧化氮; 胃动素

周国勇, 侯经元, 张立俭, 胡森, 盛志勇. 血容量失血40%大鼠早期口服补液时胃排空率的变化及其影响因素. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3539-3542

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3539.asp>

0 引言

口服液体复苏是主要针对战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下产生大批创伤伤员, 液体供应受限和(或)救治条件恶劣等原因难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施^[1-2]。但前期研究发现, 休克时胃肠道处于严重缺血缺氧状态, 口服补液在发挥快速复苏作用的同时, 往往伴有胃排空及肠吸收功能的下降, 严重影响了口服复苏的效果^[3-4]。本文观察40%血容量失血大鼠早期口服补液过程中胃排空率的变化及其与血浆一氧化氮、胃动素水平的关系, 初步探讨失血性休克早期口服复苏时胃排空功能变化的机制, 为减轻失血性休克早期口服补液引起的胃肠道并发症治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠24只, 50-60日龄, 体质量210-230 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。葡萄糖-电解质溶液(GES)配方^[5]: 每1 L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO₃、1.5 g KCl和20 g葡萄糖, 使用前置于37℃恒温水浴箱预热。一氧化氮(NO)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 胃动素检测试剂盒由北京华英生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组: 大鼠购入后适应性喂养1 wk, 术前禁食18-20 h, 禁水2 h。大鼠称质量后用氯胺酮-速眠新Ⅱ im麻醉(0.5 mL/kg体质量)后, 消毒颈部皮肤, 取右侧切口打开, 分离结扎右侧颈总动脉, 于近端插管, 按大鼠全身血容量的40%(65 mL/kg体质量^[6])间隔15 min分2次放血, 每次于5 min内放完。放血完毕结扎动脉近端, 缝合皮肤。放血完成后0.5 h及1 h在大鼠清醒状态下进行灌胃。随机分为假手术组(GES, $n = 8$)、单纯失血组(H, $n = 8$)、失血+GES(H+GES, $n = 8$)。GES组结扎右侧颈动脉后不予放血; GES组和H+GES组手术或放血后30 min及1 h用大鼠灌胃针对动物进行GES液口服补液, H组失血后不予补液。拟复苏总补液量为失血总量的3倍, 本实验4 h过程中按2倍分2次给予。

1.2.2 血浆NO和MTL含量检测: 动物失血后4 h腹主动脉取血, 3000 r/min离心10 min取血浆-40℃冻存待测。硝酸还原酶法检测NO含量; 放射免疫法检测胃动素含量, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.3 胃排空率测定: GES组和H+GES组动物于伤后4 h处死, 以酚红为指示剂, 按Scarpignato *et al*的方法^[7]测定胃排空率。

统计学处理 实验数据采用SPSS11.0统计软件处理, 结果以mean±SD表示, 进行t检验和相关与回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆NO和MTL含量 H+GES组血浆NO含量($105.7 \pm 13.2 \mu\text{mol/L}$)显著高于GES组($53.6 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$)和H组(75.4 ± 10.5 , $P < 0.01$, 图1A)。H+GES组血浆MTL含量($72.5 \pm 14.3 \text{ ng/L}$)显著低于GES组($132.3 \pm 24.1 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$)和H组($95.7 \pm 15.5 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$, 图1B)。

2.2 胃排空率(GE) H+GES组4 h胃排空率($62.4\% \pm 11.4\%$)显著低于GES组($92.4\% \pm 12.5\%$),

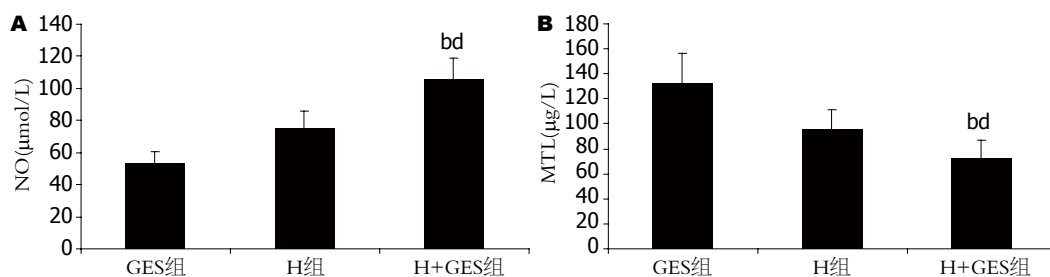


图1 40%血容量失血大鼠各组血浆NO及MTL含量变化. A: NO; B: MTL. ^b $P<0.01$ vs GES组; ^d $P<0.01$ vs H组.

■应用要点

40%血容量失血口服液体复苏时,胃排空率显著降低,其机制可能为NO水平的升高及MTL水平的降低.此机制的阐明有助于休克胃肠道并发症的针对性治疗.

$P<0.01$). 相关与回归分析显示,胃排空率与血浆NO含量呈负相关($r = -0.936$),与血浆MTL含量呈正相关($r = 0.975$, $P<0.01$).

3 讨论

口服补液是在战争或突发事件及灾害时救治创伤、烧伤休克液体复苏的重要途径^[1]. 在这些环境中,往往产生大量伤病员,且环境条件不足,静脉复苏受到极大限制;口服液干粉携带方便,加水即可制成口服溶液,对无菌条件要求也不高,是战伤急救一个重要的替代急救措施. 车晋伟 *et al*^[8]通过比较口服液体复苏与静脉液体复苏的效果发现,对小于35%体面积的烧伤犬模型给予早期口服补液,虽然血流动力学恢复滞后于静脉补液,但在提高血容量和尿量、降低死亡率等方面完全可以达到与静脉补液相似的效果. 口服液成分以葡萄糖-电解质溶液(因受到世界卫生组织推荐,称WHO ORS液)效果最好.

国内外研究表明,胃排空是口服液体复苏的主要限制性因素. 机体发生休克时,胃肠等消化器官作为首先牺牲的器官,其组织血流量显著降低^[9-10]. 其作用在于机体为满足重要生命脏器的血液供应,血流发生重新分布,胃肠道血流量减少、胃肠组织细胞缺血缺氧^[11]. 此时通过口服补充大量液体,吸收后虽然能迅速恢复消化系统局部及全身灌注,有效改善烧伤休克的脏器功能和循环指标;但另一方面,能造成消化器官局部的缺血-再灌注效应,进一步加重了组织损伤,从而导致胃肠道排空和消化功能障碍,严重影响了口服补液的治疗效果. 本试验的目的在于观察失血性休克大鼠口服补液时胃排空率和可能与之相关的影响因素的变化,研究他们之间存在的关系,探讨失血性休克时胃排空功能降低的机制.

NO是一种新型的神经递质,对体内多个器官均有作用,参与众多生理和病理过程^[12]. Yoneda *et al*^[13]研究发现,NO可以抑制由胆碱能

神经刺激诱发的胃底平滑肌细胞的收缩. 本研究结果显示,大鼠失血40%发生低血容量性休克时,血浆NO含量显著升高,且与胃排空率呈负相关,是此时胃排空率下降的可能原因之一.

MTL是重要的脑肠肽激素,其生理功能是促进胃肠运动. MTL的不足导致胃肠平滑肌松弛、胃张力及蠕动减弱、胃排空时间延长、胃液滞留增加^[14-15]. 本实验结果表明,大鼠发生失血性休克时,血浆MTL水平明显降低,与胃排空率呈正相关,亦可能是胃排空率下降的影响因素之一.

机体发生失血性休克时,体内多种神经递质及激素水平紊乱,从而引发各脏器的功能障碍,而早期发生的胃肠道功能障碍严重影响了口服补液的复苏效果. 本实验初步探讨了其发生机制,进一步实验的重点应在于研究如何通过药物及其他手段,改善胃肠道功能,促进口服补液复苏效果.

4 参考文献

- 1 Thomas SJ, Kramer GC, Herndon DN. Burns: military options and tactical solutions. *J Trauma* 2003; 54: S207-S218
- 2 车晋伟, 胡森, 盛志勇. 烧(创)伤休克战地液体复苏研究进展. *解放军医学杂志* 2007; 32: 271-273
- 3 胡森, 郝波, 车晋伟, 耿世佳, 吴静, 杜颖, 盛志勇. 卡巴胆碱对大鼠烧伤休克早期口服补液时胃排空和胃血流量的影响. *解放军医学杂志* 2007; 32: 1252-1253
- 4 林凯, 车晋伟, 任青华, 黎君友, 马诺山, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对烧伤休克犬口服补液时胃肠功能和循环指标的影响. *感染、炎症、修复* 2008; 9: 9-12
- 5 Rudolph CD, Rudolph AM, Hostetter MK, Lister G, Siegel NJ. *Rudolph's pediatrics*. 21st ed. New York: McGraw-Hill, 2003: 1364-1365
- 6 施新猷. *医学动物实验方法*. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 408
- 7 Scarpignato C, Capovilla T, Bertaccini G. Action of caerulein on gastric emptying of the conscious rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980; 246: 286-294
- 8 车晋伟, 胡森, 王国强, 杜颖, 耿世佳, 吴静, 盛志勇. 早期口服补液对35% TBSA烧伤犬血流动力学和后期脏器功能的影响. *解放军医学杂志* 2008; 33: 643-645
- 9 Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J*

■同行评价

本文选题结合临床较强,研究方法科学合理,结论与讨论对临床有一定的指导性。

- 10 刘春峰, 袁壮. 内脏缺血缺氧代谢障碍在SIRS和MODS中的作用. *小儿急救医学* 2000; 7: 180-182
- 11 盛志勇, 胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京: 科学出版社, 1999: 20-21
- 12 Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-195
- 13 Yoneda S, Suzuki H. Nitric oxide inhibits smooth muscle responses evoked by cholinergic nerve stimulation in the guinea pig gastric fundus. *Jpn J Physiol* 2001; 51: 693-702
- 14 Siadati M, Sarr MG. Role of extrinsic innervation in release of motilin and patterns of upper gut canine motility. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 363-372
- 15 Luiking YC, Peeters TL, Stolk MF, Nieuwenhuijs VB, Portincasa P, Depoortere I, van Berge Henegouwen GP, Akkermans LM. Motilin induces gall bladder emptying and antral contractions in the fasted state in humans. *Gut* 1998; 42: 830-835

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 2008-11-08)

复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响

刘东璞, 卢凤美, 张春斌

刘东璞, 卢凤美, 张春斌, 黑龙江省佳木斯大学基础医学院病理教研室 黑龙江省佳木斯市 154007
黑龙江省卫生厅科研资助项目, No. 2006-337
黑龙江省科技攻关资助项目, No. PC06S15
作者贡献分布: 刘东璞与卢凤美对此文所作贡献均等; 此课题由刘东璞, 卢凤美及张春斌共同设计; 研究过程由刘东璞, 卢凤美及张春斌操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张春斌提供; 数据分析由刘东璞与卢凤美完成; 本论文写作由刘东璞与卢凤美完成。
通讯作者: 张春斌, 154007, 黑龙江省佳木斯市, 黑龙江省佳木斯大学基础医学院病理教研室. lufengmei200520136@163.com
电话: 0454-8618518
收稿日期: 2008-09-25 修回日期: 2008-10-16
接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-08

Effect of Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase1 in fibrotic liver in rats

Dong-Pu Liu, Feng-Mei Lu, Chun-Bin Zhang

Dong-Pu Liu, Feng-Mei Lu, Chun-Bin Zhang, Department of Pathology, Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Scientific Research Foundation from Health Department of Heilongjiang Province, No. 2006-337, and the Key Science and Technology Program of Heilongjiang Province, No. PC06S15
Correspondence to: Chun-Bin Zhang, Department of Pathology, Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China. lufengmei200520136@163.com
Received: 2008-09-25 Revised: 2008-10-16
Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To observe the change of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) expression in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats after treatment with Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* (CHCRS).

METHODS: Eighty healthy male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n = 16$, for each group): normal group, fibrosis group, CHCRS-treated groups (using high-, middle- and low-dose CHCRS, respectively). Liver fibrosis was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (for 8 wk). CHCRS was given intraga-

trically twice a week while fibrosis was induced. Animals were sacrificed at the end of experiment. Histological examinations were performed after hematoxylin and eosin staining, and the fibrosis was classified into stage 0 to 4. The level of hepatic TIMP-1 mRNA was determined by semi-quantitative RT-PCR, and the expression of TIMP-1 protein was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The extent of liver fibrosis was above the 3rd stage in most model animals, but in CHCRS-treated rats, it was obviously degraded as compared with that in the model group. The level of hepatic TIMP-1 mRNA was significantly higher in the model group than that in the normal group (0.858 ± 0.052 vs 0.615 ± 0.067 , $P < 0.05$), but it was markedly lower in the CHCRS-treated groups than that in the model group (0.740 ± 0.081 , 0.704 ± 0.032 , 0.695 ± 0.030 ; all $P < 0.05$). Immunohistochemistry showed a significant increase of TIMP-1 in the model group as compared with that in the normal group (0.356 ± 0.052 vs 0.121 ± 0.067 , $P < 0.05$), but a notable decrease in the CHCRS-treated groups as compared with that in the model group (all $P < 0.05$). Meanwhile, the positive expression of TIMP-1 in liver tissues of CHCRS-treated groups was still stronger than that in the normal group (0.298 ± 0.08 , 0.256 ± 0.032 , 0.213 ± 0.030 ; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: CHCRS can effectively inhibit the expression of TIMP-1 in CCl₄-induced fibrotic liver in rats.

Key Words: Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis*; Liver fibrosis; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Liu DP, Lu FM, Zhang CB. Effect of Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase1 in fibrotic liver in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3543-3546

摘要

目的: 探讨复方红景天对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化肝组织TIMP-1基因表达的影响。

■背景资料

中药复方红景天通过多年的基础与临床研究被证实具有抗慢性肝炎肝纤维化作用。本实验旨在观察复方红景天对CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型胶原代谢的影响。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■ 研发前沿

中药复方红景天有多层次、多靶位抗肝纤维化作用的特点,但该中药复方红景天对于纤维化肝组织中TIMP-1的表达如何影响,尚无深入的报道。

方法:健康♂SD大鼠80只随机分组:(1)正常对照组;(2)肝纤维化模型组;(3)复方红景天高剂量组(H组);(4)复方红景天中剂量组(M组);(5)复方红景天低剂量组(S组),每组16只。以CCl₄ ip法诱导大鼠肝纤维化,复方红景天干预组大鼠在造模的同时给予复方红景天灌胃,正常对照组给予橄榄油sc和生理盐水ip, 8 wk实验结束时处死动物,留取的肝脏组织做HE按0-4期标准判定肝纤维化程度,应用半定量RT-PCR检测肝组织中TIMP-1 mRNA的表达情况,用免疫组化检测肝组织中TIMP-1的表达。

结果:模型组大鼠肝纤维化程度处于2-4期,其中大部分达3期以上,复方红景天干预组大鼠肝纤维化程度明显减轻,只有少部分达3期。模型组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA水平高于正常对照组(0.858 ± 0.052 vs 0.615 ± 0.067 , $P < 0.05$),而复方红景天干预组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA水平(0.740 ± 0.081 , 0.704 ± 0.032 , 0.695 ± 0.030)显著低于模型组(均 $P < 0.05$);模型组大鼠肝组织TIMP-1的阳性表达显著强于正常对照组(0.356 ± 0.052 vs 0.121 ± 0.067 , $P < 0.05$),复方红景天干预组肝组织中TIMP-1的阳性表达(0.298 ± 0.081 , 0.256 ± 0.032 , 0.213 ± 0.030)明显强于正常对照组(均 $P < 0.05$),但较模型组显著减弱($P < 0.05$)。

结论:中药复方红景天能有效抑制CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝脏中TIMP-1的表达。

关键词: 复方红景天; 肝纤维化; TIMP-1; 免疫组化; 逆转录-聚合酶链反应

刘东璞, 卢凤美, 张春斌. 复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3543-3546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3543.asp>

0 引言

基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)是肝纤维化过程中的关键因子,具有抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性的功能,他可与MMPs非共价结合而抑制其活性,也可与酶原结合阻止其活化。MMPs活性受抑,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解减少,在肝内过度沉积,形成肝纤维化,因而TIMPs在肝组织中的表达水平可以反映肝组织学纤维化程度^[1-2],本文以CCl₄中毒性大鼠肝纤维化为模型,我们应用反义寡核苷酸技术及免疫组化技术,以金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)为靶基因,检测

TIMP-1表达水平,观察复方红景天对CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型胶原代谢的影响,以进一步揭示复方红景天的抗肝纤维化机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠80只,体质量180-220 g,由佳木斯大学实验动物中心提供。四氯化碳(CCl₄)购自天津石英钼厂霸州市化工厂分厂。复方红景天胶囊购自福州恒丰量子生物科技有限公司。组织RNA提取试剂盒及逆转录试剂盒为立陶宛MBI公司产品。TIMP-1上下游引物及兔抗大鼠TIMP-1的一抗由上海生物工程公司生产。辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫组化通用型羊抗兔的二抗工作液由北京中山生物技术有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组:健康♂SD大鼠80只随机分为5组:(1)正常对照组;(2)肝纤维化模型组;(3)复方红景天高剂量组(H组);(4)复方红景天中剂量组(M组);(5)复方红景天低剂量组(S组)。每组16只,各组间暴露因素无差别($P > 0.05$)。用CCl₄ ip法诱导大鼠肝纤维化模型,即用100 mL/L CCl₄(橄榄油稀释)1 mL/kg,每周1次,共8 wk。复方红景天干预组在造模的同时给予复方红景天ig(浓度60 g/L、40 g/L、20 g/L,剂量10 mL/kg,每周2次,共8 wk),肝纤维化模型组造模同时予生理盐水ig,正常对照组予等量橄榄油和生理盐水ig处理。各组大鼠在最后一次CCl₄注射后48 h处死,部分肝脏用40 g/L甲醛固定,留做病理检查,其余标本迅速放到-80℃冰箱保存。

1.2.2 常规病理学检查:病理学切片用HE染色,按2000年在西安会议上由中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会联合修订的慢性肝炎分级分期标准判定肝纤维化程度^[3]。

1.2.3 RT-PCR检测肝组织中TIMP-1 mRNA: TRIzol一步法提取组织总RNA,总RNA反转录成cDNA,PCR反应。取10 μL PCR扩增产物加入25 g/L溴乙锭琼脂糖凝胶中,以80 V/cm电压电泳50 min,在紫外线下可见相应的长度的目的基因和内参的扩增条带,将电泳结果直接置于凝胶分析系统对条带进行分析。根据GenBank数据库,应用Primer-3软件设计目的基因的扩增引物:TIMP-1:上游:5'-CTT CCA CAG GTC CCA CAA-3',下游:5'-CAG CCC TGG CTC CCG AGG-3',长度238 bp; GAPDH:上游:5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA-3',下游:5'-AGG

表 1 肝组织TIMP-1 mRNA的变化 (mean $\pm$ SD, $n = 16$)

分组	干预前	干预后
正常对照组	0.587 $\pm$ 0.058	0.615 $\pm$ 0.067 ^a
模型组	0.586 $\pm$ 0.042	0.858 $\pm$ 0.052 ^a
S组	0.587 $\pm$ 0.031	0.740 $\pm$ 0.081 ^c
M组	0.588 $\pm$ 0.042	0.704 $\pm$ 0.032 ^c
H组	0.590 $\pm$ 0.032	0.695 $\pm$ 0.030 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。表 2 肝组织TIMP-1表达的变化 (mean $\pm$ SD, $n = 16$)

分组	干预前	干预末
正常对照组	0.093 $\pm$ 0.058	0.121 $\pm$ 0.067 ^c
模型组	0.099 $\pm$ 0.042	0.356 $\pm$ 0.052 ^a
S组	0.096 $\pm$ 0.031	0.298 $\pm$ 0.081 ^c
M组	0.095 $\pm$ 0.042	0.256 $\pm$ 0.032 ^c
H组	0.094 $\pm$ 0.032	0.213 $\pm$ 0.030 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

■ 相关报道

以往大量实验表明, 中药具有保护肝细胞, 改善肝功能, 抑制肝星状细胞的活化增殖, 促进细胞外基质的降解作用, 在促进肝纤维化逆转方面显示了其较大的优势, 倍受国内外专家、学者的关注。

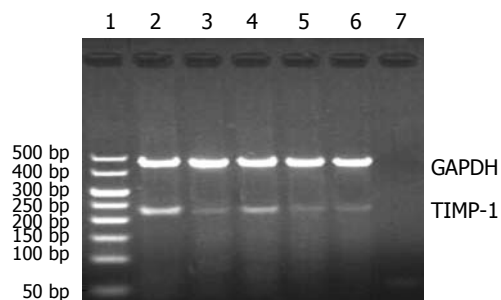


图 1 肝组织中TIMP-1 mRNA表达的动态变化。1: DNA Marker; 2: 模型组; 3: 正常对照组; 4: 复方红景天低剂量组; 5: 复方红景天中剂量组; 6: 复方红景天高剂量组; 7: 电泳空白对照; GAPDH与TIMP-1均不表达。

GGT CTA CAT GGC AAC TG-3', 长度500 bp. 采用25 μ L的反应体系. 其中GAPDH与目的基因的引物浓度均为1 μ mol/L. 反应条件分别是: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 28个循环(经多次预试验摸索最佳实验条件); 72 $^{\circ}$ C 7 min; PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用Bio-Rad Gel Doc2000型凝胶成像系统照像并用Quangtity One软件计算基因相对表达值。

1.2.4 免疫组化检测肝组织中TIMP-1: 用3', 3-二氨基联苯胺(DAB)二步法检测肝组织中TIMP-1, 具体方法如下: 石蜡切片经常规脱蜡至水. 用30 mL/L H₂O₂消除内源性过氧化氢酶. 以柠檬酸盐工作缓冲液微波热修复. 用100 mL/L正常山羊血清封闭非特异性抗原. 滴加1:200的一抗. 4 $^{\circ}$ C孵育过夜. 滴加适量的二抗(HRP标记)工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min. DAB显色. 苏木素液复染, 封片. 以磷酸盐缓冲液代替第一抗体作阴性对照. 对阳性染色采用HPIAS-2000型高清晰度彩色病理图文分析系统进行灰度分析, 方法按照Weidner方法, 双盲法阅片, 先在低倍镜下选择阳性结果密集区域, 然后在高倍视野下自动计算A值, 取平均值计为该切片的A值。

统计学处理 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 统计方法采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组肝纤维化分期 用CCl₄反复ip至第8周. 模型组大鼠均形成肝纤维化或早期肝硬化, 纤维化程度在2-4期之间, 16只大鼠中有12只是3期以上. 而复方红景天防治组大鼠肝纤维化程度较模型组减轻, 随着剂量的增加纤维化程度逐渐减轻, 在高剂量组纤维化程度在1-3期之间, 16只大鼠中只有4只达到3期。

2.2 肝组织中TIMP-1 mRNA的变化 模型组大鼠肝组织TIMP-1 mRNA的水平较正常组显著增高($P < 0.05$); 复方红景天干预组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA的水平较模型组显著降低($P < 0.05$); 复方红景天干预组肝组织TIMP-1 mRNA水平较正常组有所增高($P < 0.05$, 表1)。

2.3 肝组织中TIMP-1表达的变化 在正常组织切片中可见TIMP-1呈微弱水平表达, 阳性信号主要见于肌成纤维细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞中, 在模型组织切片中TIMP-1的表达较正常对照组显著增强, 其A值与正常对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 阳性表达以汇管区及纤维间隔中最明显, 主要表现为胞浆着色, 同时在纤维间隔内也可见复方红景天防治组肝组织中TIMP-1的表达明显强于正常对照组($P < 0.05$), 但较模型组显著减弱. 其A值与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2, 图1-2)。

3 讨论

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝组织内生成胶原纤维等细胞外基质的主要细胞来源. 他的激活是肝纤维化发病过程中的中心环节^[4]。

TIMP-1虽然不是肝纤维化的始发因素, 但在肝纤维化的发展过程中起重要的促进作用. 在肝脏中, TIMP-1主要细胞来源是激活的HSC, 肝脏受损后, 通过一系列细胞因子的作用, HSC被激活, 大量表达TIMP-1, 可以在酶原活化阶段与MMPs可形成稳定复合体, 阻碍

■同行评价

本文用RT-PCR和免疫组织化学方法,研究复方红景天对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化肝组织TIMP-1基因表达的影响,有一定意义,但学术价值一般。

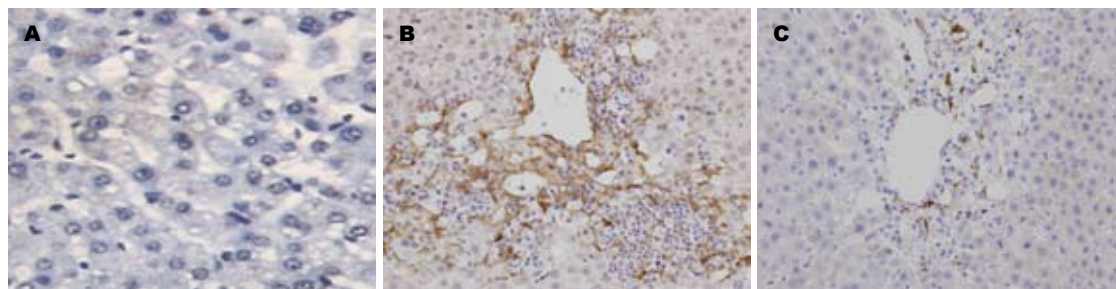


图2 肝组织中TIMP-1表达。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 复方红景天高剂量组。

MMP的酶原自我激活,也可在活化的酶原阶段与活化的MMPs形成1:1复合体,抑制其活性^[5-6]。研究表明TIMP-1能结合除MMP-14、19以外的所有MMPs而减低其表达活性。一方面通过抑制胶原酶(MMP-1, MMP-8, MMP-13等)的降解活性,抑制间质性胶原(I型, III型为主的细胞外间质的降解,导致纤维胶原沉积于细胞外;另一方面他可能通过抑制激活的肝星状细胞凋亡,从而持续产生细胞外间质,同时也大量产生TIMP-1^[7]。如此产生的净效应是导致大量的纤维胶原越来越多地沉积于肝细胞外间质,而不能被胶原酶降解。

中药复方红景天通过多年的基础与临床研究被证实具有抗慢性肝炎肝纤维化作用,其作用机制包括减轻肝脏炎症,抑制HSC的增殖与活化,抑制纤维胶原的表达。已知TIMP-1的表达与促进间质性胶原酶的表达^[8],从而促进纤维胶原的降解等,充分显示出中药复方红景天从多层次、多靶位抗肝纤维化作用的特点。但该中药复方红景天对于纤维化肝组织中TIMP-1的表达如何影响,尚无深入报道。

本文应用半定量RT-PCR与免疫组化的方法,分别从mRNA与蛋白表达水平观察复方红景天对纤维化肝组织中TIMP-1表达的影响,结果显示复方红景天可以较好防治CCl₄损伤性肝纤维化,随着复方红景天量的增加,大鼠肝组织

TIMP-1的表达逐渐减少,明显低于模型组,高于正常对照组。这就表明复方红景天具有通过抑制TIMP-1的表达,保护纤维化肝组织内包括HSC在内的细胞周围正常的基底膜样细胞间质,对于抑制HSC的活化与肝纤维化的发展具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 86-90
- 2 谢玉梅, 周永兴, 聂青和. 肝硬化病人血清、肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子的表达及意义. *中华医学杂志* 2001; 81: 805-807
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 4 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 5 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839
- 6 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453
- 7 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 8 朱跃科, 段钟平, 王宝恩, 刘芳, 赵军, 谢贤春. 芪参益气滴丸对DMN大鼠肝纤维化及肝组织TIMP-1表达的影响. *中国新药与临床杂志* 2007; 26: 11-16

编辑 史景红 电编 郭海丽

一种新的幽门螺杆菌雷贝拉唑耐药相关基因

赵飞, 何利华, 姜葵, 张建中

赵飞, 何利华, 姜葵, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室 北京市 102206

国家自然科学基金资助项目, No. 30370078

作者贡献分布: 本研究由赵飞与张建中设计; 研究过程由赵飞, 何利华及姜葵完成; 数据分析由赵飞完成; 本文论文写作由赵飞与张建中完成。

通讯作者: 张建中, 102206, 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室. zhangjianzhong@icdc.cn

电话: 010-61739456

收稿日期: 2008-05-23 修回日期: 2008-07-04

接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-11-08

A novel gene of *Helicobacter pylori* associated with resistance to rabeprazole

Fei Zhao, Li-Hua He, Kui Jiang, Jian-Zhong Zhang

Fei Zhao, Li-Hua He, Kui Jiang, Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30370078

Correspondence to: Professor Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2008-05-23 Revised: 2008-07-04

Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To explore the mechanism underlying *H pylori* resistance to rabeprazole, and to search for a new target of anti-*H pylori* drugs.

METHODS: The EZ::TN transposon which includes a chloramphenicol resistance gene (camB) was transformed into *H pylori* 26695 strain by electroporation. The isolates randomly integrated the EZ::TN transposon were harvested on Columbia agar with 8% sheep blood and chloramphenicol (20 mg/L), and then all the isolates were inoculated on Columbia agar with rabeprazole (2.25 mg/L) to select rabeprazole-resistant isolates. The rabeprazole-resistant isolates inserted by the EZ::TN transposon were detected by camB gene PCR test, and the gene related was amplified by LA-PCR (using *in vitro* cloning kit) and sequenced.

RESULTS: Six rabeprazole-resistant isolates were acquired. They were all inserted by transposon into hp1469 gene, coding outer membrane protein (Omp31) which was a nonspecific porin of *H pylori* 26695.

CONCLUSION: The mechanism of *H pylori* resistant to rabeprazole may be associated with the mutant of "hp1469".

Key Words: *Helicobacter pylori*; Rabeprazole; Drug resistance; Gene

Zhao F, He LH, Jiang K, Zhang JZ. A novel gene of *Helicobacter pylori* associated with resistance to rabeprazole. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3547-3550

摘要

目的: 探索幽门螺杆菌(*H pylori*)对雷贝拉唑(rabeprazole, RPZ)耐药的发生机制, 以期发现耐药相关基因, 为新型抗*H pylori*药物的研发和改造提供新靶点, 新思路。

方法: 将带氯霉素抗性标签的Tn5转座子电转化到*H pylori* 26695中, 使其随机插入到染色体上。使用含氯霉素20 mg/L的哥伦比亚血平皿筛选所有插入了转座子的突变株, 再使用含雷贝拉唑2.25 mg/L的哥伦比亚血平皿筛选RPZ耐药克隆。通过PCR技术对筛选到的RPZ耐药克隆进行转座子插入检测, 用LA-PCR试剂盒和测序技术检测插入失活位点。

结果: *H pylori* 26695经电转化在RPZ抗性平皿上筛选到6个Tn5插入失活的耐药克隆, 对插入位点基因的测序发现失活基因与*H pylori* 26695菌株中“hp1469”序列完全同源, 其编码产物为外膜蛋白Omp31, 功能为膜孔蛋白。

结论: *H pylori*对RPZ耐药与“hp1469”基因失活引起的膜孔蛋白缺失密切相关。

关键词: 幽门螺杆菌; 雷贝拉唑; 耐药; 基因

赵飞, 何利华, 姜葵, 张建中. 一种新的幽门螺杆菌雷贝拉唑耐药

■背景资料

临床多采用包括质子泵抑制剂和抗生素在内的三联或四联疗法治疗*H pylori*感染, 具有良好的效果。耐药性*H pylori*的感染率不断升高, 成为根除失败的主要原因之一。研究发现质子泵抑制剂除具有公认的胃酸分泌抑制作用和抗溃疡作用外, 本身还有类似抗生素的作用, 对*H pylori*有抑制作用。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■研发前沿

质子泵抑制剂的类似抗生素的作用相关抑制机制仍未完全明朗。

相关基因. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3547-3550
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3547.asp>

0 引言

自1982年Warren和Marshall从慢性胃炎患者体内分离出幽门螺杆菌(*H pylori*)以来^[1], 其一直倍受世界各地学者们的关注. 1994年WHO已将其列为胃癌的I类致癌因子, 也是迄今第一个明确作为肿瘤病因的细菌. 中国人群*H pylori*感染率为50%-60%, 根除*H pylori*可治疗慢性胃炎、消化性溃疡, 可以使消化性溃疡的年复发率从80%降低至4%^[2]. 抗*H pylori*感染通常采用多药联合治疗, 包括抗生素、质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)和/或铋剂. 耐药性*H pylori*的感染率不断升高, 成为根除失败的主要原因之一. 目前临床多采用包括PPI和抗生素在内的三联或四联疗法治疗*H pylori*感染, 具有良好的效果. 随后研究发现PPI除具有公认的胃酸分泌抑制作用和抗溃疡作用外, 本身还有类似抗生素的作用^[3-5], 相关抑制*H pylori*机制仍未完全明朗. 雷贝拉唑(rabeprazole, RPZ)是新一代PPI, 其体外杀菌效果明显优于其他PPI^[6]. 我们研究发现, *H pylori*对于RPZ类似抗生素的抑制杀灭作用可以产生抗性, 并且获得了相关的耐药菌株. 我们拟通过转座子插入失活方法寻找耐药*H pylori*菌株的发生机制, 寻找雷贝拉唑耐药基因. 同时为新型抗*H pylori*药物的改造和研发提供新思路.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 26695原始株, 来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室*H pylori*菌种保存库. 雷贝拉唑原药, 由西安杨森公司惠赠. 含有氯霉素抗性基因的pMOD-2-<camB>质粒, 由张建中研究员自美国华盛顿大学医学院分子生物学系实验室构建并带回, 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室保存并提供. Labconco生物安全柜、混合气体培养箱、Eagle Eye II型凝胶成像系统、EquiBio电击转化仪、Eppendorf PCR扩增仪和TaKaRa LA-PCR试剂盒.

1.2 方法 将带氯霉素抗性基因的质粒pMOD-2-<camB> 5 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, pvuII 1 μ L, 灭菌TE(pH7.5)12 μ L依次加入到0.5 mL的灭菌eppendorf管中, 混匀, 封口, 37 $^{\circ}$ C水浴4 h酶切. 酶切产物纯化按照Qiagen纯化试剂盒说明书操作. 将酶切纯化后的Tn5-<camB>2.5 μ L, EZ::TN转

座酶5 μ L, 灭菌葡萄糖溶液2.5 μ L依次加入到0.5 mL的灭菌eppendorf管中, 37 $^{\circ}$ C水浴0.5 h, 形成转座复合体. 取2 mm电击杯在750 mL/L的乙醇液中浸泡2 h左右, 取出后在生物安全柜中将乙醇完全挥发, 用紫外线照射, 盖紧塞后置于-20 $^{\circ}$ C冰箱预冷; 在生物安全柜中取1 μ L转座复合体加入到预处理的*H pylori* 26695菌悬液中, 用移液器吹打均匀, 迅速转移至预冷的电击杯中, 放置在电转化仪上进行电转化.

电击转化后的菌液均匀涂布于普通哥伦比亚血平皿, 在混合气体培养箱内培养24 h, 将菌苔全部刮下悬菌于400 μ L的灭菌脑心浸液保存管内, 涂布于氯霉素(20 mg/L)抗性哥伦比亚血平皿筛选插入Tn5-<camB>的*H pylori*, 平行接种相同A值的未转化*H pylori*做阴性对照. 培养72 h后, 将氯霉素平皿上所有生长的克隆重悬于400 μ L的灭菌脑心浸液保存管内, 涂布于RPZ(2.25 mg/L)抗性哥伦比亚血平皿筛选转座子插入失活的RPZ耐药株, 平行接种相同A值的未转化*H pylori*做阴性对照. 筛选到的全部RPZ耐药株进行Tn5-<camB>的PCR检测, 双向引物分别为cam1 5'-GAT ATA GAT TGA AAA GTG GAT-3'和cam2 5'-TTA TCA GTG CGA CAA ACT GGG-3', 目的片段742 bp. PCR阳性的耐药克隆用LA-PCR试剂盒检测插入位点附近基因片段, 测序分析Tn5插入位点及插入失活基因.

2 结果

经电转化的*H pylori*在氯霉素平皿培养72 h有细密菌落生长, 相同A值未经电转化*H pylori*在氯霉素平皿上培养72 h未见生长. 上述通过氯霉素抗性标签获得的电转化插入Tn5-<camB>的菌接种在RPZ平皿上筛选插入失活的RPZ耐药菌, 培养96 h获得6个耐药克隆, 分别命名为R1-R6. 对照组*H pylori*在RPZ平皿上无菌落生长. R1-R6转座插入株的检测: 转座子带有氯霉素抗性基因, 通过PCR检测, R1-R6均742 bp出现目的条带(图1). 筛选到的6个耐药株在RPZ平皿上传代生长良好, 接种到不含抗生素的哥伦比亚血平皿上稳定传代3次后重新转种RPZ平皿上仍然生长良好, 未转化*H pylori*则不能生长. 利用LA-PCR试剂盒获得了转座子插入位点周遍基因序列, 测序结果经BLAST分析6个耐药克隆转座子插入的基因均为“hp1469”.

3 讨论

PPI的类抗生素作用已得到公认, 但作用机制目

■相关报道

何利华 *et al*在对多种质子泵抑制剂的*H pylori* MIC研究中发现了对质子泵抑制剂耐药的菌株, 经反复传代验证为稳定型耐药.

前尚未明朗. 了解PPI的类抗生素作用机制有助于*H pylori*的临床治疗和新型抗生素的研发. 耐药*H pylori*的发现为研究PPI的药物靶点机制提供了新的线索和研究思路. 前期实验发现自然条件下筛选到耐药克隆的几率为 10^{-9} - 10^{-10} , 这与单基因突变导致耐药的概率比较接近, 推测*H pylori*对PPI耐药原因可能是某基因突变或者失活, 可利用转座子寻找可能的耐药基因.

转座子Tn5长期以来被广泛应用于发现新基因、分析基因功能和构建突变体库^[7-10]. 本实验以EZ::TN转座产品为工具, 利用了其如下特点: (1)可以随机插入到目的基因, 插入后稳定不会丢失; (2)带有氯霉素标签, 易于筛选; (3)序列已知, 带有测序引物. 实验通过2次耐药筛选获得目的克隆: 电转化后通过氯霉素耐药平皿获得带有转座子随机插入成功的*H pylori*, 再次通过RPZ耐药平皿筛选到基因插入失活的耐药株. 将获得的6株耐药克隆, 普通哥伦比亚血平皿上生长正常, 重新转种RPZ平皿上仍然生长良好, 说明即使在失去抗性压力的条件下耐药株仍然可以将耐药性稳定传代, 此耐药为稳定的基因型耐药.

“hp1469”基因在26695中编码一种外膜蛋白(Omp31), 属于膜孔蛋白家族(hop family)^[11], 其基因编码产物为HopV, 大小为248个氨基酸, 分子质量约为26.4 kDa. 该家族蛋白可在外膜上形成亲水性的孔, 对于水溶性的小分子物质进入菌体提供必要的通道. 外膜蛋白根据其形成的膜孔直径和物质转运的方式差异可分为两类: 非特异性和特异性膜孔^[12]. 非特异性通道一般直径在0.6-2.3 nm, 可以将小于孔径的亲水小分子物质通过易化扩散作用被动转运到细胞内, 这种转运缺少特异性, 只与物质的大小和细胞内外浓度差有关, 抗生素通过该途径进入到细胞内. 特异性通道直径相对要小, 一般的物质不能通过, 只有能与通道上特异的结合位点结合的物质才能被转运^[13]. HopV膜电导测量实验发现其与大肠杆菌非特异性膜孔蛋白OmpF形成的孔道的电导率(1.8nS)^[14]非常接近. 认为是一种非特异膜孔蛋白^[15], 是抗生素进入胞内的途径.

耐药菌株中“hp1469”基因由于Tn5转座子的插入失活造成其编码的膜孔蛋白Omp31的缺失, RPZ失去了部分进入菌体的途径, 可能造成胞内药达不到有效的杀菌浓度, 这可能是导致突变株耐药的重要原因之一. HopV是非特异膜孔蛋白, 其失活导致的耐药机制很可能是一

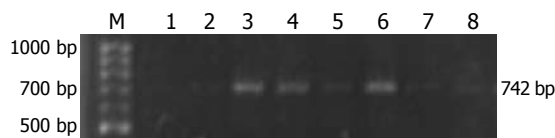


图1 雷贝拉唑抗性的转座插入株的检测. M: Marker; 1: 阴性对照; 2-7: R1-R6; 8: 阳性对照CamB.

种非特异的耐药途径, 可能针对PPI以外其他治疗*H pylori*的药物都会有一定影响, 通过定位突变构建“hp1469”失活菌株可进一步验证实验结果的可靠性, 同时有助于检测HopV失活对其他抗生素敏感性的影响. 总之, 本耐药相关基因的发现, 为RPZ抗菌机制的研究、耐药研究和新药研发均具有较大的意义.

4 参考文献

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- 2 Nervi G, Liatopoulou S, Cavallaro LG, Gnocchi A, Dal-Bo N, Rugge M, Iori V, Cavestro GM, Maino M, Colla G, Franze A, Di Mario F. Does *Helicobacter pylori* infection eradication modify peptic ulcer prevalence? A 10 years' endoscopic survey. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2398-2401
- 3 Iwahi T, Satoh H, Nakao M, Iwasaki T, Yamazaki T, Kubo K, Tamura T, Imada A. Lansoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor, and its related compounds have selective activity against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 490-496
- 4 Bamba H, Kondo Y, Wong RM, Sekine S, Matsuzaki F. Minimum inhibitory concentration of various single agents and the effect of their combinations against *Helicobacter pylori*, as estimated by a fast and simple in vitro assay method. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 659-662
- 5 Altintas E, Sezgin O, Ulu O, Aydin O, Camdeviren H. Maastricht II treatment scheme and efficacy of different proton pump inhibitors in eradicating *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1656-1658
- 6 Kawakami Y, Akahane T, Yamaguchi M, Oana K, Takahashi Y, Okimura Y, Okabe T, Gotoh A, Katsuyama T. In vitro activities of rabeprazole, a novel proton pump inhibitor, and its thioether derivative alone and in combination with other antimicrobials against recent clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 458-461
- 7 Jenks PJ, Chevalier C, Ecobichon C, Labigne A. Identification of nonessential *Helicobacter pylori* genes using random mutagenesis and loop amplification. *Res Microbiol* 2001; 152: 725-734
- 8 Chang KC, Yeh YC, Lin TL, Wang JT. Identification of genes associated with natural competence in *Helicobacter pylori* by transposon shuttle random mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 961-968
- 9 Salama NR, Shepherd B, Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene

■创新盘点

本文就*H pylori*对雷贝拉唑的耐药机制进行了研究, 并初步筛选出一个新的耐药相关基因.

■同行评价

本研究基于转座子Tn5技术,探索*H pylori*对雷贝拉唑(RPZ)耐药的发生机制,以期发现耐药相关基因,为新型抗*H pylori*药物的研发和改造提供新靶点、新思路,选题准确,具有重要的参考价值。

- analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2004; 186: 7926-7935
- 10 Ton-Hoang B, Guynet C, Ronning DR, Cointin-Marty B, Dyda F, Chandler M. Transposition of ISHp608, member of an unusual family of bacterial insertion sequences. *EMBO J* 2005; 24: 3325-3338
- 11 Peck B, Ortkamp M, Nau U, Niederweis M, Hundt E, Knapp B. Characterization of four members of a multigene family encoding outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* and their potential for vaccination. *Microbes Infect* 2001; 3: 171-179
- 12 Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995; 63: 1567-1572
- 13 Nikaido H. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol Microbiol* 1992; 6: 435-442
- 14 Benz R, Schmid A, Hancock RE. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J Bacteriol* 1985; 162: 722-727
- 15 Hancock RE, Schmidt A, Bauer K, Benz R. Role of lysines in ion selectivity of bacterial outer membrane porins. *Biochim Biophys Acta* 1986; 860: 263-267

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 2008-11-08)

核因子- κ B和血管内皮生长因子在胃癌中的表达及其意义

王海鹏, 田小林, 郭芸

王海鹏, 田小林, 郭芸, 桂林医学院附属医院胃肠外科 广西壮族自治区桂林市 541001

作者贡献分布: 本文由王海鹏, 田小林及郭芸设计; 研究过程由田小林操作完成; 数据分析由郭芸完成; 本论文写作由王海鹏完成。

通讯作者: 王海鹏, 541001, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院胃肠外科. ayonst1@163.com

电话: 0773-2999151

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2008-10-08

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Expression and significance of NF- κ B and VEGF in gastric carcinoma

Hai-Peng Wang, Xiao-Lin Tian, Yun Guo

Hai-Peng Wang, Xiao-Lin Tian, Yun Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541001, China

Correspondence to: Hai-Peng Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541001, China. ayonst1@163.com

Received: 2008-08-19 Revised: 2008-10-08

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the expression and clinical significance of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric carcinoma.

METHODS: Sixty-eight patients with gastric carcinoma were selected as experimental group, and their corresponding noncarcinoma tissues were selected as control group, and 20 normal healthy gastric tissue samples were taken as normal control group. Immunohistochemical method (SABC) was used to test the NF- κ B and VEGF protein. And the clinical pathological data were statistically analyzed.

RESULTS: NF- κ B and VEGF were not expressed in normal gastric tissues, but were positively expressed in control group and in study group with a significant difference detected (63.2% vs 2.9%, 76.5% vs 14.7%, both

$P = 0.000$). Expression of NF- κ B and VEGF were not correlated with the gender, age and histological type in gastric carcinoma. While the expression of NF- κ B and VEGF in gastric carcinoma with TNM stage (III + IV), lymph node metastasis, serous membrane involved, and distant metastasis were significantly higher than those of TNM stage (I + II), without lymph node metastasis, or without serous membrane involved, or without distant metastasis ($P < 0.05$), respectively. There was significantly positive correlation between NF- κ B and VEGF in gastric carcinoma ($r = 0.512$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: NF- κ B and VEGF are both significantly expressed in gastric carcinoma and there is a positive correlation between them. And the possible mechanism is that NF- κ B up-regulates VEGF, hence promotes the development of gastric carcinoma.

Key Words: Nuclear factor-kappa B; Vascular endothelial growth factor; Gastric carcinoma

Wang HP, Tian XL, Guo Y. Expression and significance of NF- κ B and VEGF in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3551-3555

摘要

目的: 探讨核因子- κ B(NF- κ B)和血管内皮生长因子(VEGF)在胃癌中的表达及其临床意义。

方法: 选取68例胃癌组织为实验对象, 各对应的癌旁组织为对照组, 并选取20例正常胃组织为正常对照组。采用免疫组织化学法(SABC)检测各样本的NF- κ B和VEGF, 并对相关的临床病理资料进行统计分析。

结果: 正常胃组织中未见NF- κ B阳性表达及VEGF表达, 胃癌细胞中阳性表达率均明显高于癌旁组织中(63.2% vs 2.9%, 76.5% vs 14.7%, 均 $P = 0.000$)。NF- κ B及VEGF在胃癌组织中的表达均与性别、年龄、组织学类型无关; NF- κ B及VEGF在TNM分期(III+IV期)、有

■背景资料

最近发现, NF- κ B在肿瘤发生发展中也起重要作用。他不仅可以促进细胞增殖和转化, 还可能在肿瘤血管生成中起核心作用。血管内皮生长因子是最具特异性的血管活性物质, 能够刺激血管内皮细胞增殖、促进肿瘤血管生成, 从而促进肿瘤的增殖、侵袭及转移。但二者在胃癌发生发展的相互关系还未见报道。

■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

■研究前沿

NF- κ B参与多种基因的转录调控及细胞的凋亡调控和转化,在许多肿瘤中高度表达。当NF- κ B被不恰当激活,定位于胞核而不能返回胞浆时,其功能可异常增高,进而改变细胞正常的信号转导,促进细胞癌变。VEGF是一种多功能的血管生成因子,一方面作为血管内皮细胞高度特异的促有丝分裂原,具有强烈的促血管内皮细胞增殖作用,通过出芽方式形成新的毛细血管,满足肿瘤组织无限生长的需要。另一方面,VEGF使血管通透性提高及新生血管基膜不完整,为肿瘤的浸润、转移提供了有利的条件。两者如何致癌又如何影响肿瘤的发生、发展中起作用是目前研究的重点。

淋巴结转移、累及浆膜、有远处转移组阳性表达均明显高于TNM(I+II期)、无淋巴结转移、未累及浆膜、无远处转移组($P<0.05$)。胃癌中NF- κ B与VEGF表达显著正相关($r=0.512$, $P=0.000$)。

结论: NF- κ B和VEGF在胃癌中呈现高表达,且两者存在明显相关, NF- κ B可能通过上调VEGF的表达促进胃癌的发生发展。

关键词: 核因子- κ B; 血管内皮生长因子; 胃癌

王海鹏, 田小林, 郭芸. 核因子- κ B和血管内皮生长因子在胃癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3551-3555

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3551.asp>

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度与各种癌基因、肿瘤抑制因子及几种生长因子及其受体异常有关^[1]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种多向转录调节因子,广泛参与多种生理和病理过程的基因调控。最近发现, NF- κ B在肿瘤发生发展中也起重要作用,他不仅可以促进细胞增殖和转化,还可能在肿瘤血管生成中起核心作用^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最具特异性的血管活性物质,能够刺激血管内皮细胞增殖、促进肿瘤血管生成,从而促进肿瘤的增殖、侵袭及转移^[3]。本研究通过检测胃癌中NF- κ B和VEGF的表达,旨在探讨二者对胃癌发生发展的影响及其作用关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-03/2007-06本院收治行手术切除的胃癌标本68例为实验对象,其中男48例,女20例,年龄38-83(平均59.2)岁。所有病例术前均未进行过放疗和化疗,术后均经病理证实为胃癌,而且均有完整的临床和病理资料,其中高、中分化腺癌18例,低分化腺癌41例,印戒细胞癌5例,黏液癌4例。临床分期采用1988年国际抗癌联盟(UICC)正式颁布的国际统一的胃癌TNM分期法,其中I+II期31例,III+IV期37例;淋巴结转移49例,无淋巴结转移19例;远处转移13例,无远处转移55例;肿瘤浸润未累及浆膜层者26例,浸润超过浆膜层者42例。所有胃癌患者均同时取相应的癌旁组织作为对照。另取本院同期胃镜室的镜下活检20例正常

胃黏膜标本(胃镜标本)作为正常对照。全部新鲜标本24 h内经100 mL/L甲醛固定,常规石蜡包埋。

1.2 方法

1.2.1 NF- κ B p65的检测: NF- κ B p65是NF- κ B的主要组成因子,因此以检测NF- κ B p65来表示NF- κ B。兔抗人NF- κ B p65抗体及兔抗人VEGF抗体、SABC试剂盒均购自武汉博士德公司。免疫组化染色主要步骤:采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法,操作按试剂盒说明书进行。主要包括切片脱蜡至水,微波抗原修复,山羊血清封闭,分别依次滴加抗NF- κ B p65或VEGF抗体过夜(工作浓度1:100),生物素化二抗及ABC复合物, DAB显色,苏木素复染后封片。用PBS代替一抗平行操作染色做阴性对照,用已知乳腺癌阳性片做阳性对照。

1.2.2 判定标准: 在组织切片中显示胞质或胞核染为淡黄至棕黄色者为阳性细胞标志,参考文献[4]报道的方法计算各指标表达程度。计数5个高倍视野,将平均阳性细胞数分为5类:0-阳性细胞 $\leq 1\%$, 1-阳性细胞占1%-25%, 2-阳性细胞占25%-50%, 3-阳性细胞占50%-75%, 4-阳性细胞 $\geq 75\%$ 。根据染色程度将阳性信号分为3类:染色强度弱(1+)-淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色,染色强度强(3+)-呈棕黄至棕褐色染色,中等染色强度(2+)-染色强度介于弱阳性与强阳性之间,染色强度 $\times$ 阳性细胞百分数为每例组织染色的综合记分。综合记分 ≥ 1 判为表达阳性, <1 则为阴性。

统计学处理 用SPSS13.0进行统计处理。率的比较用列联表 χ^2 或确切概率法分析,相关分析采用Spearman等级相关分析。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 各组织中NF- κ B p65蛋白的表达 正常胃组织中未见阳性表达;癌旁组织中有2例(2.9%)呈阳性表达,表达强度为中等;68例胃癌细胞中有43例(63.2%)呈阳性表达,阳性信号多以胞质、胞核同时着色为主,为粗细不等的棕黄或棕褐色颗粒,其表达强度均达到中等或强阳性,阳性记分从4-12不等,与癌旁组织的表达差异有统计学意义($P=0.000$)。NF- κ B在胃癌组织中的表达与胃癌患者的与性别、年龄、组织学类型无关($P>0.05$), NF- κ B在TNM分期(III+IV期)、有淋巴结转移、累及浆膜、有远处转移组阳性表达

表 1 NF- κ B p65、VEGF蛋白表达情况及与胃癌临床病理学参数的关系

临床参数	<i>n</i>	NF- κ B			VEGF		
		阳性	阴性	<i>P</i>	阳性	阴性	<i>P</i>
正常胃组织	20	0	20	—	0	20	
癌旁组织	68	2	66	0.000	10	58	0.000
胃癌组织	68	43	25		52	16	
性别				0.064			0.359
男	48	27	21		35	13	
女	20	16	4		17	3	
年龄				0.451			0.567
≤ 59	34	20	14		25	9	
≥ 59	34	23	11		27	7	
组织学分型				0.076			0.178
高中分化腺癌	18	8	10		11	7	
低分化腺癌	41	31	10		35	6	
印戒细胞癌	5	2	3		3	2	
黏液癌	4	2	2		3	1	
临床分期				0.002			0.000
I + II	31	14	17		17	14	
III + IV	37	29	8		35	2	
淋巴结转移				0.000			0.006
有	49	38	11		42	7	
无	19	5	14		10	9	
累及浆膜				0.000			0.004
未累及	26	8	18		15	11	
累及	42	35	7		37	5	
远处转移				0.023			0.029
无	55	31	24		39	16	
有	13	12	1		13	0	

■相关报道

已有实验发现, 用NF- κ B反义核苷酸抑制TNF- α 诱导的血管生成的同时, 能下调TNF- α 介导的bFGF和VEGF的表达, 从而提示NF- κ B对VEGF的活性确有潜在的正向调节作用。

明显高于TNM(I + II期)、无淋巴结转移、未累及浆膜、无远处转移组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 各组织中VEGF蛋白的表达 VEGF阳性信号多定位于肿瘤细胞和血管内皮细胞胞质中, 部分胞核着色, 呈棕黄或棕褐色颗粒。正常胃组织无VEGF表达, 癌旁组织中有10例(14.7%)呈阳性, 表达强度为中等; 有52例(76.5%)胃癌呈现VEGF中、强度阳性表达, 阳性记分界于6-12之间, 与癌旁组织的表达差异有统计学意义($P = 0.000$)。VEGF在胃癌组织中的表达与性别、年龄、组织学类型无关($P > 0.05$), VEGF在TNM分期(III+IV期)、有淋巴结转移、累及浆膜、有远处转移组阳性表达明显高于TNM(I + II期)、无淋巴结转移、未累及浆膜、无远处转移组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.3 胃癌中NF- κ B p65与VEGF表达的关系 在43例NF- κ B p65阳性标本中, 有40例同时存在VEGF表达; 而在16例VEGF阴性标本中, 有13例

伴NF- κ B p65表达缺失, 相关分析证实, 胃癌中NF- κ B p65与VEGF表达显著正相关($r = 0.512$, $P = 0.000$)。

3 讨论

细胞核因子 κ B又称 κ 基因结合核因子(nuclear factor κ gene binding, NF- κ B), 是一种广泛存在于细胞中的具有多向性调节作用的蛋白质分子, 有着广泛的生物学作用。NF- κ B通过调控细胞激酶、趋化因子、生长因子、细胞黏附因子及早期反应的蛋白质分子基因的转录而参与炎症和免疫反应、某些疾病的病理产生、急性期反应、细胞增殖和细胞凋亡以及对病毒感染的反应等^[5]。由于广泛参与多种基因的转录调控及细胞的凋亡调控和转化, 故NF- κ B在许多肿瘤中高度表达。具有代表性的是由P65和P50组成的异源二聚体。通常情况下, 其以非活性形式存在于胞质, 只有被激活后才从胞质转位于胞核发挥功能。当NF- κ B被不恰当激活, 定位于胞核而不

■应用要点

本研究为探讨NF- κ B及其相关基因VEGF在胃癌的发病进程中的作用,加深对胃癌的分子发生机制的认识,并为进一步揭示NF- κ B与肿瘤的多重关系积累了实验依据。将来的研究可能会揭示肿瘤发生的启动、以及浸润转移的相关机制。

能返回胞质时,其功能可异常增高,进而改变细胞正常的信号转导,促进细胞癌变。有证据表明,NF- κ B因子的持续活化可作为包括乳腺肿瘤、卵巢肿瘤、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌以及黑色素瘤等多种实体肿瘤的标记^[6-7]。

同时肿瘤的生长和转移与肿瘤的血管生成也密切相关。肿瘤的血管新生是一个多步骤复杂的过程,受血管形成促进、抑制因素的影响。VEGF是一种多功能的血管生成因子,一方面作为血管内皮细胞高度特异的促有丝分裂原,具有强烈的促血管内皮细胞增殖作用,通过出芽方式形成新的毛细血管。而肿瘤组织中丰富的毛细血管又能输送氧气及营养物质,转运代谢产物,满足肿瘤组织无限生长的需要。另一方面,VEGF使血管通透性提高及新生血管基膜不完整,为肿瘤的浸润、转移提供了有利的条件^[8]。已有研究表明,VEGF在许多恶性肿瘤中表达亢进,且与血管新生显著相关,如肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、结肠癌及人的头颈部鳞状细胞癌等^[9]。

本组资料中,正常胃组织中未见NF- κ B阳性表达;癌旁组织中有2例呈阳性表达;68例胃癌细胞中有43例(63.2%)呈阳性表达,明显高于癌旁组织($P<0.05$)。朱辉 *et al*^[10]也有类似报道。同时研究还发现,NF- κ B在胃癌组织中的表达与胃癌患者的与性别、年龄、组织学类型无关($P>0.05$),NF- κ B在TNM分期(III+IV期)、有淋巴结转移、累及浆膜、有远处转移组阳性表达明显高于TNM(I+II期)、无淋巴结转移、未累及浆膜、无远处转移组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这与朱辉 *et al*^[10]的研究有所不同。朱辉 *et al*^[10]在研究贲门癌的NF- κ B表达情况时则认为,贲门癌组织中NF- κ B阳性表达与癌分化程度、淋巴结转移及肿瘤最大直径无关。张飞雄 *et al*^[11]在胰腺癌中的研究也发现,NF- κ B的表达与性别、组织分化程度、神经浸润、TNM分期等无关。

研究表明^[12],VEGF参与肿瘤的浸润和转移。本研究中正常胃组织无VEGF表达,癌旁组织中有10例呈阳性;有52例(76.5%)胃癌呈现VEGF中、强度阳性表达,明显高于癌旁组织的表达($P<0.05$);与崔涛 *et al*^[13]的研究结果一致。同时还发现VEGF在胃癌组织中的表达与性别、年龄、组织学类型无关($P>0.05$),VEGF在TNM分期(III+IV期)、有淋巴结转移、累及浆膜、有远处转移组阳性表达明显高于TNM(I+II期)、无

淋巴结转移、未累及浆膜、无远处转移组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

本实验结果显示:胃癌组织中NF- κ B蛋白表达与VEGF蛋白表达之间存在正相关关系,提示在胃癌组织中NF- κ B的活化对VEGF的表达具有正向的调节作用。尽管目前尚未查明VEGF上是否存在NF- κ B特异结合位点,但已有实验发现,用NF- κ B反义核苷酸抑制TNF- α 诱导的血管生成的同时,能下调TNF- α 介导的bFGF和VEGF的表达^[2],从而提示NF- κ B对VEGF的活性确有潜在的正向调节作用。这或许是肿瘤细胞中VEGF分泌异常增加的启动机制之一,也为NF- κ B对胃癌发生发展的多向调节作用提供了有力佐证。

总之,我们在胃癌中看到了NF- κ B及其相关基因VEGF显著表达,二者功能的异常可能协同参与了胃癌的发病进程,这将有助于加深对胃癌的分子发生机制的认识,并为进一步揭示NF- κ B与肿瘤的多重关系积累了实验依据。

4 参考文献

- 1 Xie K, Huang S. Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 31-43
- 2 Choi IK, Shin HJ, Lee HS, Kwon HJ. Streptochlorin, a marine natural product, inhibits NF-kappaB activation and suppresses angiogenesis in vitro. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1338-1343
- 3 Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wilting J, Sleeman JP. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 2003; 63: 713-722
- 4 张海燕, 温滨红, 杜娃, 郑玮, 刘国良. NF- κ B与VEGF在甲状腺癌中的表达及意义. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2004; 13: 152-157
- 5 Kuntzen C, Zazzeroni F, Pham CG, Papa S, Bubici C, Knabb JR, Franzoso G. A method for isolating prosurvival targets of NF-kappaB/Rel transcription factors. *Methods Mol Biol* 2007; 399: 99-124
- 6 Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35
- 7 Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005; 123: 158-169
- 8 Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY, Jeon SW, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 62-66
- 9 de Souza Queiroz KC, Zambuzzi WF, Santos de Souza AC, da Silva RA, Machado D, Justo GZ, Carvalho HF, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett* 2007; 258: 126-134
- 10 朱辉, 白世祥, 王小玲. 贲门癌细胞核因子NF- κ B p65、VEGF的表达及相互关系. *山东大学学报(医学*

- 版) 2004; 42: 607-609
- 11 张飞雄, 杨力, 李兆坤, 王伟, 满晓华, 龚燕芳, 高军. NF- κ B、PCNA、VEGF在胰腺癌组织中的表达关系及其意义. 宁夏医学院学报 2008; 30: 301-303
- 12 Davies MM, Jonas SK, Kaur S, Allen-Mersh TG. Plasma vascular endothelial but not fibroblast

- growth factor levels correlate with colorectal liver metastasis vascularity and volume. *Br J Cancer* 2000; 82: 1004-1008
- 13 崔涛, 刘莹, 李凤朝. NF- κ B、VEGF在胃不典型增生、胃癌中的表达及其意义. 徐州医学院学报 2005; 25: 286-288

■同行评价
本文章研究方法可行, 结论可靠, 总体条理清晰, 有一定学术价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_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B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_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 2008-11-08)

慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞HBV DNA载量与其功能的关系

彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 何芳

■背景资料

DCs是人体内功能最强的专职性APC,是机体免疫功能的始动者,其功能缺陷将导致抗原无法被有效的递呈给CD4+Th和CD8+CTL,从而产生异常的细胞和体液免疫应答。Beekebaum和Arima均已证实DCs内有HBV的感染,HBV对DCs的感染,可以诱导DCs的凋亡,从而导致DCs分泌细胞因子和刺激T细胞增殖的能力受到抑制,DCs作为体内免疫反应的始动子、调节子和效应子,一旦受损会影响到机体免疫的各个环节。所以,研究DCs内HBV DNA载量与DCs功能的关系是慢性HBV感染机制研究的一个重要方面。

彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 何芳, 湖南中医药大学第一附属医院传染科 湖南省长沙市 410007

国家中医药管理局中医药科学技术研究专项资助项目, No. 06-07JB17

作者贡献分布: 此课题由彭建平与孙克伟设计; 研究过程由彭建平, 伍玉南及何芳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙克伟提供; 数据分析由彭建平与孙克伟完成; 本论文写作由彭建平完成。

通讯作者: 彭建平, 410007, 湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院传染科, jppeng@126.com

电话: 0731-5600453

收稿日期: 2008-09-23 修回日期: 2008-10-17

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-08

Relationship between HBV DNA load in monocyte-derived dendritic cells and dendritic cell function in patients with chronic hepatitis B

Jian-Ping Peng, Ke-Wei Sun, Yu-Nan Wu, Fang He

Jian-Ping Peng, Ke-Wei Sun, Yu-Nan Wu, Fang He, Department of Infectious Diseases, the First Hospital Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: the Special Foundation from State Administration of Traditional Chinese Medicine for Chinese Medical Science and Technology Research, No. 06-07JB17

Correspondence to: Jian-Ping Peng, Department of Infectious Diseases, the First Hospital Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. jppeng@126.com

Received: 2008-09-23 Revised: 2008-10-17

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the HBV DNA load in monocyte-derived dendritic cells (DCs) from patients with chronic hepatitis B, and to explore the reason for decrease of DC function.

METHODS: Twenty patients with chronic hepatitis B and 10 healthy controls were included in this study. We incubated and induced DC subsets differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The expression levels of HLA-DR, CD-1 α , CD80 and CD86 were detected by flow cytometry, and the levels of interleukin-12 (IL-12) in supernatants were measured by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The stimulatory ability of DCs for proliferation of allogeneic T cells was evaluated with mixed lymphocyte reaction (MLR). HBV DNA load in DCs was detected by fluorescent quantitative real-time PCR.

RESULTS: HBV DNA was detected in the DCs of 13 patients. The expression levels of HLA-DR, CD-1 α , CD80, CD86, IL-12, and the stimulatory ability of DCs for allogeneic T cell proliferation were much lower in patients than those in healthy controls ($P < 0.01$ or 0.05); moreover, the above indicator levels were lower in patients with DC HBV DNA positive than those in patients with DC HBV DNA negative (correspondingly: 39.17 ± 6.02 vs 60.11 ± 7.92 ; 46.03 ± 5.52 vs 58.77 ± 4.12 , 20.95 ± 6.32 vs 35.24 ± 7.41 , 25.16 ± 6.05 vs 45.30 ± 8.01 , 19.67 ± 7.32 vs 30.74 ± 8.39 , 0.32 ± 0.08 vs 0.59 ± 0.11 ; $P < 0.01$ or 0.05). The expression levels of HLA-DR, CD-1 α , CD80 and CD86 on DCs, as well as the secretion of IL-12 and the stimulatory ability of DCs for allogeneic T cell proliferation, were significantly correlated with DC HBV load ($r = -0.713, -0.713, -0.623, -0.702, -0.525, -0.841$; $P < 0.001$).

CONCLUSION: The monocyte-derived DCs can be infected by HBV DNA. There is a significantly negative correlation between DC function and HBV DNA load, and the function of DCs is good when the load of HBV DNA is lower.

Key Words: Chronic hepatitis B; Dendritic cells; Hepatitis B virus; DNA load; Flow cytometry; Polymerase chain reaction

Peng JP, Sun KW, Wu YN, He F. Relationship between HBV DNA load in monocyte-derived dendritic cells and dendritic cell function in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3556-3560

摘要

目的: 探讨乙型肝炎患者外周血DCs HBV DNA载量与DCs功能的关系。

■同行评议者

朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

方法: 采集20例慢性乙型肝炎患者和10例健康人的抗凝外周静脉血, 分离外周血单个核细胞(PBMCs), IL-4和GM-CSF的作用下培养使DCs增殖、成熟, 以流式细胞技术分别检测DCs表面HLA-DR、CD-1 α 、CD80及CD86的表达; ELISA检测DCs培养上清液IL-12的水平, 实时荧光定量PCR法检测DCs HBV DNA的载量, 同种异体混合淋巴细胞反应检测DCs刺激同种异体T细胞增殖能力。

结果: 慢性乙型肝炎患者外周血DCs内亦可检测到HBV DNA, 患者DCs表面HLA-DR、CD-1 α 、CD80及CD86的表达水平、DCs分泌IL-12水平及DCs刺激同种异体T细胞增殖能力均显著低于健康对照组, 其中DCs HBV DNA阳性组较DCs HBV DNA阴性组下降更为明显(39.17 ± 6.02 vs 60.11 ± 7.92 , 46.03 ± 5.52 vs 58.77 ± 4.12 , 20.95 ± 6.32 vs 35.24 ± 7.41 , 25.16 ± 6.05 vs 45.30 ± 8.01 , 19.67 ± 7.32 vs 30.74 ± 8.39 , 0.32 ± 0.08 vs 0.59 ± 0.11 , 均 $P < 0.01$ 或 0.05); HLA-DR、CD-1 α 、CD80及CD86的表达、IL-12水平及DCs刺激同种异体T细胞增殖能力与DCs HBV DNA载量呈显著负相关($r = -0.713, -0.713, -0.623, -0.702, -0.525, -0.841$, 均 $P < 0.001$)。

结论: 慢性乙型肝炎患者外周血DCs可被HBV DNA感染, 患者DCs HBV DNA载量与DCs功能有密切关系, 病毒载量低者DCs功能好, 病毒载量高者DCs功能差。

关键词: 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 乙型肝炎病毒; DNA载量; 流式细胞术; 聚合酶链反应

彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 何芳. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞HBV DNA载量与其功能的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3556-3560
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3556.asp>

0 引言

病毒性肝炎是我国最常见的疾病之一, 慢性乙型肝炎患者病情迁延不愈的主要原因是由于HBV形成的特异性的免疫耐受所导致的病毒持续感染。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是迄今所知作用最强的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)^[1]。在慢性乙型肝炎患者中DCs的功能是低下的^[2], DCs功能的异常可能导致抗原提呈功能失调, 引起体液和细胞免疫紊乱, 最终导致患者病情迁延不愈^[3]。DCs HBV DNA载量反映了HBV在DCs内复制的活跃程度。目前关于乙型肝炎患者DCs内HBV载量与DCs

功能的关系, 国内外报道少见。本研究对乙型肝炎患者DCs内HBV DNA的存在状况进行研究, 力求探讨慢性乙型肝炎患者DCs的功能下降的可能原因。

1 材料和方法

1.1 材料 20例慢性乙型肝炎患者为2008-04/08湖南中医药大学第一附属医院门诊及住院病例, 均为血清HBV DNA阳性患者, 其中男14例, 女6例, 年龄25-46(平均34.9)岁。诊断参照2000年西安全国病毒性肝炎会议的标准^[4], 均排除了甲、丙、丁和戊型肝炎等病毒重叠感染以及其他原因(酒精、药物等)引起的肝脏损害。另取10例健康人作为正常对照。淋巴细胞分离液购于天津灏洋公司; IL-4和GM-CSF购于美国Peprotech公司; RPMI 1640购于美国Gibco公司; 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购于美国Hyclone公司, 荧光标记鼠抗人HLA-DR-PE, CD-1 α -FITC, CD80-FITC, CD86-PE购于美国eBioscience公司; 人IL-12 ELISA试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司; HBV DNA PCR荧光检测试剂盒购于上海科华生物技术有限公司; 丝裂霉素C购于美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 DCs的培养: 按照Romani *et al*分离培养DCs的方法稍作修改^[5]。无菌条件下抽取各组外周血20 mL, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), PBS洗涤2次, RPMI 1640洗涤1次。用含100 mL/L FCS RPMI 1640液调整外周血PBMCs浓度为 3×10^9 /L, 移植入6孔培养板, 每孔3 mL。50 mL/L CO₂ 37℃条件下培养2 h, 吸弃培养上清液, 37℃预热RPMI 1640液轻轻洗涤培养板2次, 祛除非贴壁细胞, 即获贴壁的单个核细胞。往祛除非贴壁细胞的6孔培养板孔内各加3 mL 100 mL/L FCS RPMI 1640培养液, 其中含有GM-CSF 100 μ g/L, IL-4 500 kU/L, 在50 mL/L CO₂ 37℃条件下培养, 隔天换液1次, 吸弃原液1.5 mL, 加同体系培养液1.5 mL。收集第7天悬浮细胞即为DCs。台盼蓝染色测定细胞活力>95%, 计数DCs获得量。

1.2.2 FACS检测DCs细胞表面分子的表达: 在DCs培养的第7天收集细胞, 用PBS洗细胞2次, 稀释成 5×10^8 /L, 加入鼠抗人鼠抗人HLA-DR-PE, CD-1 α -FITC, CD80-FITC, CD86-PE 20 μ L, 轻轻混匀, 4℃温育45 min, 再用PBS洗2次, 流式

■研发前沿

慢性乙型肝炎患者PBMCs通过体外诱导培养产生的DCs存在HBV, 这一现象对DCs和免疫系统功能尤其在慢性乙型肝炎病变过程的影响值得重视。DCs内存在HBV对各种免疫细胞的分化、功能及他们与DCs间的相互作用关系产生影响有待于进一步的研究并加以证实。

■相关报道

Munz *et al*发现, 慢性乙型肝炎患者外周血DCs中可检测到HBV DNA基因片段。而Arima则运用原位杂交PCR和RT-PCR的方法, 从慢性乙型肝炎患者外周血来源的DCs内检测到了HBV DNA和HBV RNA, 并发现其同种异体混合淋巴细胞反应水平下降。Beekebaum *et al*研究表明, 正常人单个核细胞来源的DCs在受到HBV感染后, 表现出抗原提呈功能下降, 同时伴随Th1反应受损。

■创新盘点

目前关于乙型肝炎患者DCs内HBV载量与DCs功能的关系,国内外报道少见。本研究对乙型肝炎患者DCs内HBV DNA的存在状况进行研究,力求探讨慢性乙型肝炎患者DCs的功能下降的可能原因。

表 1 DCs HBV DNA阳性及阴性组DCs表面分子的表达水平 (mean $\pm$ SD, %)

分组	<i>n</i>	HLA-DR	CD80	CD86	CD-1 α
DCs HBV DNA阳性	13	39.17 $\pm$ 6.02 ^{bc}	20.95 $\pm$ 6.32 ^{bc}	25.16 $\pm$ 6.05 ^{bc}	46.03 $\pm$ 5.52 ^{bc}
DCs HBV DNA阴性	7	60.11 $\pm$ 7.92 ^b	35.24 $\pm$ 7.41 ^b	45.30 $\pm$ 8.01 ^b	58.77 $\pm$ 4.12 ^b
正常人	10	82.06 $\pm$ 8.32	49.42 $\pm$ 8.92	84.13 $\pm$ 8.92	69.52 $\pm$ 6.90

^b $P < 0.01$ vs 正常人; ^c $P < 0.01$ vs HBV DNA阴性组。

细胞仪检测HLA-DR、CD-1 α 、CD86、CD80的表达。

1.2.3 ELISA检测DCs培养上清液IL-12的水平:按试剂盒说明书操作。

1.2.4 同种异体混合淋巴细胞反应:取其他健康人外周血,经淋巴细胞分离液分离后获得单个核细胞,注入T细胞尼龙毛柱,37℃孵育1 h后,冲洗出非黏附细胞为同种异型效应T细胞。取同时培养7 d的DCs用50 mg/L的丝裂霉素C 37℃处理45 min后, PBS洗涤3次,悬浮于完全1640培养基中,以1 $\times$ 10⁴/孔加入96孔培养板,分别用患者和正常人的PBMCs作对照组,每组各3个复孔,每孔加入同种T细胞2 $\times$ 10⁵,终体积200 μ L/孔,在37℃、50 mL/L CO₂条件下培养96 h。培养结束后,沉淀细胞加入MTT液(5 g/L)20 μ L/孔,上述相同条件下继续培养4-6 h,每孔加入酸化异丙醇100 μ L,振荡10 min,在波长550 nm处测A值。

1.2.5 HBV DNA的检测:采用实时荧光定量PCR法检测,仪器为杭州博日Line-Gene型全自动定量PCR仪,试剂为上海科华配套试剂,检测灵敏度为5 $\times$ 10⁵ copies/L。DCs培养的第7天,用含100 mL/L FCS RPMI 1640液调整DCs浓度为5 $\times$ 10⁸/L,每个标本取细胞悬液3 mL, PBS洗涤3次,提取DCs内DNA,按试剂盒说明书操作。同时将最后一次洗涤液保留进行HBV DNA的检测,检测方法同上。

统计学处理 对检测的HBV DNA拷贝数取常用对数。对DCs功能的相关指标与HBV DNA的常用对数值用相关分析法进行处理,并对相关系数进行显著性检验,两组数据间的相关关系用直线相关分析方法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 光镜下观察DCs的形态特征 PBMCs培养2 h后见圆形扁平贴壁细胞,培养24 h后可见贴壁单个核细胞聚集成大小不等葡萄串状,黏附于培养板底,尤以边缘为著。第3天可见这部分细胞体积增大,第4天可见部分细胞悬浮于细胞培养

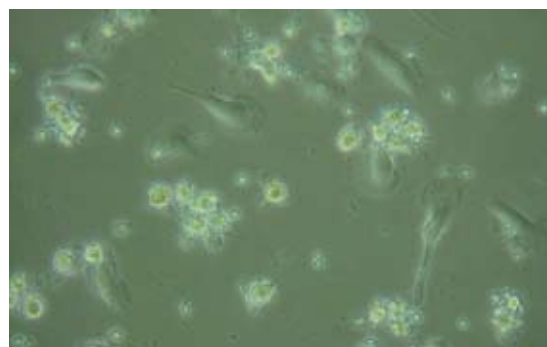


图 1 培养第7天的DCs形态($\times 200$)。

液,第5天可见这部分细胞数目增多,部分细胞出现许多毛刺。第7天培养液中漂浮着大量有明显树突状的大个细胞或细胞团(图1)。

2.2 各组血清及DCs HBV DNA载量 将DCs洗涤液进行HBV DNA的检测,所有标本均未检出HBV DNA,排除了血清污染对实验结果的影响。血清HBV DNA阳性患者20例,13例DCs内可检测到HBV DNA,7例DCs内未检出HBV DNA,DCs内HBV DNA检出率为65.0%。20例患者血清HBV DNA拷贝数的平均数为6.36 $\pm$ 0.33 log10值,13例DCs HBV DNA阳性者DCs HBV DNA拷贝数的平均数为6.07 $\pm$ 0.21 log10值,而7例DCs HBV DNA阴性者及10例正常对照者DCs HBV DNA水平 $< 10^6$ copies/L。

2.3 DCs HBV DNA阳性组及阴性组DCs表面分子的表达水平 DCs HBV DNA阳性组及阴性组HLA-DR、CD80、CD86和CD-1 α 的表达率普遍降低,分别与正常人组比较 $P < 0.01$,尤以DCs HBV DNA阳性组下降更为明显,与DCs HBV DNA阴性组比较 $P < 0.01$,有统计学意义(表1)。

2.4 DCs在MLR中的刺激活性 在同种异体混合淋巴细胞反应中,DCs表现出比自体PBMCs具有更强的刺激T淋巴细胞增殖的能力。DCs HBV DNA阳性组、DCs HBV DNA阴性组及正常对照组刺激T细胞增殖的A值分别为0.32 $\pm$ 0.08、0.59 $\pm$ 0.11、0.71 $\pm$ 0.09,三组之间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$),可见HBV DNA阳性组

DCs刺激T细胞增殖的能力低于HBV DNA阴性组。

2.5 DCs HBV DNA阳性组及阴性组DCs分泌IL-12水平 13例DCs HBV DNA阳性者IL-12水平平均值为 19.67 ± 7.32 ng/L, 7例DCs HBV DNA阴性者IL-12水平平均值为 30.74 ± 8.39 ng/L, 而正常人组为 79.58 ± 6.68 ng/L, 慢性乙型肝炎较正常人组IL-12水平明显下降, $P < 0.01$, 尤以DCs HBV DNA阳性组下降更为明显, 与DCs HBV DNA阴性组比较 $P < 0.01$, 有统计学意义。

2.6 DCs HBV DNA载量与DCs表面分子表达、DCs分泌IL-12水平及DCs刺激同种异体T细胞增殖能力的关系 DCs表面分子的表达、DCs分泌IL-12水平及DCs刺激同种异体T细胞增殖能力与DCs HBV DNA载量呈显著负相关(CD80: $r = -0.623$, $t = 3.839$, $P < 0.01$; CD86: $r = -0.702$, $t = 3.541$, $P < 0.01$; HLA-DR: $r = -0.713$, $t = 7.487$, $P < 0.001$; CD-1α: $r = -0.713$, $t = 7.487$, $P < 0.001$; IL-12: $r = -0.525$, $t = 4.110$, $P < 0.001$; DCs刺激同种异体T细胞增殖能力: $r = -0.841$, $t = 7.103$, $P < 0.001$)。

3 讨论

DCs是人体内功能最强的专职性APC, 是机体免疫功能的始动者, 能显著活化初始T淋巴细胞, 还与单核细胞、内皮细胞及活化的B淋巴细胞一起参与再次免疫应答。其功能缺陷将导致抗原无法被有效地递呈给CD4+Th和CD8+CTL, 从而产生异常的细胞和体液免疫应答。目前不少研究表明, 慢性乙型肝炎患者DCs的功能存在缺陷, 认为这是导致HBV持续感染的重要因素之一^[6-7]。

近年来, 国内外的大量研究表明, 慢性乙型肝炎患者外周血DCs数量减少, 表型不成熟、功能下调, 并且临床往往表现出外周血高滴度的HBV DNA载量, 而且针对HBV的特异性CTL应答很弱, 甚至检测不到^[8]。

HBV DNA是体内HBV复制增殖最直接的指标, 无外源性抗病毒措施干预时, 血清HBV DNA载量的高低可以反映机体免疫系统和HBV之间的作用结果, 而且不同HBV DNA载量组间肝组织炎症程度亦存在明显的差异^[9-10], 因此HBV DNA载量可以作为重要参数来评价机体免疫系统对HBV的免疫应答状态。而DCs内HBV DNA载量反映的是DCs内HBV复制水平的高低, DCs的生物学功能可能受HBV直接影响^[11]。

曾有报道将HBV导入正常人的DCs后发现其表型和功能明显降低。Munz *et al*^[11]发现, 慢性乙型肝炎患者外周血DCs中可检测到HBV DNA基因片段, 这说明DCs可被HBV感染, DCs的生物学功能可能受HBV直接影响。而Arima则运用原位杂交PCR和RT-PCR的方法, 从慢性乙型肝炎患者外周血来源的DCs内检测到了HBV DNA和HBV RNA, 并发现其同种异体混合淋巴细胞反应水平下降, 表明DCs可能作为HBV的肝外贮存场所并与HBV的复制有关^[12]。研究还发现, 慢性乙型肝炎患者DCs的表型以及抗原提呈能力与体内HBV载量密切相关, 表型以及抗原递呈能力良好者病毒载量低, 而表型以及抗原递呈能力差者则病毒载量高^[13]。

Beckebaum *et al*^[14]将HBV颗粒与正常人外周血单个核细胞来源的DCs共培养后, PCR及透射电镜检测发现: DCs内存在HBV, 说明体外培养的DCs亦能被HBV感染, 其机制可能为DCs表达唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR), ASGPR介导细胞的内摄作用, 导致HBV进入DCs内^[15]。本研究将DCs洗涤液进行HBV DNA的检测, 所有标本均未检出HBV DNA, 排除了HBV体外感染DCs的可能, 本研究在DCs内检测到的HBV DNA为患者DCs本身所含有的。

本研究的结果显示, 20例慢性乙型肝炎血清HBV DNA阳性患者, DCs内HBV DNA检出率为65.0%, 说明DCs亦能受到HBV感染。慢性乙型肝炎DCs HBV DNA阳性及DCs HBV DNA阴性患者DCs表面HLA-DR、CD80、CD86和CD-1α的表达均较正常人组明显低下, 且DCs HBV DNA阳性组较DCs HBV DNA阴性组下降更为明显。并且HLA-DR、CD80、CD86和CD-1α等的表达与DCs内HBV DNA载量均呈显著的负相关关系, 而这些分子与DCs的成熟度和功能发挥有密切的关系。提示慢性乙型肝炎患者DCs HBV DNA载量与DCs表面分子表达水平有密切关系, 病毒载量低者表面分子表达水平高, 病毒载量高者表面分子表达水平低。

IL-12是迄今为止所发现的DCs细胞释放的最有效的CTL和NK细胞活性刺激因子, 在机体抗病毒和抗肿瘤的一系列免疫病理条件下均能发挥关键作用。Chouaib *et al*^[16-17]报道在MLR反应阶段, 内源性IL-12的产生对细胞的增殖和CTL分化起重要的作用。因此, IL-12产生的缺失可能是慢性乙型肝炎患者DCs刺激T细胞增殖

■应用要点

寻求恢复或提高患者DCs的功能, 可能将是治疗慢性乙型肝炎的一种新的方法, 国内已开展了DCs疫苗治疗慢性乙型肝炎的研究。研究慢性乙型肝炎患者外周血DCs HBV DNA载量与其功能关系或许能为DCs疫苗治疗慢性乙型肝炎提供一定的基础。

■同行评价

本文探讨了慢性乙型肝炎患者外周血DCs HBV DNA载量与DCs功能的关系, 新颖性较强, 研究内容可信, 具有一定的研究价值。

能力降低的最重要的原因。从我们的实验中发现DCs HBV DNA阳性及DCs HBV DNA阴性患者DCs分泌IL-12水平较正常对照组均明显下降, DCs HBV DNA阳性组较DCs HBV DNA阴性组亦有明显下降, 并且DCs分泌IL-12水平与DCs内HBV DNA水平均呈显著负相关, DCs HBV DNA载量越高, 则DCs分泌IL-12水平越低。说明DCs内HBV DNA载量能影响DCs分泌IL-12水平, 从而进一步影响DCs功能。

总之, 慢性乙型肝炎患者外周血DCs内亦可检测到HBV DNA, 说明DCs亦能受到HBV的感染。而且DCs的表型、刺激同种异体T细胞增殖能力及分泌IL-12能力与DCs内HBV载量呈显著负相关关系, 在一定程度上反映了DCs的功能状态对机体清除HBV的影响。因此, 寻求恢复或提高患者DCs的功能, 可能将是治疗慢性乙型肝炎的一种新的方法。

4 参考文献

- 1 Banachereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- 2 Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001; 44: 199-208
- 3 Arima S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Nuriya H, Kohara M, Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2003; 11: 169-174
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 5 Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151
- 6 Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, Glebe D, Grun S, Strand D, Urban S, Gehring A, Galle PR, Bocher WO. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 61-70
- 7 Wang K, Fan X, Fan Y, Wang B, Han L, Hou Y.

Study on the function of circulating plasmacytoid dendritic cells in the immunoactive phase of patients with chronic genotype B and C HBV infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 276-282

- 8 Takaki A, Tatsukawa M, Koike K, Shiratori Y. [Mechanism of immune surveillance against HBV infection] *Nippon Rinsho* 2004; 62 Suppl 8: 62-65
- 9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Gerken G. DNA-based immunotherapy: potential for treatment of chronic viral hepatitis? *Rev Med Virol* 2002; 12: 297-319
- 10 Gao B, Chen HS, Zhao GM, Zhu L, Ji Y, Fei R, Dai CY, Xu J, Zhu LM, Wei L. [Relationship between the quantities of peripheral dendritic cells and of serum HBV DNA and the inflammatory reaction levels in the liver] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 414-416
- 11 Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202: 203-207
- 12 Arima S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Nuriya H, Kohara M, Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2003; 11: 169-174
- 13 钱峰, 贺永文, 朱传武. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞表型及抗原提呈能力与HBV载量的关系. 肝脏 2005; 10: 8-10
- 14 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 15 Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Kleijmeer MJ, Ait-Yahia S, Ravel O, Vincent C, Vega F Jr, Helms A, Gorman D, Zurawski SM, Zurawski G, Ford J, Saeland S. Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J Immunol* 2001; 167: 5767-5774
- 16 Chouaib S, Chehimi J, Bani L, Genetet N, Tursz T, Gay F, Trinchieri G, Mami-Chouaib F. Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12659-12663
- 17 Lung TL, Saurwein-Teissl M, Parson W, Schonitzer D, Grubeck-Loebenstein B. Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. *Vaccine* 2000; 18: 1606-1612

编辑 李军亮 电编 郭海丽

重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性的变化及其机制

宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 陈秋虹, 黄云花, 梁列新

宋怀宇, 杨建荣, 黄云花, 梁列新, 广西壮族自治区人民医院
广西壮族自治区南宁市 530000

姜春华, 南宁市第四人民医院 广西壮族自治区南宁市
530000

陈秋虹, 广西测试中心 广西壮族自治区南宁市 530000

广西科学基金资助项目, No. 桂科回0639013

作者贡献分布: 本课题具体实施指导; 数据采集分析及论文撰写
由宋怀宇完成; 本课题具体实验实施及标本采集由姜春华完成;
杨建荣为课题的项目负责人, 负责本课题的总体指导; 陈秋虹负
责高效液相色谱分析仪的具体操作和标本的检测分析; 黄云花
负责本课题对照组部分正常人的具体实验实施及标本采集; 梁
列新负责本论文的技术指导。

通讯作者: 杨建荣, 530021, 广西壮族自治区南宁市桃源路6号,
广西壮族自治区人民医院肝胆科. huaiyu_song@sina.com

电话: 0771-2186545

收稿日期: 2008-09-11 修回日期: 2008-10-09

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Alterations of intestinal permeability in chronic severe HBV-infected patients

Huai-Yu Song, Chun-Hua Jiang, Jian-Rong Yang,
Qiu-Hong Chen, Yun-Hua Huang, Lie-Xin Liang

Huai-Yu Song, Jian-Rong Yang, Yu-Hua Huang, Lie-Xin
Liang, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous
Region, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous
Region, China

Chun-Hua Jiang, the Fourth People's Hospital of Nanning,
Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China

Qiu-Hong Chen, Guangxi Test Center, Nanning 530000,
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: Science Foundation of Guangxi Zhuang
Autonomous Region, No. 0639013

Correspondence to: Dr. Jian-Rong Yang, People's Hos-
pital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning
530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China. huaiyu_song@sina.com

Received: 2008-09-14 Revised: 2008-10-09

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the changes of intestinal permeability in chronic severe HBV-infected patients.

METHODS: Thirty chronic severe HBV-infected patients and 30 normal controls were measured for intestinal permeability in terms of lactulos/mannitol ratio (L/M), respectively. The urine

levels of lactulos and mannitol were detected using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector.

RESULTS: Compared with normal controls, the urine level of lactulos was significantly raised in chronic severe HBV-infected patients (0.0860 ± 0.0225 vs 0.0650 ± 0.0270 , $P = 0.002$), while the urine level of mannitol was not affected. A significant rise in urinary L/M ratio was found in chronic severe HBV-infected patients compared with normal controls (0.0430 ± 0.0198 vs 0.0316 ± 0.0134 , $P = 0.011$).

CONCLUSION: In chronic severe HBV-infected patients, the intestinal permeability is raised significantly. The elevated intestinal permeability facilitates endotoxin into the serum, and then causes endotoxemia. In so doing, the raised intestinal permeability may play a very important role in the pathogenesis of heavy degree chronic hepatitis B.

Key Words: Chronic severe hepatitis B; Lactulos; Mannitol; Intestinal permeability

Song HY, Jiang CH, Yang JR, Chen QH, Huang YH, Liang LX. Alterations of intestinal permeability in chronic severe HBV-infected patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3561-3565

摘要

目的: 研究重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性的变化并探讨其病理生理机制。

方法: 采用高效液相色谱蒸发光散射器(HPLC-ELSD)检测30例正常人和30例重度慢性乙型肝炎患者尿中乳果糖和甘露醇排泄率的变化, 以尿乳果糖/甘露醇排泄率的比值(L/M)反映肠黏膜通透性的变化。

结果: 与正常人相比, 重度慢性乙型肝炎患者尿乳果糖的排泄率增加(0.0860 ± 0.0225 vs 0.0650 ± 0.0270 , $P = 0.002$), 尿甘露醇的排泄率无明显变化, 而尿乳果糖/甘露醇排泄率的

■背景资料

有关肠黏膜通透性的改变, 在肝硬化失代偿期、重症胰腺炎、严重烧伤、创伤等疾病领域都有所研究。但在重度慢性乙型肝炎患者, 其肠黏膜通透性有何变化, 对内毒素血症及重度慢性乙型肝炎病程的进展有何影响, 目前国内尚未见临床报道。

■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感染科

■研究前沿

在重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性有何变化,其病理生理机制如何,目前国内尚未见报道。而恰恰是重度慢性乙型肝炎病变程度较重,病情变化快,如果得不到及时的救治,往往会向慢性乙型肝炎(重型)转化,使得救治成功率明显下降。

比值(L/M)明显升高(0.0430 ± 0.0198 vs 0.0316 ± 0.0134 , $P = 0.011$)。

结论: 重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性增高,导致内毒素经肠道途径大量入血,引起内毒素血症,在重度慢性乙型肝炎发生、发展过程中发挥重要的病理生理作用。

关键词: 重度慢性乙型病毒性肝炎; 乳果糖; 甘露醇; 肠黏膜通透性

宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 陈秋虹, 黄云花, 梁列新. 重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性的变化及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3561-3565

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3561.asp>

0 引言

在严重烧伤、多器官衰竭、肝硬化腹水等疾病时,肠黏膜通透性多出现异常并在疾病的发展过程中发挥重要作用。但在重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性有何变化,其病理生理机制如何,目前国内尚未见报道。而恰恰是重度慢性乙型肝炎病变程度较重,病情变化快,如果得不到及时的救治,往往会向慢性乙型肝炎(重型)转化,使得救治成功率明显下降。本研究拟研究重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性的变化并初步探讨其病理生理机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康志愿者(对照组),共30例,来自自愿参加本研究的医护人员及社会志愿者,其中男13例,女17例,年龄19-41(平均年龄31.8)岁。入选标准: 年龄18-60岁,经血清甲、乙、丙、丁、戊肝炎五项、肝肾功能、心电图、胸片等检查均为正常,无慢性胃肠道疾病症状,近1 mo内无急性胃肠道疾病症状的健康志愿者。重度慢性乙型病毒性肝炎患者(实验组)30例,来自于2006-09/2008-06在广西壮族自治区人民医院消化内科以及南宁市第四人民医院肝病科住院的患者,其中男19例,女11例,年龄22-55岁,平均年龄36.4岁。入选标准: 诊断标准参照中华医学会传染病与寄生虫分会,肝病学会2000-09修订的慢性乙型病毒性肝炎(重度)的诊断标准。住院治疗的慢性乙型病毒性肝炎患者,入院后常规检查乙肝血清学标志物,HBV DNA,肝功能(ALT, AST, TBIL, 白蛋白等),血清胆碱酯酶,凝血酶原活动度等指标。达到下列诊断标准的予以入组。临床表现: 有明显或持续的肝炎症状,乏力,纳差伴肝病容,排除

门脉高压症,且ALT或AST反复或持续升高,白蛋白降低或A/G比值异常,除上述条件外伴凡白蛋白 <32 g/L,胆红素 >5 倍正常值上限,凝血酶原活动度 $<60\%$, $>40\%$,胆碱酯酶 <2500 U/L,4项指标中有1项超过上述程度者。对合并其他类型肝炎,试验用药过敏、妊娠及哺乳妇女、合并胃肠道肿瘤,慢性胃肠道疾病,近1 mo内有急性胃肠道疾病症状的予以排除。上述2组人群受试前均签署知情同意书。美国Waters Alliance 2695高效液相色谱系统,Empower色谱工作站,检测器: Waters 2420 ELD检测器。甘露醇和乳果糖标准对照品(美国Sigma公司),乙腈(色谱纯),实验用水均为超纯水。色谱柱: Kvmasil NH_2 5 μm (4.6 mm $\times$ 250 mm),流动相: 乙腈: 水 = 80:20。流速: 1.5 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 方法

1.2.1 给药及标本处理: 受试者均需在试验前晚禁食8 h,于次日清晨排空尿液后空腹口服乳果糖,甘露醇混合液40 mL(内含乳果糖10 g,甘露醇5 g),服药30 min后允许并鼓励饮水,服药2 h后可进食。收集服药后6 h内的尿样,混匀后,记录总尿量,并取20 mL尿样作标本,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存,成批待检。

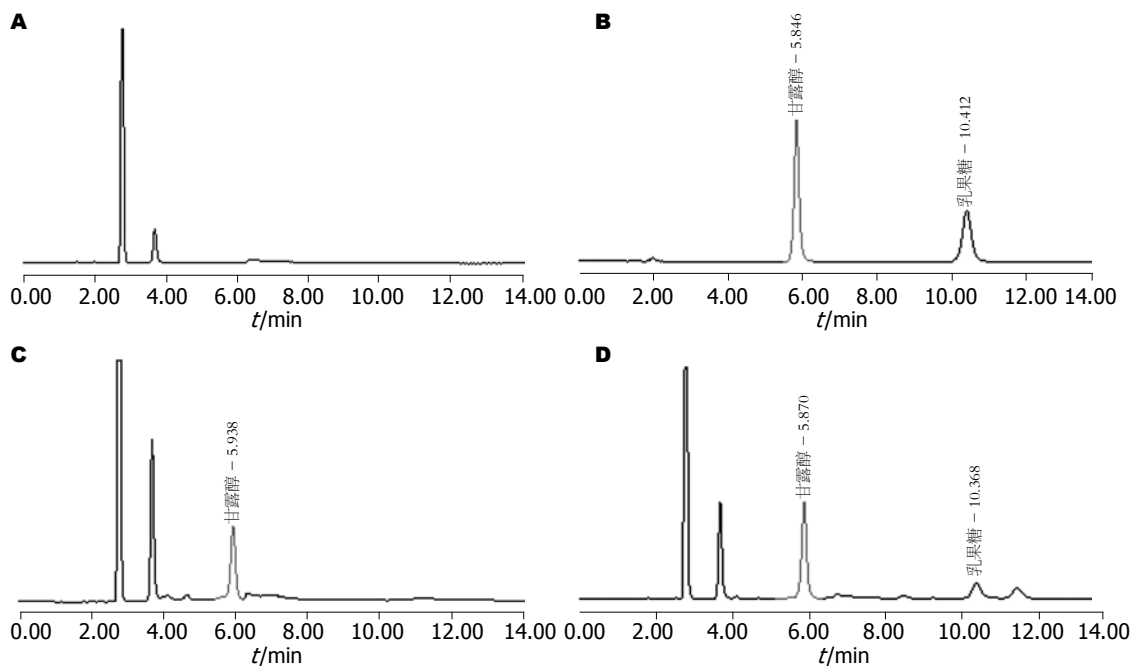
1.2.2 标本预处理: 取尿样2 mL,经日立CR22G高速冷冻离心机离心10 min(18 000 r/min),取上层清液,用0.22 μm 的微孔滤膜滤过,用水稀释后分别进样10 μL 上机检测。

1.2.3 标准溶液的制备及标准曲线的绘制: 精密称取甘露醇和乳果糖标准品,用水溶解,定容于10 mL棕色量瓶中,制得甘露醇浓度为1.474 g/L,乳果糖浓度为1.304 g/L的标准品溶液。精密吸取上述标准品溶液0.5、1.5、2.5、5.0、7.5、10.0 mL至10 mL量瓶中,用水稀释至刻度,依次进样测定。用上述6种不同浓度的标准品溶液分别进样10 μL ,以标准品质量(μg)的对数值为横坐标,峰面积的对数值为纵坐标,将所得数据绘成标准曲线,并进行线性回归。所得甘露醇的线性方程为: $\log Y = 1.2524 \log X - 1.2272$,相关系数0.9983,线性范围0.74-14.7 μg ; 乳果糖线性方程为: $\log Y = 1.3876 \log X - 1.8807$,相关系数0.9980,线性范围0.65-13.0 μg 。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析。线性关系采用直线回归,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为两者之间有显著性差异。

2 结果

在上述实验条件下,甘露醇和乳果糖标准品溶



■ 相关报道

任卫英的报道表明, 在肝硬化鼠小肠壁超微结构明显受损, 紧密连接缺失, 细胞间隙扩大, 炎症细胞浸润增多, 从而导致肠黏膜通透性升高。而郭长青 *et al* 报道在肝硬化失代偿期患者, 其肠黏膜通透性也是升高的, 并且与内毒素血症有密切的关系, 并对肝硬化患者的病情进展产生重要影响。

图 1 甘露醇和乳果糖标准对照品及受试人群尿样色谱图. A: 健康人空白尿样色谱图; B: 甘露醇和乳果糖标准对照品色谱图; C: 健康人口服乳果糖, 甘露醇混合液后尿样色谱图; D: 重度慢性乙型肝炎患者口服乳果糖, 甘露醇混合液后尿样色谱图.

表 1 正常组与实验组患者尿中乳果糖, 甘露醇及其比值 ($n = 30$, mean $\pm$ SD)

	乳果糖($\mu\text{g/L}$)	甘露醇($\mu\text{g/L}$)	乳果糖/甘露醇
正常组	0.0650 ± 0.0270	2.1957 ± 0.7158	0.0316 ± 0.0134
实验组	0.0860 ± 0.0225^b	2.2263 ± 0.7281	0.0430 ± 0.0198^a

$t = 2.624$, $^aP = 0.011$, $t = 3.27$, $^bP = 0.002$ vs 正常组.

液, 尿样中组分均能实现基线分离, 峰形良好 (图1). 甘露醇和乳果糖的保留时间分别为5.8 min和10.4 min.

与正常人相比, 在重度慢性乙型肝炎患者尿乳果糖排泄率, 尿乳果糖/甘露醇比值均增高 ($P = 0.002$ 或 $P = 0.011$). 而尿甘露醇的排泄率无明显变化(表1).

实验组中e抗原阳性及e抗原阴性患者的HBV DNA水平及尿乳果糖/甘露醇比值均未见明显显著性差异(均 $P > 0.05$, 表2).

3 讨论

肠黏膜通透性(intestinal permeability)是指肠黏膜上皮容易被某些物质分子以非载体或通道介导的被动扩散方式通过的特性, 目前国内外常以尿液中乳果糖/甘露醇排泄率的比值(L/M)来间接反映. 而国内仍以高效液相色谱示差检测器法以及电化学检测器法测定L/M比值应用最为广泛^[1-8], 而采用高效液相色谱蒸发光散射检

表 2 实验组中e抗原阳性及e抗原阴性患者的分组比较 (mean $\pm$ SD)

	n	HBV DNA($\times 10^6$)	乳果糖/甘露醇
e抗原阳性	13	4.46 ± 6.74	0.0439 ± 0.0218
e抗原阴性	17	3.61 ± 7.95	0.0416 ± 0.0193

测法测定L/M比值报道极少, 而且缺乏大样本的实际临床应用. 甘露醇和乳果糖属于无紫外吸收物质, 不能用常规的紫外检测器测定其含量, 采用示差检测器检测则有对热不稳定, 灵敏度差等缺点. 而电化学检测器虽然灵敏度高, 选择性好, 但对样品前处理的要求较高. 因为尿液中含无机和有机杂质较多, 容易干扰色谱分析, 因而需繁琐方法预处理净化尿样. 本研究选择蒸发光散射检测器检测肠黏膜通透性(L/M比值)的变化取得满意的临床结果, 该方法准确度高, 重复性好, 操作简便, 标本预处理简单, 值得在临床进一步推广.

■创新盘点

对于肠黏膜通透性测定的方法,本研究采用高效液相色谱蒸发光散射检测法测定国内报道极少,且缺乏大样本的实际临床应用总结。对于重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性的变化及其可能的病理生理机制,国内尚无文献报道,是本研究的创新之处。

乳果糖是双糖,分子质量大,主要通过肠黏膜细胞间的紧密连接透过肠黏膜,这也是细菌及内毒素通过肠黏膜的主要途径。而甘露醇是单糖,分子质量小,主要通过肠黏膜细胞膜上的水溶性微孔通过肠黏膜。一般认为,尿液中乳果糖的排泄率主要反映肠黏膜屏障的变化,而甘露醇的排泄率主要反映肠道总吸收面积的变化,采用乳果糖/甘露醇排泄率的比值(L/M比值)则可以排除胃肠排空时间,心输出量,肾排出量及尿液收集等各方面误差对检测结果的影响,能较为真实地反映肠黏膜通透性的变化。本研究发现,在重度慢性乙型肝炎患者,尿乳果糖的排泄率明显升高($P = 0.002$),尿甘露醇的排泄率变化不大,而尿L/M较正常人增高($P = 0.011$),提示重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性异常增高,而且是以肠黏膜细胞间的紧密连接通透性增高为主,而肠道的总吸收面积无明显变化。

重度慢性乙型肝炎患者出现肠黏膜通透性异常变化的病理生理机制推测有以下几个方面:
(1)肠黏膜的缺血、缺氧及缺血-再灌注损伤。肠黏膜需要充足的血液循环以维护正常的屏障功能。由于肠绒毛的氧交换特点,绒毛顶端的氧张力明显低于动脉^[9]。而重度慢性乙型肝炎患者,肝功能严重损害,对血管活性物质的代谢灭活能力降低,使得肠黏膜血管扩张,血流淤滞,局部血氧交换障碍,并且出现缺血-再灌注损伤^[10],导致肠上皮细胞缺血、缺氧,肠道通透性升高。
(2)重度慢性乙型肝炎患者,由于严重的肝脏炎症,蛋白质分解代谢加快,白蛋白合成功能减退,常出现低白蛋白血症和肠黏膜局部谷氨酰胺摄取和氧化的缺乏,影响肠上皮细胞的供能及增殖、修复^[4,11-13],同时,谷氨酰胺减少导致肠道分泌SIgA减少,肠道免疫屏障受损,细菌及毒素更容易直接损伤肠黏膜^[14],导致肠道通透性升高。
(3)炎症介质及细胞因子的直接损伤。重度慢性乙型肝炎患者,循环血和肠黏膜局部存在多种炎症介质和细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)、 γ -干扰素、白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、血小板活化因子(PAF)等,而研究表明^[15-19],上述炎症介质和细胞因子均可以直接损伤肠黏膜上皮细胞的超微结构(微绒毛和细胞终末网),从而破坏细胞间紧密连接,导致肠黏膜通透性增高。
(4)重度慢性乙型肝炎患者,循环血中一氧化氮(NO)含量明显升高^[20-21],而NO可通过第二信使系统如cGMP等调节肠上皮细胞的紧密连接而维持黏膜屏障功能。高浓度NO则可破坏细胞内

支架,抑制ATP生成,使细胞间紧密连接变得松弛而使肠黏膜处于高通透状态。同时NO还能直接增加回肠黏膜和单层细胞的渗透性及细菌易位^[22-23],导致肠黏膜的通透性增加。(5)重度慢性乙型肝炎患者,肠道运动功能减弱。而肠道运动障碍可以导致胃肠道淤张,肠黏膜上皮血流灌注降低^[24],从而使肠黏膜通透性增加。

本研究实验组中e抗原阳性及e抗原阴性患者肠黏膜通透性的变化经统计分析未见显著性差异($P > 0.05$),分析原因有以下2点:(1)本研究入组患者为重度慢性乙型肝炎患者,入组时均已存在较为严重的肝脏损害,因此二组肠黏膜通透性的变化没有明显差别。(2)细分后2组患者的例数偏少,统计结果代表性欠佳,尚待扩大研究例数后进一步研究证实。

本研究发现,在重度慢性乙型肝炎患者,严重的肝脏炎症损伤可以从多个不同环节导致肠黏膜通透性增高,从而使得大量细菌及内毒素通过肠道进入血循环,形成肠源性内毒素血症。而内毒素血症一方面能够促进重度慢性乙型肝炎病情的发生、发展。另一方面又可以直接损伤肠黏膜,升高肠黏膜通透性,形成恶性循环。因此,重视对重度慢性乙型肝炎患者肠道通透性的研究,早期发现,及时对症处理,对促进重度慢性乙型肝炎患者病情的恢复,防止其重症化,具有十分重要的临床意义。

4 参考文献

- 1 刘放南,谭力,罗楠. 高效液相色谱法检测尿乳果糖/甘露醇排出比值及成人正常值. 肠外与肠内营养 2004; 11: 237-238
- 2 邓高月,刘振邦,徐燕英,刘跃武,何桂珍. 高压液色谱用于肠通透性的测定. 中国微生态学杂志 2000; 12: 242-243
- 3 潘峰,王一健,孙玮,李才安. 高效液相色谱法测定人尿乳果糖及甘露醇. 第三军医大学学报 1998; 20: 550-552
- 4 蒋小华,李宁,李元新,刘放南,谭力,黎介寿. 创伤应激下肠黏膜通透性的改变. 医学研究生学报 2001; 15: 45-46
- 5 胡琳琳,黄宏春. 肝硬化自发性腹水感染患者肠通透性检测的临床意义. 中原医刊 2006; 33: 69-70
- 6 胡燕,黎海芪,阳文琳,陈国民,瞿平. 食物过敏儿童肠道通透性研究. 第三军医大学学报 2005; 27: 1515-1518
- 7 冯立民,王建立,陈海龙,姜希宏. 急性重症胰腺炎肠黏膜屏障功能改变的临床研究. 中国现代普通外科进展 2004; 7: 297-299
- 8 周业平,蒋朱明,孙永华,何桂珍,舒红,王秀荣,马恩陵. 谷氨酰胺双肽改善烧伤患者切痂术后肠黏膜通透性、内毒素血症和预后的研究. 中国临床营养杂志 2003; 11: 14-18
- 9 闫勇,尹致良,田伏洲,李小军. 肠黏膜屏障损害致肠源性内毒素血症. 中国胃肠外科杂志 1999; 2: 246-247
- 10 Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, Rothschild HR.

- Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg* 1991; 126: 211-218
- 11 Ziegler TR. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. *J Nutr* 2001; 131: 2578S-2584S; discussion 2590S
- 12 刘跃武, 蒋朱明, 徐艳英. 化疗后肠屏障功能损害及谷氨酰胺和生长激素对肠粘膜屏障的作用. *中华实验外科杂志* 2001; 18: 27-28
- 13 Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma, and sepsis. *Crit Care Med* 1991; 19: 627-641
- 14 Teran JC, Mullen KD, McCullough AJ. Glutamine-a conditionally essential amino acid in cirrhosis? *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 897-900
- 15 Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990; 259: G859-G864
- 16 Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000; 14: 1749-1753
- 17 Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000; 113: 2085-2090
- 18 Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999; 276: G1279-G1288
- 19 Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erickson EA, Wells CL. Effect of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, and interleukin-4 on bacteria-enterocyte interactions. *J Surg Res* 2002; 104: 88-94
- 20 王凯, 韩利岩, 卢岑, 王兵, 李心河, 王惠敏. 慢性乙型肝炎患者体内一氧化氮和一氧化氮合酶水平的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 142-145
- 21 马清峰, 王威. 慢性乙型肝炎患者血清NO与肝脏炎症的关系. *四川医学* 2008; 29: 95-97
- 22 Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996; 270: G225-G237
- 23 Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 2002; 17: 139-145
- 24 Fink MP, Delude RL. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005; 21: 177-196

■同行评价

本文采用高效液相色谱蒸发光散射器(HPLC-ELSD)检测30例正常人和30例慢性乙型肝炎(重度)患者肠黏膜通透性的变化及进而探讨其机制, 立意较新颖, 是一篇值得临床医生阅读的好文章。

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 2008-11-08)

内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义

俞泽元, 高鹏, 申力, 黄海云, 但杰

■背景资料

近年来,随着人民生活水平提高和饮食结构的改变,NAFLD的发病率呈逐年升高趋势。内质网应激是机体的一种保护机制,但是长期的应激会对机体造成一定的损害,他对应激细胞的结局如抵抗、适应、损伤或凋亡有重要作用,近年来有关其信号通路及效应研究非常活跃,其效应之一即对脂质代谢的影响。目前有关内质网应激与疾病的研究较多,但就内质网应激在非酒精性脂肪肝中作用的有关临床研究国内外较少见。

■同行评议者

张占卿,主任医师,上海市(复旦大学)公共卫生中心

俞泽元,但杰,兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000
高鹏,申力,黄海云,甘肃省人民医院普外科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 此课题在高鹏的指导下由俞泽元设计; 肝组织的取材由高鹏与黄海云完成; 申力进行技术指导并提供了分析工具; 研究过程由俞泽元与但杰操作完成; 数据分析由俞泽元,申力及但杰完成; 本文写作由俞泽元完成; 高鹏对文章进行批评性审阅。

通讯作者: 高鹏, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院普外科, gaopengl2@yahoo.com.cn

电话: 0931-8281965

收稿日期: 2008-07-20 修回日期: 2008-08-26

接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-11-08

Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human nonalcoholic fatty liver and its clinical significance

Ze-Yuan Yu, Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Jie Dan

Ze-Yuan Yu, Jie Dan, Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Peng Gao, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. gaopengl2@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-20 Revised: 2008-08-26

Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To detect the expression of GRP94 in human nonalcoholic fatty liver injury, and to explore the mechanism of human nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Using immunohistochemistry and RT-PCR, GRP94 protein and mRNA expression were detected in fatty liver specimens and normal liver specimens. Hepatic steatosis, inflammation and necrosis were graded by routine H&E staining of liver sections, and their correlations were analyzed.

RESULTS: Steatosis, inflammation and necrosis were markedly increased in nonalcoholic fatty

liver group than in the control group (3.89 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.4 ; 3.67 ± 0.49 vs 0 ; 0.44 ± 0.51 vs 0 , $P < 0.01$ or 0.05). The expression of GRP94 mRNA and its protein expression were enhanced significantly in nonalcoholic fatty liver group than in the normal control group (0.86 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 ; 0.34 ± 0.01 vs 0.31 ± 0.01 , both $P < 0.01$). The expression of GRP94 mRNA and its protein expression were positively associated with steatosis, inflammation and necrosis scores ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The excessive expression of GRP94 could participate in the development of nonalcoholic fatty liver disease.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; GRP94; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Yu ZY, Gao P, Shen L, Huang HY, Dan J. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human nonalcoholic fatty liver and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3566-3570

摘要

目的: 检测非酒精性脂肪肝患者肝组织中糖调节蛋白94的表达情况, 探讨非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制。

方法: 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法和免疫组化法检测脂肪肝组和正常对照组肝组织中糖调节蛋白94基因和蛋白表达, HE染色观察肝脏脂肪变性、炎症活动和坏死, 并进行相关分析。

结果: 非酒精性脂肪肝组脂肪变性、炎症评分及坏死评分较正常对照组明显增加, 差异具有统计学意义(3.89 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.4 ; 3.67 ± 0.49 vs 0 ; 0.44 ± 0.51 vs 0 , $P < 0.01$ 或 0.05)。与正常组比较, 脂肪肝患者肝组织糖调节蛋白94 mRNA和蛋白表达明显增强(0.86 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 ; 0.34 ± 0.01 vs 0.31 ± 0.01 , 均 $P < 0.01$)。糖调节蛋白94 mRNA和蛋白表达与脂肪变性、炎症评分及坏死评分明

呈正相关($P<0.01$).

结论: 非酒精性脂肪肝引起的肝脏损害可能与糖调节蛋白94表达有关.

关键词: 非酒精性脂肪肝; 糖调节蛋白94; 免疫组织化学; 半定量逆转录聚合酶链反应

俞泽元, 高鹏, 申力, 黄海云, 但杰. 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3566-3570

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3566.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝发病率正逐年升高, 已经成为全球范围内普遍存在的一种慢性肝病和其他疾病的辅助因素^[1-3]. 研究显示约20%的非酒精性脂肪肝炎(NASH)患者可进展为肝硬化, 甚至发生肝癌^[4]. 糖调节蛋白94(glucose-regulated protein, GRP94)是细胞内质网中的一种糖蛋白, 是一种压力诱导蛋白, 为相对分子质量 90×10^3 的热休克蛋白(HSP90)家族, 能调节蛋白质的折叠、传递和降解, 该家族蛋白具有分子伴侣功能, 与多种疾病相关, 因此又称为内质网分子伴侣^[5]. 本研究通过检测GRP94在非酒精性脂肪肝组织中的表达, 探讨其在该病中的致病作用.

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象均来自2007-09/2008-04在甘肃省人民医院行腹部手术时, 经患者本人同意并签字, 并经医学伦理委员会同意取得. 非酒精性脂肪性肝病组18例, 男/女: 10/8, 平均年龄 50 ± 6.25 岁, 诊断标准符合2006-02中华医学会肝病学分会通过的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南”^[6], 术前检查提示有脂肪肝并经活检证实, 并排除病毒性、药物性、自身免疫性肝病. 非脂肪肝对照组10例, 暴露因素相似, 无肝脏疾病, 男/女: 5/3, 平均年龄在 50 ± 4.32 岁, 经转移性直肠癌手术时取得, 并经病理学证实为未发现癌转移的正常肝组织. 所有取得的脂肪肝组织和正常对照肝组织各0.2 g左右, 再分成两半, 一半于15 s内迅速置液氮冷冻, -80°C 低温冰箱保存; 另一半置40 g/L甲醛溶液内固定.

1.2 方法

1.2.1 组织病理学检测: 常规HE染色, 评价肝组织脂肪变性、炎症坏死等病理变化. 脂肪变性评分为: 0(无), 1(肝细胞含脂滴 $\leq 25\%$), 2(肝细胞含脂滴26%-50%), 3(肝细胞含脂滴51%-75%)

及4(肝细胞含脂滴 $>75\%$). 根据汇管区、肝叶内炎症细胞浸润程度将炎症评分为: 0(无), 1(轻度), 2(轻度), 3(中度)和4(重度). 坏死评分为: 0(无), 1(轻度), 2(轻度), 3(中度)和4(重度).

1.2.2 免疫组化检测GRP94蛋白表达: 标本用甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片4 μm 厚, 行免疫组化染色(SP法). 即用型GRP94兔抗人多克隆抗体和SP法免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司. GRP94主要表达在细胞质内, 呈棕黄色颗粒. 光镜下每张切片随机选取6个不重叠视野, 采用全自动医学彩色图像分析系统, 测定平均吸光度(A), 计算每组平均值, 反映阳性强度.

1.2.3 RT-PCR检测GRP94 mRNA: 肝组织标本于匀浆器内研磨后, TRIzol试剂(上海生工)提取总RNA, 并逆转录合成cDNA. 以cDNA为模板进行PCR扩增. GRP94和GAPDH均由上海生工合成, GRP94正义链: 5'-CAG TTT TGG ATC TTG CTG TGG-3', 反义链: 5'-CAG CTG TAG ATT CCT TTG C-3', 扩增片段全长为274 bp; 磷酸甘油脱氢酶基(GAPDH)作为内对照, 正义链: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 反义链5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', 扩增片段全长为226 bp. 反应条件为: 95°C 5 min后, 94°C 1 min, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 循环30次, 最后 72°C 10 min. 以GAPDH作为内参照, 反应条件为 95°C 5 min后, 95°C 30 s, 56°C 45 s, 72°C 1 min, 循环35次, 最后 72°C 10 min. PCR反应产物经过12 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪观察拍照.

统计学处理 采用SPSS10.0统计学软件进行用t检验和Pearson相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病理学观察 HE染色光镜下观察正常组肝脏形态无明显异常. 脂肪肝组肝组织均见重度脂肪肝(即肝脂肪变性和脂肪贮积的肝细胞占肝小叶2/3以上或者肝细胞弥漫脂肪变性呈鱼网状), 小叶内见局灶性肝细胞坏死, 有明显炎性细胞浸润, 肝细胞广泛的气球样变.

2.2 肝脏脂肪变性、炎症及坏死变化 非酒精性脂肪肝组较正常对照组明显增加, 有显著的差异, 有统计学意义(表1).

2.3 GRP94蛋白表达变化 免疫组化染色结果显示, GRP94蛋白染色定位于肝细胞胞质, 正常组检测到肝细胞胞质中, 呈散在分布的浅黄色颗粒. 非酒精脂肪肝组肝组织可见大量棕褐色

■ 相关报道

国内外研究报道内质网应激在酒精性脂肪肝中起着重要作用, 但酒精肝和非酒精性脂肪肝在病理学表现上基本一致. 还有研究报道在非酒精性脂肪肝时存在高半胱氨酸血症, 他是内质网应激的重要诱导因素. 同时有报道显示细胞色素P450的激活也是内质网应激的重要原因.

■创新盘点

本文从基因和蛋白水平检测了内质网分子伴侣在非酒精性脂肪肝中表达明显增强,并且与病理变化做了相关分析,从而证明了非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。

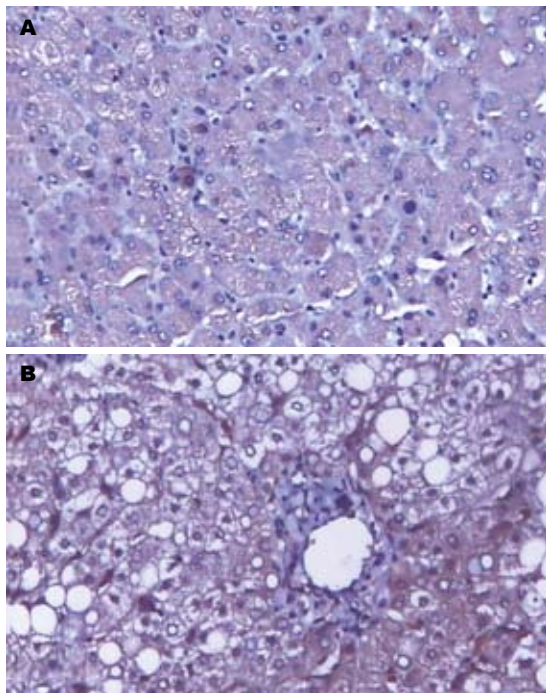


图1 GRP94蛋白表达变化(免疫组化染色 $\times 100$)。A: 正常对照组; B: 脂肪肝组。

颗粒沉积,其表达较正常组明显增强,差异有非常显著性意义(图1)。采用全自动医学彩色图像分析系统,测定正常对照组、脂肪肝组平均吸光度 A 值分别为 0.31 ± 0.01 、 0.34 ± 0.01 ,二者进行比较,差异有显著的统计学意义($t = 9.733$, $P = 0.000$)。

2.4 GRP94 RNA表达 正常对照组和脂肪肝组的GRP94 mRNA表达灰度值 A 值分别为 0.37 ± 0.03 、 0.86 ± 0.02 ,二者进行比较,差异具有显著的统计学意义($t = 49.186$, $P = 0.000$,图2)。

2.5 肝组织GRP94蛋白和GRP94 RNA表达与肝组织病理学改变的相关性 Pearson相关分析表明GRP94蛋白和GRP94 RNA表达增强与脂肪变性、炎症、坏死具有明显的正相关,其结果显示GRP94蛋白和基因的表达增强在非酒精性脂肪肝的发生中起着重要作用,其表达在脂肪变性、炎症、坏死越严重时越为显著(表2)。

3 讨论

NAFLD是一种无过量饮酒史致肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积,炎症和纤维化为特征的疾病。目前有关研究大多数集中在以胰岛素抵抗为发端的肝内脂质沉积,继发以线粒体、细胞色素P450-2E1(CYP2E1)为中心的氧自由基形成、脂质过氧化并最终导致肝实质损伤、蛋白质变性、基因突变等一系列病理结果的“二次

表1 肝脏脂肪变性、炎症及坏死比较(mean $\pm$ SD)

	<i>n</i>	脂肪变性程度	炎症积分	坏死积分
脂肪肝组	18	3.89 ± 0.32^b	3.67 ± 0.49^b	0.44 ± 0.51^a
正常组	10	0.20 ± 0.42	0	0

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组。

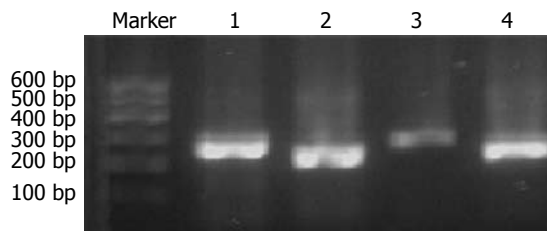


图2 GRP94RNA表达。1: 脂肪肝组GRP94; 2: 脂肪肝组GAPDH; 3: 正常对照组GRP94; 4: 正常对照组GAPDH。

打击”学说^[7],但其确切发病机制至今尚未完全明了。内质网是调节细胞内蛋白质合成后折叠与聚集、细胞应激反应及细胞内钙离子水平的细胞器。内质网应激是指由于某种原因使细胞内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程,可促进内质网对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的处理,从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活,但长时间的内质网应激可引起细胞凋亡^[8]。他作为作为脂质代谢失调、凋亡等相关性病理状态的一个原因,近来日益受到人们的重视。越来越多的研究表明^[9-12]内质网应激在肝疾病(脂肪肝、病毒性肝炎)糖尿病、神经元变性等疾病中起重要作用。研究表明^[13]在酒精性脂肪肝中GRP94表达明显增强,内质网应激参与了酒精性肝损伤的病理生理过程。而酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝的病理表现基本一致,因而推测GRP94也参与了非酒精性脂肪肝的形成。还有国内外研究^[14-16]表明非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸明显升高,他是内质网应激的重要诱导因素,从而激活肝细胞内质网应激。另国内研究^[10,17]报道内质网应激在非酒精性脂肪肝的形成中起着重要的作用。因此考虑内质网分子伴侣GRP94参与了非酒精性脂肪肝的形成。目前,有关GRP94与非酒精性脂肪肝形成关系国内外鲜有报道,尤其在临床试验方面,有少数报道均在动物实验方面。本实验中正常对照组肝组织结构正常,脂肪肝组均有明显的脂肪变性、炎症、坏死,采用RT-PCR和免疫组化方法对脂肪肝组GRP94基因转录及蛋

表 2 GRP94蛋白和RP94RNA表达与肝组织病理学改变的相关性 (1)

指标	脂肪变性程度	炎症积分	坏死积分
GRP94蛋白表达	0.981($P = 0.000$)	0.989($P = 0.000$)	0.396($P = 0.037$)
GRP94RNA表达	0.900($P = 0.000$)	0.871($P = 0.000$)	0.474($P = 0.011$)

白翻译水平检测显示, 脂肪肝组GRP94 mRNA和蛋白表达水平均较正常组显著增加, 提示内质网应激参与了非酒精性脂肪肝的病理生理过程。相关分析表明GRP94基因及蛋白表达与脂肪变性、炎症、坏死积分成正相关, 提示他在肝脏病理学改变越严重的部位表达越强, 他有可能是促进脂肪肝进展的重要因素。

在非酒精性脂肪肝中, 尤其是NASH时, 产生大量的活性氧即反应性氧(ROS)包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基以及有高活性的三线态氧和单线态氧, 他对组织有强大的破坏作用, 他可以氧化大分子物质引起多聚不饱和脂肪酸、蛋白质、DNA损害, 同时还可以诱导细胞色素P450在肝细胞内的表达, 从而在非酒精性脂肪肝的发生和发展起重要的作用, 并被医学界广泛接受^[17,18-20]。研究发现^[20]非酒精性脂肪肝时细胞色素P450处于高表达状态, 从而促进未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)和内质网超负荷反应(endoplasmic overloaded response, EOR)通路, 促进内质网应激的发生, 从而进一步推测非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。另外由于NASH时具有明显的同型半胱氨酸血症, 他是内质网应激的重要因素^[21-22], 也能够说明非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。而内质网应激时胆固醇被消耗, 进而激活固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP), 并与SREBP裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)形成复合物。酶解的SREBP成为转录因子进入胞核, 调控靶基因的转录, 使HMG-CoA还原酶、乙酰辅酶A羧化酶等合成增多, 促进脂质的沉积与合成, 促进脂肪肝的形成^[22-23], 从而说明内质网应激在非酒精性脂肪肝的发生发展中有着重要作用。目前公认, 发生内质网应激的标志是组织中GRP94、GRP78等内质网分子伴侣表达上调^[5], 因此本研究选用GRP94作为反映内质网应激敏感指标, 在临床实验上来证明非酒精性脂肪肝患者存在内质网的应激。我们的实验证实非酒精性脂肪肝患者的肝组织中GRP94的蛋白和基因表达处于高表达, 并且与肝脏的病理学改变

呈正相关, 从而证实了内质网应激参与了非酒精性脂肪肝的病理生理过程, 是其发病机制之一。因此应用相应药物干预以阻断或抑制肝细胞内质网应激可能减弱脂质合成, 为非酒精性脂肪肝病的防治提供新的靶点。

4 参考文献

- Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S5-S10
- Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: cofactor in other liver diseases. *Hepatology* 2005; 42: 5-13
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; 29: 1325-1330
- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 134-140
- Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 2004; 28: 51-65
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 1-3
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Szczesna-Skorupa E, Chen CD, Liu H, Kemper B. Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome p450 overproduction. *J Biol Chem* 2004; 279: 13953-13961
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656-2664
- 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义. 第三军医大学学报 2006; 28: 1063-1065
- Kaplowitz N, Than TA, Shinohara M, Ji C. Endoplasmic reticulum stress and liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 367-377
- Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 444-452
- 龚作炯, 王鲁文, 陈瑞, 张频. 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在大鼠酒精性肝损伤中的高表达和意义. 肝脏 2006; 11: 167-169
- 沈雄文, 孙国红, 孙关忠, 毛飞. 肝损伤时血清同型半胱氨酸的浓度变化. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 242-242
- 杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕. 非酒精

■应用要点

本文论证了内质网应激参与了非酒精性肝损伤的病理生理过程, 因此应用相应药物干预以降低肝细胞内质网应激, 为非酒精性脂肪肝的治疗策略提供了新的思路。

■同行评价

本研究资料比较宝贵,结果可信,结论可靠,但逻辑性有待提高。

- 性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度及叶酸与维生素B12浓度变化及相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1449-1452
- 16 Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1448-1455
- 17 黄丹文, 晏春根, 朱东方, 倪培华. SREBP-1C、GRP-94在小鼠肝细胞脂质代谢中的作用. 基础医学与临床 2007; 27: 509-513
- 18 Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62
- 19 Hayashi S, Yasui H, Sakurai H. Essential role of singlet oxygen species in cytochrome P450-dependent substrate oxygenation by rat liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 14-23
- 20 Niemelä O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 893-901
- 21 Roblin X, Pofelski J, Zarski JP. [Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine] *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 415-420
- 22 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 23 Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S16-S24

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 2008-11-08)

经导管动脉栓塞治疗急性十二指肠溃疡大出血29例

王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充

王永利, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充, 同济大学附属上海第十人民医院介入科 上海市 200072

程英升, 上海交通大学附属第六人民医院介入影像科 上海市 200233

作者贡献分布: 王永利和程英升对本文贡献均等; 王永利收集资料、分析病例并写作; 程英升修改、润色; 文章涉及的病例手术操作分别由王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武及徐霁充完成。

通讯作者: 程英升, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院介入影像科. cjr.chengysh@vip.163.com

电话: 021-64823392

收稿日期: 2008-08-26 修回日期: 2008-09-28

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-08

Transcatheter arterial embolization for patients with acute massive hemorrhage of duodenal ulcer: an analysis of 29 cases

Yong-Li Wang, Ying-Sheng Cheng, Jia-Xing Zhang, Fu-Ming Ru, Chuan-Wu Cao, Ji-Chong Xu

Yong-Li Wang, Jia-Xing Zhang, Fu-Ming Ru, Chuan-Wu Cao, Ji-Chong Xu, Department of Interventional Radiology, Affiliated 10th people's hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Ying-Sheng Cheng, Department of Interventional Radiology, Affiliated 6th People's Hospital of Shanghai Jaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Ying-Sheng Cheng, Department of Interventional Radiology, Affiliated 6th People's Hospital of Shanghai Jaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. cjr.chengysh@vip.163.com

Received: 2008-08-26 Revised: 2008-09-28

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of emergency transcatheter arterial embolization (ETA) for patients with acute massive hemorrhage of duodenal ulcer.

METHODS: Twenty-nine consecutive patients with acute massive bleeding of duodenal ulcer admitted to our hospital from 1997 through 2007 were analyzed. Supers elective angiographies at celiac arteries, gastroduodenal arteries were performed to find out the bleeding sites before ETA, then, embolotherapy was done with gelatin sponge particles or microstrips via 5French angiographic catheter or 3French microcatheter.

After ETA, another superior mesenteric arterioangiography was undertaken in case of collateral circulation supplied to areas of duodenal ulcer. Technique success rate and clinical success rate were analyzed. Changes of the mucous membrane, were observed using endoscopy following ETA.

RESULTS: Angiographies showed active bleeding with extravasation of contrast medium in 7 cases with 24% positive rate of bleeding at celiac arteries, and in 19 cases, 65.5% at gastroduodenal arteries. No bleeding signs of angiography were shown in 3 cases who undertook endoscopy prior to ETA. Twenty-six patients achieved immediate hemostasis and technique success rate reached 90%. No hemostasis was observed in 27 patients within 30 days after ETA and clinical success rate was 93%. Recurrent hemorrhage occurred in 2 patients who drank wine a lot were treated by a second embolotherapy in the same way. Five patients underwent transient ischem with light abdominal pain under xiphoid, spontaneous restoration without special treatment. No mucous necrosis happened to 29 cases for ischem of gastroduodenal arteries embolized.

CONCLUSION: Transcatheter arterial embolization is an effective and safe measure to control acute massive bleeding of duodenal ulcer.

Key Words: Transcatheter embolization; Massive bleeding; Duodenal ulcer; Angiography

Wang YL, Cheng YS, Zhang JX, Ru FM, Cao CW, Xu JC. Transcatheter arterial embolization for patients with acute massive hemorrhage of duodenal ulcer: an analysis of 29 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3571-3575

摘要

目的: 评价急诊经导管动脉栓塞术(emergency transcatheter arterial embolization, ETA)治疗十二指肠溃疡大出血的有效性和安全性。

方法: 收集1997-01/2007-11我院ETA治疗的十二指肠溃疡动脉性大出血的29例患者资料。分别行腹腔干动脉、胃十二指肠动脉造影, 以明确出血动脉, 采用明胶海绵颗粒或条经造影

■背景资料

胃十二指肠溃疡引起的动脉性上消化道出血, 来势凶猛, 以急诊入院抢救, 有时分秒必争, 急诊内镜检查和内镜治疗是有效手段之一, 但其再出血率达14.1%, 难以重复实施。尤其对于老年体弱、多脏器衰竭的患者。有时甚至出血的急性期对有些年轻的患者而言, 其家属或监护人也拒绝接受内镜诊治。

■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科

■相关报道

Toyoda *et al*报道11例十二指肠溃疡内镜治疗后难以控制出血, ETAE治疗10例出血停止, 有效率91%, 1例再出血为动脉粥样硬化只能采用胃十二指肠动脉近端栓塞, 由于栓塞远端血管建立了侧支循环导致再出血。

导管或微导管栓塞胃十二指肠动脉或其出血分支动脉, ETAE后均行肠系膜上动脉造影, 排除侧支循环对溃疡区域供血。分析ETAE的技术成功率和临床成功率, 内镜观察十二指肠球部动脉栓塞区黏膜改变。

结果: 导管位于腹腔干动脉造影, 出现造影剂外渗7例, 出血阳性率24%; 胃十二指肠动脉造影, 造影剂外渗、涂抹肠黏膜19例, 出血阳性率65.5%; 3例内镜明确诊断十二指肠溃疡, 但胃十二指肠动脉造影出血阴性。1例ETAE后, 有肠系膜上动脉的胰十二指肠前下、后下弓动脉侧支供血, 再予以微导管栓塞肠系膜上动脉上述两分支动脉。ETAE即刻止血26例, 技术成功率90%; ETAE后30 d内未再出血27例, 2例饮酒再出血, 再行ETAE, 临床成功率93%。5例出现一过性剑突下隐痛, 未作处理自行缓解。19例患者ETAE术后内镜检查, 10例ETAE前已查内镜者7例治疗后复查内镜, 显示动脉栓塞区域的十二指肠黏膜呈苍白改变, 无缺血坏死病例。

结论: 明胶海绵颗粒或条行ETAE是急诊治疗十二指肠溃疡性动脉出血的迅捷、有效和安全手段。

关键词: 急诊经导管栓塞; 大出血; 十二指肠溃疡; 血管造影

王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充. 经导管动脉栓塞治疗急性十二指肠溃疡大出血29例. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3571-3575

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3571.asp>

0 引言

十二指肠溃疡大出血为急诊常见疾病, 病变好发于青壮年, 尽管内镜诊断和外科治疗提高了患者的疗效, 但死亡率并没有下降^[1]。尤其在内镜确诊并治疗后再出血的患者群中, 首选手术治疗作为补救手段, 而多数患者体质虚弱, 生命指征不平稳, 难以接受二次内镜或手术治疗。伴随着介入放射的发展, 急诊经导管动脉栓塞术(emergency transcatheter arterial embolization, ETAE)因其微创性、可重复性、有效性和安全性被用于十二指肠溃疡出血的急诊治疗^[2]。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-01/2007-11收集我院十二指肠溃疡大出血急症经导管动脉栓塞术治疗病例29例, 其中男18例, 女11例, 年龄16-67(平均年龄36)岁。所

有病例均经内窥镜确诊, 10例患者血管造影和动脉栓塞前接受过内镜检查明确十二指肠溃疡和电凝治疗, 其中有3例再经手术治疗后再出血, 行ETAE; 19例患者由急诊室直接送介入放射科行血管造影诊断和ETAE, 治疗后3-5 d内窥镜再次明确十二指肠溃疡诊断。治疗前输血6-11单位, ETAE后输血2-4单位, 旨在纠正重度贫血, 并非纠正血容量和恢复血压。

1.2 方法

1.2.1 ETAE操作方法及程序: 在数字减影血管造影机(DSA)下, 以改良Seldingge's穿刺技术穿刺右或左股动脉, 送入6F动脉导管鞘(Japan Terumo), 股动脉显著迂曲的高龄患者, 改用6F抗折导管鞘打开迂曲血管, 便于导管超选择插管。5F Rosch或Yasiro造影导管先行腹腔动脉干造影, 再以0.035 inch超滑黑导丝导引, 将造影导管超选至胃十二指肠动脉造影; 如患者血管迂曲明显, 采用同轴导管技术将3F SP微导管(Japan Terumo)在造影导管支撑下超选择插管至胃十二指肠动脉或其分支动脉造影。有明确的分支动脉出血或微导管能够到达的出血分支动脉, 则使用微导管技术。本文中17例采用微导管栓塞, 其中经微导管栓塞出血的分支动脉14例, 栓塞十二指肠动脉3例; 12例使用5F导管栓塞。明确出血部位后, 造影导管或微导管放置在出血动脉的近端, 再经造影导管或微导管注入适量明胶海绵颗粒或海绵条。海绵颗粒规格: 1 mm×1 mm×1 mm; 海绵条规格: 5 mm×1 mm×1 mm。在持续透视下以造影剂推注栓塞剂, 一旦相应的出血动脉分支或胃十二指肠动脉造影剂流动缓慢或造影剂滞留即停止注入海绵条或海绵颗粒。胃十二指肠动脉栓塞结束后必须再行肠系膜上动脉造影, 防止来源于肠系膜上动脉分支—胰十二指肠前下、后下弓动脉建立侧支供血, 如造影发现侧支供血存在, 有再出血可能, 必须用微导管行上述动脉栓塞。

栓塞术后予以内科保守治疗: 给予抑制胃酸分泌、胃黏膜保护剂和止血, 补液纠正低血容量。术前没有内镜检查的出血停止后3-5 d, 作内窥镜和螺旋杆菌(*H pylori*)相关检查, *H pylori*阳性者按正规抗*H pylori*方案, 口服用药。2000年前门诊和信件随访, 此后, 门诊结合电话随访, 随访时间3-6 mo。

1.2.2 疗效和安全性评价: ETAE后造影出血动脉闭塞, 或造影剂外渗消失, 血压稳定; ETAE后30 d内未再出血, 随访期间3-6 mo内大便潜血试验

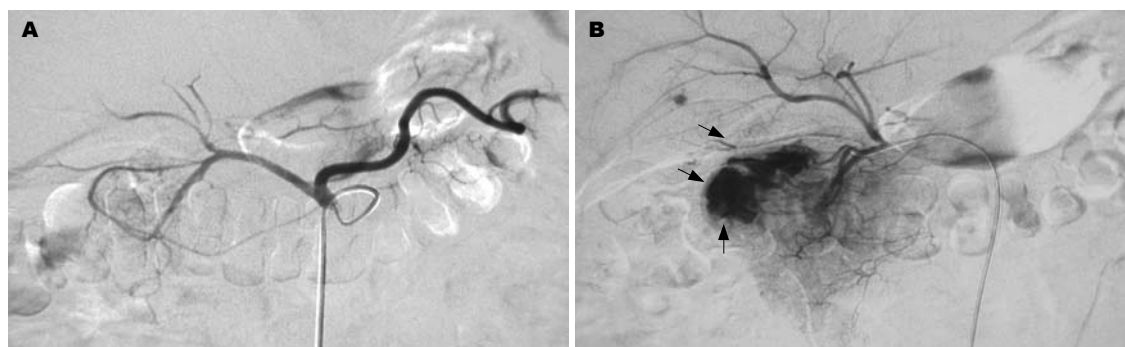


图1 造影导管位置对出血征象的影响. A: 导管头端位于腹腔动脉干造影时未能显示胃十二指肠动脉出血征象; B: 导管超选至胃十二指肠动脉起始处造影可见造影剂外逸、涂抹十二指肠黏膜(箭).

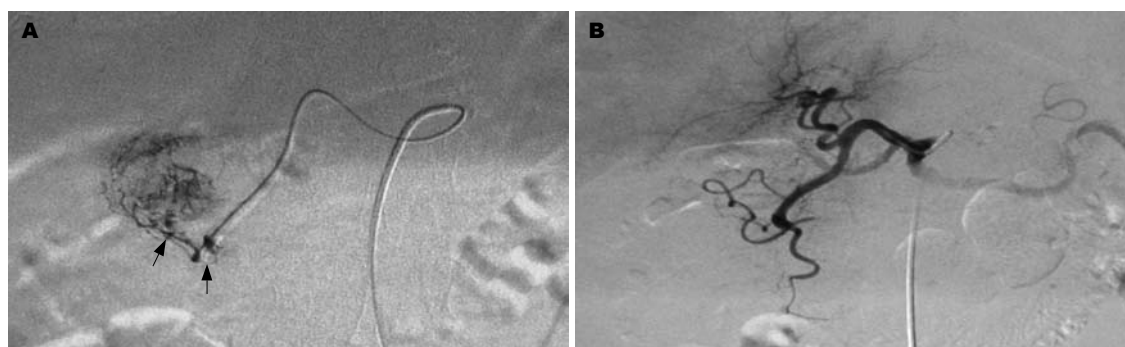


图2 微导管栓塞胃十二指肠分支前后血管造影变化. A: 微导管超选择至胃十二指肠动脉分支造影见造影剂外逸(箭示); B: 经微导管栓塞治疗后造影复查出血停止, 出血动脉远端保持通畅, 避免大范围正常组织缺血.

■应用要点

急诊经导管动脉栓塞术即刻止血技术成功率90%; 临床成功率93%. 无胃、肠缺血坏死病例发生, 微创、可重复性强. 本方法是急诊治疗十二指肠溃疡性动脉出血的一种安全、有效手段.

阴性. ETAE严重并发症为十二指肠球部梗塞或缺血坏死穿孔, 表现持续性上腹部(剑突下)剧烈疼痛, 或腹膜刺激征、肌卫征.

血管分级说明: 1级动脉为腹主动脉, 2级动脉为腹腔干动脉, 3级动脉为十二指肠动脉. 4级动脉为十二指肠动脉分支动脉(本文血管分级为作者定义, 有待进一步商榷).

2 结果

29例患者中, 3例伴有多脏器功能衰竭, 7例高龄患者. 导管位于腹腔干动脉(2级血管开口处)造影发现出血的有7例, 阳性率为24%, 在胃十二指肠动脉造影(3级血管开口), 发现出血征象有19例, 阳性率达66%, 3例造影未见明显出血, 阴性所占比率10%. 出血表现: 腹腔干动脉造影出血多数表现为造影剂小片状聚集或不显影, 胃十二指肠动脉造影出血表现为造影剂聚集成湖状, 量大涂抹十二指肠壁(图1-2). ETAE术后即刻止血26例, 技术成功率达90%. 3例由于造影时未见明显造影剂外逸表现, 故不纳入技术成功率的计算中. 29例患者ETAE后血压均平稳, 术后有4例患者由于ETAE前出血量大, 血红蛋白在4.5-5.0 g/L, 为纠正贫血, 输注红细胞悬液2-4单

位. 较之ETAE前输注红细胞悬液4-11单位显著下降. 临床成功率达93%(27/29), 30 d内仅2例因大量饮酒导致溃疡复发出血, 再行造影后以同样的技术栓塞治疗, 3-6 mo随访, 仅1例复发, 再行ETAE治疗. 3例复发出血的患者首次造影时均表现为出血阳性.

ETAE术后由于急性缺血患者一过性上腹部疼痛5例, 未作处理, 症状自行缓解. 没有出现胃十二指肠因严重动脉梗塞、缺血或穿孔所致持续性上腹部剧痛、肌卫征等腹膜刺激征.

ETAE术后内镜检查有19例患者, 10例ETAE治疗前已查内镜者中7例治疗后复查内镜. 内镜显示动脉栓塞区域的正常十二指肠黏膜呈苍白改变, 无缺血坏死病例.

3 讨论

十二指肠溃疡所致急性动脉性上消化系出血内科保守治疗疗效欠佳. 内窥镜检查 and 内镜下治疗是其公认的方法. 首次内镜治疗后再出血发生率约14.1%^[3], 可行二次内镜治疗, 可重复性差, 二次内镜治疗后仍有可能再出血, 外科手术则成为其继用治疗手段. 然而, 对于高龄同时伴发多种疾病^[4], 以及手术后患者, 再出血是

■同行评价

本文对29例十二指肠溃疡动脉性大出血采用急诊经导管动脉栓塞术治疗,急诊经导管动脉栓塞术即刻止血技术成功率90%,临床成功率93%,无肠缺血坏死病例发生,可见本方法是急诊十二指肠溃疡性动脉出血的一种安全手段,值得临床医生参考。

十二指肠溃疡大出血不良预后因素,死亡率介于44%-60%之间^[2]。近年来介入放射在此病的急诊治疗中扮演着愈来愈重要的角色。血管造影不但能迅速明确出血部位,同时ETA也已成为内镜、手术治疗复发患者的有效替代措施,甚至有报道ETA可成为急诊消化系动脉出血的首选治疗措施^[1]。

介入治疗的疗效受介入治疗器械和治疗的方式影响较大。20世纪80年代中期至90年代中期,使用的造影导管直径介于5F-6F之间,导管质地粗硬,难以超选择性插管,这就决定了胃十二指肠动脉破裂出血的患者多数采用经导管灌注血管加压素,收缩病变动脉,以期达到止血的目的。尽管如此,局部灌注药物仍然取得了很好的技术成功率。Miller *et al*^[5]的综述报道1979-1984年间267例患者灌注治疗,成功率在70%-80%之间,但再出血率仍近20%,灌注治疗止血困难的病例,再出血率甚至高达40%。原因在于有些高龄患者存在高血压、冠状动脉粥样硬化或心梗等基础疾病,即使是局部使用血管加压素,其使用量和持续用药的时间仍然受限。再有,丰富的侧支循环对出血的十二指肠球部肠管仍然提供较多的血液供应。近年来随着导管、导丝等器械的工艺技术改进和微导管的广泛使用,超选择至3级以上的动脉插管和栓塞技术在多数单位已被娴熟使用,确保了ETA的准确性和有效性,同时保证了正常组织的供血。从我们收治的29例患者的ETA结果看,技术成功率和临床成功率分别达到90%和93%。这一结果与国外文献报道的上消化系出血ETA治疗的技术成功率95%、临床成功率52%-95%基本吻合^[6]。早些时候的病例报道:7例栓塞只有2例再出血,而6例采取保守治疗就有4例再出血。Toyoda *et al*^[7]报道11例十二指肠溃疡内镜治疗后难以控制出血,ETA治疗10例出血停止,有效率91%,1例再出血为动脉粥样硬化只能采用胃十二指肠动脉近端栓塞,由于栓塞远端血管建立了侧支循环导致再出血。

内镜明确诊断并治疗后的胃十二指肠球部溃疡大出血患者,呈现间隙性出血,血管造影不能明确显示出血征象,本组病例有3例即如此。这样的病例是否使用ETA治疗?统计时虽然没有将其纳入ETA技术成功率计算中,但我们认为出血的停止或血管造影的阴性表现只是一种假象,这与低血容量、缩血管药或止血剂导致短暂血栓形成有关,如不处理,一旦血压纠正,

收缩的血管再扩张,或血栓溶解,则会再发出血。这种情况下仍应采取ETA治疗,3例患者经ETA治疗均达到临床成功标准。

对于合并多脏器功能衰竭的患者,本组病例虽然只有2例,无法进行随机对照研究,但ETA治疗均有效控制了动脉破裂所致大出血,均达到技术成功和临床成功标准。另有高龄患者7例,ETA后仅有1例再出血,因动脉硬化迂曲,仅栓塞胃十二指肠动脉近端,肠系膜上动脉的分支-胰十二指肠动脉侧支开放。再次经肠系膜上动脉超选择栓塞侧支后仍达到了止血目的。该例患者的情况也同时提醒我们此后将肠系膜上动脉的血管造影作为ETA前的常规程序,避免了十二指肠的侧支循环造成的再出血。总体而言,对于内镜二次治疗、随后的再手术以及预后不利的上述两种因素并不影响ETA的有效实施,相反,急诊介入ETA因其微创可以反复对再出血实施局部治疗,因其无需术前准备可快速实施,因其实时、准确显示出血部位可有效控制出血。ETA在一定程度上更符合消化系大出血的急诊救治原则。由此可见,ETA是急性十二指肠溃疡大出血的有效急诊治疗手段。

从本组病例结果看ETA对十二指肠大出血的治疗是安全的。ETA治疗后有些患者呈现短暂的十二指肠球部缺血的症状,剑突下闷痛或隐痛,未经处理,可自行缓解。部分病例ETA后内镜检查十二指肠球部黏膜显示轻度缺血改变,表现为溃疡周边正常黏膜苍白,但没有动脉栓塞后的正常黏膜破坏坏死。有文献报道胃十二指肠动脉远端栓塞的28例患者,7例因缺血导致十二指肠狭窄,29例动脉近端栓塞,仅有2例出现前述病理性改变。究其原因,与ETA治疗中同时混用多种栓塞剂有关,包括液体栓塞剂。另有一组32病例报道,ETA导致2例十二指肠坏死,1例形成新的溃疡^[8]。与使用了明胶海绵粉末栓塞剂有关。无论液体栓塞剂还是明胶海绵粉末都是末梢血管栓塞剂,使用后可致黏膜下层微血管网毁损,黏膜的代偿供血彻底丧失。本组病例均采用大颗粒或条状明胶海绵栓塞近端胃十二指肠动脉,即使细小动脉的栓塞也是在出血的靶向性非常明确前提下,实施的微导管超选择性ETA,即在栓塞剂的直径与栓塞范围两个层面上,保证黏膜下层的微血管网没有破坏,故未发生文献报道的并发症。在保证安全性方面,我们在选择栓塞剂的类型上不同意Lee *et al*的做法。后者采用液体栓塞剂N-butyl-2-

cyanoacrylate(NBCA)栓塞16例患者, 栓塞术后, 2例(12%)出现了大面积栓塞和多发性胃溃疡^[9]. 因此, 选择大小合适的栓塞剂和微导管超选择插管, 控制栓塞范围能够有效保证ETA的安全性.

总之, 急诊经导管动脉栓塞是治疗十二指肠溃疡大出血的有效、安全和快捷的急救手段, 尤其适用于虚弱、高龄或多脏器功能不全的十二指肠溃疡大出血患者的急救.

4 参考文献

- 1 Holme JB, Nielsen DT, Funch-Jensen P, Mortensen FV. Transcatheter arterial embolization in patients with bleeding duodenal ulcer: an alternative to surgery. *Acta Radiol* 2006; 47: 244-247
- 2 Poultsides GA, Kim CJ, Orlando R 3rd, Peros G, Hallisey MJ, Vignati PV. Angiographic embolization for gastroduodenal hemorrhage: safety, efficacy, and predictors of outcome. *Arch Surg* 2008; 143: 457-461
- 3 Midlenko VI, Belonogov NI, Smol'kina AV. [Diagnostic and therapeutic treatment policy in ulcerous gastroduodenal bleedings] *Khirurgiia (Mosk)* 2005: 64-67
- 4 Khanna A, Ognibene SJ, Koniaris LG. Embolization as first-line therapy for diverticulosis-related massive lower gastrointestinal bleeding: evidence from a meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 343-352
- 5 Miller M Jr, Smith TP. Angiographic diagnosis and endovascular management of nonvariceal gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 735-752
- 6 Schenker MP, Duszak R Jr, Soulen MC, Smith KP, Baum RA, Cope C, Freiman DB, Roberts DA, Shlansky-Goldberg RD. Upper gastrointestinal hemorrhage and transcatheter embolotherapy: clinical and technical factors impacting success and survival. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1263-1271
- 7 Toyoda H, Nakano S, Takeda I, Kumada T, Sugiyama K, Osada T, Kiriyaama S, Suga T. Transcatheter arterial embolization for massive bleeding from duodenal ulcers not controlled by endoscopic hemostasis. *Endoscopy* 1995; 27: 304-307
- 8 Keeling WB, Armstrong PA, Stone PA, Zweibel BR, Kudryk BT, Johnson BL, Back MR, Bandyk DF, Shames ML. Risk factors for recurrent hemorrhage after successful mesenteric arterial embolization. *Am Surg* 2006; 72: 802-806; discussion 806-807
- 9 Lee CW, Liu KL, Wang HP, Chen SJ, Tsang YM, Liu HM. Transcatheter arterial embolization of acute upper gastrointestinal tract bleeding with N-butyl-2-cyanoacrylate. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 209-216

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 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-08)

MUTYH基因与结直肠癌发病的关系

佟静, 王炳元

■背景资料

结直肠癌(CRC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一。每年近50万人死于结直肠癌,已引起人们的广泛关注。结直肠癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因异常改变的复杂过程。MUTYH基因定位于1号染色体短臂p32.1到p34.3,长7.1 kb,含有16个外显子,编码一个535个氨基酸的蛋白,MUTYH蛋白是一种糖基化酶,定位于细胞核和线粒体内。目前MUTYH基因已发现多个SNP,在家族遗传性胃癌中也发现了MUTYH的突变。

佟静, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 此课题由佟静与王炳元设计; 研究过程由佟静操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由佟静提供; 数据分析由佟静完成; 本论文写作由佟静与王炳元完成。

通讯作者: 王炳元, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科。wangby@medmail.com.cn

收稿日期: 2008-08-08 修回日期: 2008-09-25

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-08

Relationship between MUTYH gene and occurrence of colorectal cancer in family clan of familial adenomatous polyposis

Jing Tong, Bing-Yuan Wang

Jing Tong, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

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

Received: 2008-08-08 Revised: 2008-09-25

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To provide evidence for screening of colorectal cancer in susceptible population through detecting familial adenomatous polyposis (FAP) family clan MUTYH gene SNP site.

METHODS: PCR-SSCP and gene sequencing were used to detect MUTYH gene SNP site in three doubtful FAP genealogy, and PCR-CTPP was used to detect MUTYH gene SNP mutational site in 283 colorectal cancer patients and 307 control group patients in the affiliated first hospital of China Medical University. Relationship between the SNP site and colorectal cancer susceptibility was analyzed.

RESULTS: Three SNP sites of MUTYH genes were found in three doubtful FAP genealogy, that is, IVS1-5 A>C (A/C), IVS6 + 35 A>G (A/G, G/G) and c.G972C (Q335H) (G/C). Eleven patients were found to generate MUTYH IVS1-5

A/C mutation and 2 MUTYH IVS1-5 C/C mutation in colorectal cancer group. And 4 patients were found to have MUTYH IVS1-5 A/C mutation and no MUTYH IVS1-5 C/C homozygosity mutation in control group. Significant difference in MUTYH IVS1-5 A/C allele frequency was detected between colorectal cancer group and control group ($\chi^2 = 7.43$, $P = 0.006$). Polymorphism of MUTYH IVS1-5 A>C was closely correlated to colorectal cancer susceptibility.

CONCLUSION: MUTYH IVS1-5 A>C site gene polymorphism plays important role in genesis of colorectal cancer, which is significant to etio-pathogenesis of colorectal cancer and screening of high-risk group.

Key Words: Familial adenomatous polyposis; Colorectal cancer; MUTYH gene; PCR-CTPP method

Tong J, Wang BY. Relationship between MUTYH gene and occurrence of colorectal cancer in family clan of familial adenomatous polyposis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3576-3581

摘要

目的: 检测家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)家族成员MUTYH基因SNP位点,为结直肠癌易感人群的筛检提供依据。

方法: 应用PCR-SSCP及基因测序方法检测三个疑似FAP家系患者MUTYH基因SNP位点,PCR-CTPP方法检测中国医科大学附属第一医院结直肠癌组患者283例与对照组307患者血液DNA中MUTYH IVS1-5 A>C SNP突变位点的情况,分析其多态性与结直肠癌易感性的关系。

结果: 发现MUTYH基因3个SNP位点,分别为IVS1-5 A>C (A/C); IVS6+35 A>G(A/G, G/G)及c.G972C(Q335H)(G/C)。结直肠癌患者中发生MUTYH IVS1-5 A/C与MUTYH IVS1-5 C/C突变的患者分别为11和2例,对照组中发生MUTYH IVS1-5 A/C突变的患者为4例,但未发现MUTYH IVS1-5 C/C纯合性突变。对照

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

组中MUTYH IVS1-5 A/C等位基因频率与结直肠癌组相比, 有显著性差异($\chi^2 = 7.43$, $P = 0.006$). MUTYH IVS1-5 A>C多态性与结直肠癌易感性有相关性.

结论: MUTYH IVS1-5 A>C位点基因多态性在结直肠癌发生中起着作用, 其了解结直肠癌的发病机制及对高危人群的筛检具有重大意义.

关键词: 家族性腺瘤性息肉病; 结直肠癌; MUTYH基因; PCR-CTPP法

佟静, 王炳元. MUTYH基因与结直肠癌发病的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3576-3581
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3576.asp>

0 引言

碱基切除修复途径在生物体内是保守的, 在参与修复氧化损伤所引起的突变中起到至关重要的作用. 其中MUTYH基因定位于染色体1p32.1至p34.3, MUTYH基因编码一种特异的腺嘌呤转葡萄糖基酶, 在复制后切除子链DNA中与母链8-oxodG错配的A. 如果MUTYH蛋白失活, 则易导致复制过程中G:C-A:T的颠换. 研究表明在癌基因及抑癌基因中, 由于碱基切除修复途径缺陷所引起的基因突变频率的增加能导致肿瘤发生.

1 材料和方法

1.1 材料 3个受检家系血样标本均来源于中国医科大学附属第一医院. 且经患者及其家族成员同意对其血样进行基因筛查. 家系一受检者2005年诊断为早期胃癌行纤维结肠镜检查示盲肠、升结肠、乙状结肠均有多发息肉. 其妹行纤维结肠镜检查发现有散发小的大肠息肉. 病理诊断为肠腺瘤、中度异型. 家系二受检者其兄于20年前行大肠癌手术, 于术后半年死亡. 为其家族第1个发病者. 其姐于其兄发病后行纤维结肠镜检查, 发现全结肠多发息肉, 行病理检查未发现癌. 遂行全结肠切除术, 保留直肠. 当时受检者29岁, 行纤维结肠镜检查, 发现盲肠和直肠散在数十个非密生型息肉, 大小为1-8 mm. 病理诊断为肠腺瘤、中度异型. 家系三受检者其父于2000-01便血, 行纤维结肠镜检查, 镜下呈典型的FAP密生型息肉. 病理示升结肠高分化腺瘤, 其父并于2007-08-09因直肠癌肝肺转移病逝.

本研究中结直肠癌组患者283名与对照组307名均来源于中国医科大学附属第一医院. 且

经患者及其家属同意对其血样进行基因检测.

1.2 方法

1.2.1 DNA提取: 对每个受检者抽取约5 mL静脉血, 经DNA提取试剂盒QIAamp® DNA Blood Maxi Kit提取受检者全血中DNA.

1.2.2 RNA提取: 对每个受检者抽取约5 mL静脉血, 经RNA提取试剂盒PAXgene Blood RNA Kit提取受检者全血中RNA.

1.2.3 引物的设计与合成: 在GenBank中登录人MUTYH(NM_012222.1)基因全序列, 应用Oligo@Sigma Genosys软件分别对APC及MUTYH基因全部外显子设计引物.

1.2.4 PCR反应体系: 20 μ L PCR反应体系为: Hotstar Taq DNA聚合酶0.2 U 10 $\times$ PCR缓冲液包含15 mmol/L MgCl₂ 共2 μ L, 200 μ mol/L dNTP 1.6 μ L, 每种0.25 μ mol/L引物0.2 μ L, 加入1 μ L模板DNA, 加双蒸水至20 μ L. 反应条件设置为: 95 $^{\circ}$ C预变性15 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 重复37个循环, 最后72 $^{\circ}$ C充分延伸10 min.

1.2.5 限制性内切酶反应体系: 20 μ L限制性内切酶反应体系为: PCR扩增产物15 μ L, 10 $\times$ 缓冲液2 μ L, 100 $\times$ BSA 0.2 μ L, 各种限制性内切酶5 U, 37 $^{\circ}$ C孵育过夜.

1.2.6 单链构象多态性分析(single strand conformation polymorphism, SSCP): PCR扩增后产物或PCR扩增酶切后产物17 μ L与FEXB(950 mL/L甲酰胺, 0.02 mol/L EDTA, 0.25 g/L溴酚蓝)按1:1.5比例混合, 96 $^{\circ}$ C变性15 min后置于冰中. 然后各取10 μ L上样于120 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 在4种条件下(常温, 常温+50 mmol/L甘油, 4 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C+50 mmol/L甘油)电泳, 电压为150 V. 常温电泳3.5 h, 4 $^{\circ}$ C电泳4.5 h. 然后将聚丙烯酰胺凝胶银染, 观察结果, 如果在凝胶上出现与正常对照组不同的条带, 即泳动移位、多余条带或条带变宽者视为异常条带, 提示有突变的可能性, 待DNA测序分析.

1.2.7 DNA测序: 在凝胶上出现异常条带者, 应用Sanger双脱氧终止法对PCR-SSCP法检测出的可疑PCR产物进行测序. 所用测序仪器为ABI PRISM 3100, 测序前应用QIAquick PCR Purification Kit净化PCR产物, 使用Nanodrop ND-1000分光光度仪对DNA进行定量. 测序试剂为ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit序列分析软件为GENETYX 8.

1.2.8 相对的两对引物-聚合酶链反应(polymerase chain reaction with confronting two-pair primers,

■ 研发前沿

近年来, 结直肠癌的发病率呈明显上升趋势, 已引起人们的广泛关注.

■相关报道

目前MUTYH基因已发现多个SNP, 其中研究比较多的是Y165C和G382D. 在家族遗传性胃癌中也发现了MUTYH的突变, 在日本发现IVS10-2 A>G剪切位点的突变, 在中国家族遗传性胃癌中, 也发现了两个新的突变位点: Pro18Leu和Gly25Asp.

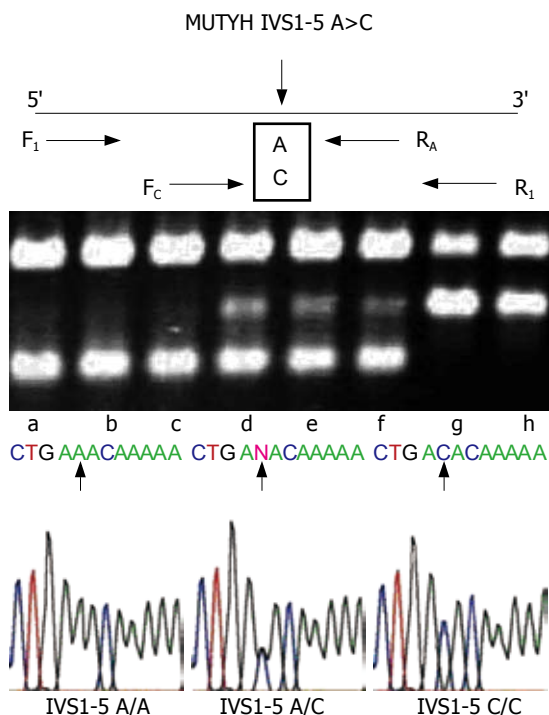


图1 引物所设位置及CTPP-PCR扩增所得产物. 上图为PCR-CTPP所设引物在MUTYH基因上位置以及与MUTYH IVS1-5 A>C突变位点的关系; 中图为PCR-CTPP产物在琼脂糖凝胶电泳中的影像. 其中a-c: MUTYH IVS1-5基因野生型纯合子(A/A); d-f: MUTYH IVS1-5基因突变型杂合子(A/C); g-h: MUTYH IVS1-5基因突变型纯合子(C/C). 下图从左至右分别为MUTYH IVS1-5基因野生型纯合子(A/A); MUTYH IVS1-5基因突变型杂合子(A/C); MUTYH IVS1-5基因突变型纯合子(C/C)的基因测序结果.

PCR-CTPP): 针对MUTYH基因突变位点IVS1-5 A>C设计引物, 引物设计方法同上, PCR-CTPP反应体系里同时加入两对引物, 其序列为: Primer F1: 5'-GTC TTT GCA TGT CTC CAG GG-3'及Primer R1: 5'-CCA TGT TAC CCA AGC TGG TC-3'; Primer FT: 5'-CTT TGG CTG GGT CTT TTT GTT-3'及Primer RC: 5'-CTT CCT CAT GAT GGC CTG AC-3'(Sigma公司). 退火温度为60℃, 共40个循环. 引物所设位置及CTPP-PCR扩增所得产物见图1.

统计学处理 以 χ^2 检验比较各基因型, 相关危险因素暴露在病例与对照之间分布的差异. 以比值比(odd ratios, OR)及其95% CI表示相对危险度, 其计算采用Logistic回归模型, 以MUTYH IVS1-5野生基因型(A/A)作参照; OR值经年龄、性别校正. 采用SPSS12.0统计软件进行分析, 所有的统计检验均为双侧概率检验.

2 结果

2.1 基本特征 本研究中患者年龄范围20-74岁, 结直肠癌组平均年龄为62.15±6.16岁, 对照组

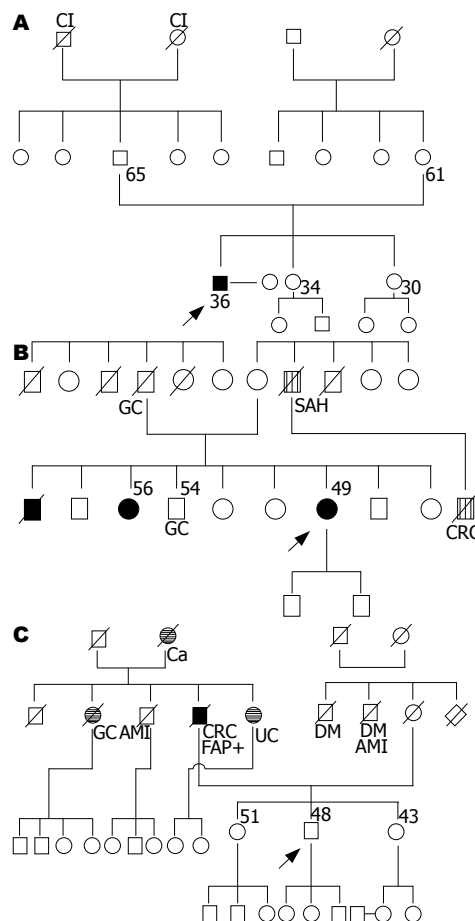


图2 3个受检家系. A: 疑似FAP家系1; B: 疑似FAP家系2; C: 疑似FAP家系3.

的平均年龄为58.81±6.78岁, 差异有显著性($u = 6.27, P < 0.001$). 结直肠癌组 and 对照组中男性频率分别为61.10%和52.10%, 经卡方检验有显著性差异($\chi^2 = 4.87, P = 0.027$). 受检者于2000年其父诊断为FAP时行纤维结肠镜检查, 未见异常, 7年来未再次检查. 3个受检家系如图2所示.

2.2 PCR及基因测序 应用PCR-SSCP及基因测序方法检测3个疑似FAP家系患者MUTYH基因全部外显子, 发现MUTYH基因3个SNP位点, 分别为IVS1-5 A>C(A/C); IVS6+35 A>G(A/G, G/G)及c.G972C(Q335H)(G/C)如表1所示. 我们选择MUTYH IVS1-5 A>C SNP突变位点作为研究靶点(参见NCBI SNP数据库).

应用PCR-CTPP方法检测中国医科大学附属第一医院结直肠癌组与对照组患者在血液DNA中MUTYH IVS1-5 A>C SNP突变位点的情况如图3, 结果发现在283例结直肠癌患者中发生MUTYH IVS1-5 A/C与MUTYH IVS1-5 C/C突变的人数分别为11人、2人, 在307例对照组中发生MUTYH IVS1-5 A/C突变的人数为4人, 但未发现MUTYH IVS1-5 C/C纯合性突变.

表 1 3个受检家系患者APC与MUTYH基因PCR-SSCP及基因测序结果

基因	位置	突变	家系一患者	家系二患者	家系三患者
MYH	内含子	IVS1-5 A>C Δ	wild type	A/C	wild type
	内含子	IVS6+35 A>G	wild type	A/G	G/G
	外显子12	c.G972C(Q335H)	wild type	G/C	wild type

表 2 结直肠癌组和对照组MUTYH IVS1-5多态基因型分布频率

分组	MUTYH IVS1-5多态基因型			χ^2	P值
	野生型	突变型杂合子	突变型纯合子		
对照组	303(98.70)	4(1.30)	0(0.00)	7.10	0.029 ^a
结直肠癌组	270(95.41)	11(3.89)	2(0.70)		

^a $P<0.05$ vs 对照组.

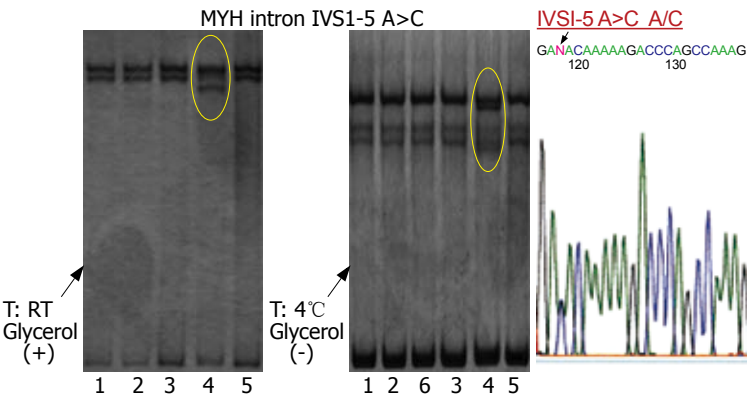


图 3 左侧为疑似MAP家系二患者SNP突变位点MUTYH IVS1-5 A>C使用PCR-SSCP方法的检测结果; 右侧为该患者SNP突变位点MUTYH IVS1-5基因测序结果. 1: Control-1; 2: Control-2; 3: Patient 1; 4: Patient 2; 5: Patient 3; 6: Control-3.

2.3 基因型分布 结直肠癌组和对照组中MUTYH IVS1-5 A>C多态基因型的分布频率见表2. 对照组中MUTYH IVS1-5 A/C等位基因频率为0.65%, 结直肠癌组的MUTYH IVS1-5(A/C)及(C/C)频率为2.65%; 经卡方检验有显著性差异($\chi^2 = 7.43$, $P = 0.006$).

2.4 MUTYH IVS1-5 A>C多态性与结直肠癌易感性的关系 结直肠癌患者中MUTYH IVS1-5多态基因型的调整比值见表2. 以携带MUTYH IVS1-5基因野生型(A/A)的个体为参照组, 调整年龄、性别的混杂作用前后, 携带至少1个MUTYH IVS1-5等位基因(即A/C和C/C基因型)的个体罹患结直肠癌的危险显著增高, 调整分别为 $OR = 3.64$ (95% CI: 1.17-11.32)和 $OR = 3.60$ (95% CI: 1.21-10.48).

3 讨论

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 仅2000年全球就有945 000新发病例, 每年近50万人死于结直肠癌, 仅次于

肺癌乳癌居恶性肿瘤发病率的第3位^[1]. 结直肠癌在我国也是最常见的恶性肿瘤之一, 目前居恶性肿瘤发病率第4位. 近年来, 结直肠癌的发病率呈明显上升趋势, 已引起人们的广泛关注.

结直肠癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因异常改变的复杂过程. 可因原癌基因和抑癌基因突变累积而成, DNA损伤修复系统缺陷亦可导致基因突变率增高, 促进肿瘤发生^[2-3]. DNA损伤修复系统是机体内主要的防御屏障, 参与修复由内外环境因素所致的DNA损伤. DNA修复能力缺陷或低下将增加基因突变和细胞癌变的危险^[4]. 研究表明, DNA修复能力低于一般人群平均水平的个体对肿瘤易感. 因此, DNA修复能力的个体差异可能是决定肿瘤遗传易感性极其重要的因素^[5]. 现在知道, 许多DNA修复基因具有SNP, 越来越多的研究表明SNP能导致氨基酸替换进而改变相应修复酶的活性^[6]. 因此, DNA修复基因SNP是导致DNA修复能力个体差异的重要原因, 特别是位于基因编码区或调节区的SNP. 研究表明, DNA修复基

■创新盘点
本研究首次报道了DNA修复基因MUTYH在人群中的一个新的SNP突变位点MUTYH IVS1-5 A>C, 并且就MUTYH IVS1-5 A>C多态性与结直肠癌易感性的关系进行了分析, 并提示MUTYH IVS1-5 A>C位点基因多态性在结直肠癌发生中起着重要作用.

■同行评价

本研究选题较好,统计方法合理,具有一定的学术价值。

因的遗传多态性可导致个体发生癌症的危险性增高^[7-8]。

人类DNA损伤修复系统主要包括:碱基切除修复(BER)、核酸切除修复(NER)和错配修复(MMR)等^[9]。而MUTYH是碱基切除修复(BER)的三级防御, MUTYH 基因定位于1号染色体短臂p32.1到p34.3,长7.1 kb,含有16个外显子,编码一个535个氨基酸的蛋白^[10], MUTYH蛋白是一种糖基化酶,定位于细胞核和线粒体内^[11]。在DNA复制后他能迅速扫描子链DNA,切除子链DNA中与母链8-oxodG错配的A^[12-15],如果MUTYH蛋白失活,则易导致复制过程中G:C→A:T的颠换,从而促进肿瘤的发生^[16-17]。

目前MUTYH基因已发现多个SNP^[17],其中研究比较多的是Y165C和G382D。在家族遗传性胃癌中也发现了MUTYH的突变,在日本发现IVS10-2 A>G剪切位点的突变^[4],在中国家族遗传性胃癌中,也发现了两个新的突变位点:Pro18Leu和Gly25Asp^[6]。本研究首次报道了DNA修复基因MUTYH在人群中的一个新的SNP突变位点MUTYH IVS1-5 A>C,并且就MUTYH IVS1-5 A>C多态性与结直肠癌易感性的关系进行了分析。结果发现携带MUTYH IVS1-5基因突变型杂合子(A/C)或MUTYH IVS1-5基因突变型纯合子(C/C)基因型的个体罹患结直肠癌的危险是携带MUTYH IVS1-5基因野生型纯合子(A/A)的3.64,调整年龄、性别的混杂作用前后,OR值仍为3.60。提示MUTYH IVS1-5 A>C位点基因多态性在结直肠癌发生中起着重要作用。

个别学者对MUTYH基因的点突变进行了功能分析^[17]。研究发现Y165C和G382D突变可以减低大肠杆菌中MUTYH的表达数量。他们同时使用底物类似物FA(2-fluoro-2-deoxyadenosine)对酶作用底物亲和力进行评价,结果发现这两种突变均严重影响MUTYH识别FA以及区分鸟嘌呤与8-oxoG的能力。也许MUTYH IVS1-5 A>C点突变也有类似的作用。此外, MUTYH IVS1-5 A>C SNP突变位点位于MUTYH与复制蛋白A(replication protein A, RPA)的结合位点^[18]。而RPA具有单链结合和解旋的功能,在DNA复制开始和延长阶段起着重要作用^[19-20]。在DNA复制过程中, RPA磷酸化可改变他与DNA结合的活性以及参与DNA复制的各种蛋白质的相互作用,进而调节DNA复制。此外, RPA除了参与正常DNA的复制,还参与了DNA损伤应激反应,如核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、

DNA错配修复(DNA mismatch repair, MMR)、同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)等修复过程。这些均可能是提高MUTYH IVS1-5基因突变型携带者的结直肠癌易感性的原因,其具体机制还需进一步探讨。

本研究首次发现了DNA修复基因MUTYH一个新的SNP突变位点MUTYH IVS1-5 A>C,并且分析了MUTYH IVS1-5 A>C多态性对结直肠癌发生存在一定的影响,提示MUTYH IVS1-5 A>C多态性是构成结直肠癌遗传易感性的重要因素,这对了解结直肠癌的发病机制及对于预防、早期诊断及早期治疗结直肠癌具有重大意义。

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374
- 3 Risinger MA, Groden J. Crosslinks and crosstalk: human cancer syndromes and DNA repair defects. *Cancer Cell* 2004; 6: 539-545
- 4 Tao H, Shinmura K, Hanaoka T, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Ozawa T, Tsujinaka T, Li Z, Yamaguchi S, Yokota J, Sugimura H, Tsugane S. A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1859-1866
- 5 Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, Hishima T, Tamura K, Utsunomiya J, Mori T. Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat Res* 2005; 578: 430-433
- 6 Zhang Y, Liu X, Fan Y, Ding J, Xu A, Zhou X, Hu X, Zhu M, Zhang X, Li S, Wu J, Cao H, Li J, Wang Y. Germline mutations and polymorphic variants in MMR, E-cadherin and MYH genes associated with familial gastric cancer in Jiangsu of China. *Int J Cancer* 2006; 119: 2592-2596
- 7 Kim JJ, Ku JL, Kang HC, Park JH, Yoon KA, Shin Y, Park HW, Jang SG, Lim SK, Han SY, Shin YK, Lee MR, Jeong SY, Shin HR, Lee JS, Kim WH, Park JG. Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum Genet* 2004; 115: 498-503
- 8 Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, Frayling I, Sieber O, Reza FB, Eckert M, Rowan A, Barclay E, Atkin W, Williams C, Gilbert J, Cheadle J, Bell J, Houlston R, Bodmer W, Sampson J, Tomlinson I. Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2215-2221
- 9 Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 3-20
- 10 Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M,

- Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006; 119: 807-814
- 11 Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS, McCullough AK. hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2802-2809
- 12 Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 2001; 35: 141-170
- 13 Slupska MM, Baikarov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 1996; 178: 3885-3892
- 14 Slupska MM, Luther WM, Chiang JH, Yang H, Miller JH. Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. *J Bacteriol* 1999; 181: 6210-6213
- 15 Parker A, Gu Y, Mahoney W, Lee SH, Singh KK, Lu AL. Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem* 2001; 276: 5547-5555
- 16 Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYTH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12 Spec No 2: R159-R165
- 17 Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP. MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 679-683
- 18 Cheadle JP, Sampson JR. MUTYH-associated polyposis--from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6: 274-279
- 19 Iftode C, Daniely Y, Borowiec JA. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999; 34: 141-180
- 20 Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 61-92

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-08)

大肠癌患者血清中sIL-2R、IL-8水平变化及其意义

靳胜, 赵有翼

■背景资料

大肠癌是目前高发消化系统肿瘤, 其发生发展和转移是一个多因素参与多阶段发展的复杂过程, sIL-2R、IL-8都直接或间接参与了某些肿瘤的发生发展以及免疫过程。正常人体液中sIL-2R以及IL-8含量较低, sIL-2R来自于活化淋巴细胞膜IL-2受体的 α 链成分, 是一种免疫抑制因子由细胞膜释放进入循环或培养上清中, 能够抑制T细胞的增生反应, 是重要的封闭因子, 其在很多实体瘤中增高明显, 而且和转移相关。

■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

靳胜, 北京世纪坛医院临检中心 北京市 100038
赵有翼, 北京平谷医院检验科 北京市 100052
作者贡献分布: 本文靳胜与赵有翼贡献基本相等; 由靳胜最后完成定稿, 并负责数据内容组织。
通讯作者: 靳胜, 100038, 北京市, 北京世纪坛医院临检中心。js14446@yahoo.com.cn
电话: 010-63929391
收稿日期: 2008-08-28 修回日期: 2008-10-06
接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-08

Pre- and post-operative changes and significance of serum sIL-2R and IL-8 in colorectal cancer patients

Sheng Jin, You-Yi Zhao

Sheng Jin, Center of Clinical Laboratory of Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China
You-Yi Zhao, Department of Clinical Laboratory, Beijing Pinggu Hospital, Beijing 100052, China
Correspondence to: Sheng Jin, Center of Clinical Laboratory of Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China. js14446@yahoo.com.cn
Received: 2008-08-28 Revised: 2008-10-06
Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate expressional changes of serum sIL-2R and IL-8 in colorectal cancer patients as well as their clinical significance.

METHODS: Serum levels of sIL-2R and IL-8 were measured using the double antibody sandwich ELISA in 28 patients with colorectal cancer before and after operation, 17 cases with intestinal polyp and 25 healthy controls.

RESULTS: sIL-2R and IL-8 serum levels were found significantly higher in colorectal cancer patients than that in the intestinal polyp and controls (180.1 ± 83.22 vs 61.3 ± 12.12 , 52.3 ± 11.21 ; 3.09 ± 0.21 vs 2.49 ± 0.19 , 2.33 ± 0.18 , all $P < 0.001$). The serum level of sIL-2R and IL-8 declined remarkably after the radical operation (80.2 ± 40.31 vs 114.1 ± 72.3 , 2.53 ± 0.15 vs 2.81 ± 0.17 , both $P < 0.01$) and decreased after palliative operation (242.1 ± 60.3 vs 319.8 ± 67.3 , 2.77 ± 0.20 vs 3.67 ± 0.19 , both $P < 0.05$). Serum changes in sIL-2R and IL-8 were positively correlated with

the degree of differentiation in patients with colorectal cancer.

CONCLUSION: Dynamic monitoring serum levels of sIL-2R and IL-8 level may be useful for diagnosis and prognosis in colorectal cancer patients.

Key Words: Colorectal neoplasms; sIL-2R; Interleukin-8; Enzyme linked immunosorbent assay

Jin S, Zhao YY. Pre- and post-operative changes and significance of serum sIL-2R and IL-8 in colorectal cancer patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3582-3584

摘要

目的: 探讨sIL-2R、IL-8在大肠癌患者术前术后血清中表达及临床意义。

方法: 双抗体夹心ELISA法检测28例大肠癌患者的sIL-2R、IL-8血清水平; 并同时检测大肠息肉患者17例和健康人25例作为对照组。

结果: 大肠癌患者血清中sIL-2R、IL-8含量明显高于对照组以及大肠息肉组(180.1 ± 83.22 vs 61.3 ± 12.12 , 52.3 ± 11.21 ; 3.09 ± 0.21 vs 2.49 ± 0.19 , 2.33 ± 0.18 , 均 $P < 0.001$), 手术后显著下降, 其中根治组下降显著(80.2 ± 40.31 vs 114.1 ± 72.3 , 2.53 ± 0.15 vs 2.81 ± 0.17 , 均 $P < 0.01$), 姑息组亦有所下降(242.1 ± 60.3 vs 319.8 ± 67.3 , 2.77 ± 0.20 vs 3.67 ± 0.19 ; 均 $P < 0.05$)。大肠癌患者血清sIL-2R、IL-8变化与分化程度呈正相关。

结论: 动态监测sIL-2R、IL-8的血清表达量有助于临床进行疗效评价, 判断大肠癌患者的预后。

关键词: 大肠癌; 可溶性白介素-2受体; 白介素-8; 酶联免疫吸附法

靳胜, 赵有翼. 大肠癌患者血清中sIL-2R、IL-8水平变化及其意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(31): 3582-3584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3582.asp>

0 引言

大肠癌是目前高发消化系统肿瘤, 其发生发展和

转移是一个多因素参与多阶段发展的复杂过程, sIL-2R、IL-8都直接或间接参与了某些肿瘤的发生发展以及免疫过程. 我们选取这两个指标, 在大肠癌术前患者中对其进行了检测, 以探讨这两个指标与大肠癌的诊断治疗以及发生发展之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集本院以及北京市平谷区医院肿瘤科2006-07/2008-03大肠癌患者标本28例, 其中男15例, 年龄43-75(平均62.1)岁; 女13例, 年龄39-72(平均59.1)岁. 其中高中分化癌15例, 低分化癌13例, 所有患者均经病理检验确诊; 临床Duke's分期, A期4例, B期7例, C期8例, D期9例. 根治切除者19例, 姑息切除者9例. 大肠息肉患者17例, 为本院以及平谷区医院2007年住院患者, 男10例, 年龄23-69(平均54.7)岁; 女7例, 年龄33-71(平均55.8)岁; 其中管状腺瘤7例, 混合型腺瘤6例, 绒毛状腺瘤4例. 对照组25例, 均为同期健康体检者, 男14例, 年龄25-69(平均52.7)岁; 女11例, 年龄31-71(平均53.8)岁.

1.2 方法 空腹采取静脉血3 mL, 2% EDTA抗凝, 3000 r/min离心5 min, 分离血清-20℃冻存; 癌症患者术前3 d抽取血样, 术后10 d再留取术后血样. 双抗体夹心ELISA法检测sIL-2R和IL-8水平.

统计学处理 利用SPSS10.0软件进行数据处理, 采用Student *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 对照组与大肠癌患者血清sIL-2R、IL-8检测结果及比较 大肠癌sIL-2R、IL-8血清浓度与对照组相比, 差异有统计学意义(sIL-2R: 180.1 ± 83.22 vs 52.3 ± 11.21 , $P < 0.001$; IL-8: 3.09 ± 0.21 vs 2.33 ± 0.18 , $P < 0.001$), 与息肉相比亦有显著性差异(sIL-2R: 180.1 ± 83.22 vs 61.3 ± 12.12 , $P < 0.001$; IL-8: 3.09 ± 0.21 vs 2.49 ± 0.19 , $P < 0.001$, 表1).

2.2 手术前后sIL-2R、IL-8检测结果 手术后大肠癌sIL-2R、IL-8血清浓度与术前相比, 差异有统计学意义(127.4 ± 75.6 vs 192.1 ± 88.2 , 2.65 ± 0.19 vs 3.11 ± 0.21 ; $P < 0.01$); 其中根治术有显著性差异(80.2 ± 40.31 vs 114.1 ± 72.3 , 2.53 ± 0.15 vs 2.81 ± 0.17 ; $P < 0.01$), 姑息术亦有显著性差异(242.1 ± 60.3 vs 319.8 ± 67 , 2.77 ± 0.20 vs 3.67 ± 0.19 ; $P < 0.05$, 表2).

2.3 与不同分化程度的关系 高中分化组与低分化之间有显著性差异($P < 0.05$, 表3), 大肠癌患者

表 1 不同患者以及对照组sIL-2R、IL-8血清水平的变化

分组	<i>n</i>	sIL-2R(nmol/L)	IL-8(ng/L)
对照组	25	52.3 ± 11.21^b	2.33 ± 0.18^b
大肠息肉	17	61.3 ± 12.12^b	2.49 ± 0.19^b
大肠癌	28	180.1 ± 83.22	3.09 ± 0.21

^b $P < 0.01$ vs 大肠癌组.

表 2 不同术式sIL-2R、IL-8血清水平的变化

分组	<i>n</i>	sIL-2R(nmol/L)	IL-8(ng/L)
根治组术前	19	114.1 ± 72.30	2.81 ± 0.17
根治组术后	19	80.2 ± 40.31^b	2.53 ± 0.15^b
姑息术前	9	319.8 ± 67.30	3.67 ± 0.19
姑息术后	9	242.1 ± 60.30^a	2.77 ± 0.20^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 根治术前.

表 3 不同分化组sIL-2R、IL-8血清水平的变化

分组	<i>n</i>	sIL-2R(nmol/L)	IL-8(ng/L)
高中分化组	15	152.3 ± 11.2	2.95 ± 0.19
低分化组	13	212.3 ± 12.1	3.24 ± 0.23

血清sIL-2R、IL-8变化与分化程度呈正相关, 低分化组水平明显高于高中分化组.

3 讨论

正常人体液中sIL-2R以及IL-8含量较低, sIL-2R来自于活化淋巴细胞膜IL-2受体的 α 链成分, 是一种免疫抑制因子由细胞膜释放进入循环或培养上清中, 能够抑制T细胞的增生反应, 是重要的封闭因子, 其在很多实体瘤中增高明显, 而且和转移相关^[1]. 这可能与癌发生后其在生长过程中引起淋巴细胞增生或者激活, 引起sIL-2R的分泌增加有关, 并且在sIL-2R表达较高的状态下, NK细胞的功能受到抑制. 作为抑制因子高水平的IL-2R反过来还可以抑制活化的淋巴细胞, 使其转入抑制状态, 阻止淋巴细胞浸润肿瘤组织; 他作为封闭因子与膜IL-2R竞争结合周围的IL-2, 从而抑制T细胞单克隆增殖; 因为抑制NK细胞功能最终可导致机体细胞免疫功能低下, 使肿瘤细胞逃脱宿主免疫反应, 因此其和预后关系密切. 综合起来虽然多数文献认为sIL-2R在消化系肿瘤中的表达无特异性, 但因为其表达和肿瘤患者本人免疫状态相关性较好, 高表达的患者预后往往很差, 因此该指标和病情判断、

■应用要点

sIL-2R指标和病情判断、疾病分期、疗效分析及预后状况相关性较好, 有望作为一个新的辅助诊断指标应用于临床.

■同行评价

本研究设计较科学,数据可靠,方法传统恰当,统计学方法合理,样本量充足,具有一定的学术价值。

疾病分期、疗效分析以及预后状况相关性较好,有望作为一个新的辅助诊断指标应用于临床^[2-3]。

IL-8具有诱导肿瘤血管增生的作用,可以调节血管增殖以及渗透性,并且是一种自分泌生长因子,已经证实它可以促进多种肿瘤的生长浸润以及转移和扩散^[4]。本研究证实了在大肠癌患者血清中其显著增高,并与分化程度相关,随手术切除而下降,这可能和手术切除后血管增生受到抑制并且肿瘤细胞对淋巴细胞增生的刺激减弱,从而使其浓度降低;反过来这些也会对肿瘤的复发和生长具有延缓作用^[5]。手术切除后,尤其是根治术后sIL-2R、IL-8降低明显,有效地解除了机体的免疫抑制,使机体的免疫功能以及NK细胞功能得以恢复,并且IL-8的表达降低可以抑制血管增生以及癌细胞的增殖扩散,有报道在治疗中sIL-2R下降越明显的患者其预后越好。对于我们的试验患者的预后与转归是否和其相关还需要进一步的临床资料积累以及时间去验证,但近期来看还是有关联的,这两个指标下降明显的患者其表征表现优于其他患者。

总之,sIL-2R以及IL-8是和大肠癌病程发展预后相关的有效指标,检测他们有助于临床判断肿瘤的病变进程以及监测手术疗效,因此对二者的监测具有一定的临床意义,可作为辅助指标应用于临床患者的病常监控,至于其实际意义还需要进一步的资料积累以及随访。

4 参考文献

- 1 Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest* 1989; 84: 1045-1049
- 2 卢锋, 乔玲, 万菊萍. 胃肠道肿瘤患者外周血中SS, TNF- α , IL-6和sIL-2R检测的临床意义. *第四军医大学学报* 2005; 26: 1795-1796
- 3 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民. 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 450-453
- 4 杨春康, 陈道达, 张惠灏, 许东坡, 田源, 张景辉. 结直肠癌趋化因子IL-8的表达与血管形成的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 899-901
- 5 刘坤, 周薇, 李军华. 褪黑素对实验性溃疡性结肠炎大鼠肠组织趋化因子IL-8和MCP-1的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1168-1172

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/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 2008-11-08)

TSLC1和DAL-1/4.1B在胰腺癌中的表达及其临床意义

刘志清, 赵秋, 李德民, 覃华, 王渝, 廖宇圣, 张翠芳, 柯晓煜

刘志清, 赵秋, 李德民, 覃华, 王渝, 廖宇圣, 张翠芳, 柯晓煜, 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

作者贡献分布: 此课题由赵秋、李德民及覃华设计; 研究过程由刘志清和廖宇圣完成; 数据分析由刘志清、王渝、柯晓煜和张翠芳完成; 本论文写作由赵秋和刘志清完成。

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2008-08-07 修回日期: 2008-09-22

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-08

Expression and clinical significance of TSLC1 and DAL-1/4.1B in pancreatic cancer

Zhi-Qing Liu, Qiu Zhao, De-Min Li, Hua Qin, Yu Wang, Yu-Sheng Liao, Cui-Fang Zhang, Xiao-Yu Ke

Zhi-Qing Liu, Qiu Zhao, De-Min Li, Hua Qin, Yu Wang, Yu-Sheng Liao, Cui-Fang Zhang, Xiao-Yu Ke, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Street, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2008-08-07 Revised: 2008-09-22

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the expression and clinicopathological significance of TSLC1 and DAL-1/4.1B proteins in pancreatic cancer.

METHODS: Immunohistochemical S-P method was used to measure the protein expression of TSLC1 and DAL-1/4.1B in 9 cases of normal pancreatic tissues, 11 cases of pancreatitis tissues and 42 cases of pancreatic cancer tissues, respectively.

RESULTS: The positive expression rates of TSLC1 and DAL-1/4.1B in pancreatic carcinoma were significantly lower than those in normal pancreatic tissues and pancreatitis tissues respectively (30.95% vs 77.78%, 81.82%; 28.57% vs 66.67%, 81.82%, $P < 0.05$ or 0.01). The expression levels of TSLC1 and DAL-1/4.1B in pancreatic

cancer showed a significant correlation with the differentiation degree, lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$, respectively), but not with the gender, age, location or pathological typing. In 42 cases of pancreatic carcinoma, a significantly positive correlation was found between the expression of TSLC1 and DAL-1/4.1B proteins ($r_s = 0.489$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Down-regulated expression of TSLC1 and DAL-1/4.1B exist in pancreatic cancer, which are involved in the pathogenesis, development and metastasis of pancreatic cancer through TSLC1- DAL-1/4.1B cascade.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Immunohistochemistry; TSLC1; DAL-1/4.1B

Liu ZQ, Zhao Q, Li DM, Qin H, Wang Y, Liao YS, Zhang CF, Ke XY. Expression and clinical significance of TSLC1 and DAL-1/4.1B in pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3585-3589

摘要

目的: 探讨TSLC1和DAL-1/4.1B两种蛋白在胰腺癌中的表达和临床病理意义。

方法: 采用免疫组织化学S-P法检测42例胰腺癌组织、11例胰腺炎组织和9例正常胰腺组织中TSLC1和DAL-1/4.1B两种蛋白的表达。

结果: TSLC1、DAL-1/4.1B蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率均明显低于在正常胰腺组织和胰腺炎组织中的表达(30.95% vs 77.78%, 81.82%; 28.57% vs 66.67%, 81.82%, $P < 0.05$ 或 0.01)。TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白的异常表达均与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移和TNM分期相关($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、部位和病理分型无关。在42例胰腺癌中TSLC1与DAL-1/4.1B蛋白表达呈显著正相关($r_s = 0.489$, $P < 0.01$)。

结论: 胰腺癌中存在TSLC1和DAL-1/4.1B基因的失活和蛋白表达下调, 二者可能通过TSLC1-DAL-1/4.1B级联反应共同参与胰腺癌的发生、发展和转移。

■背景资料

TSLC1作为一种新的抑癌基因参与细胞间黏附、细胞运动、信号转导及免疫调节, 在多种肿瘤中呈现异常表达, 并与肿瘤的多种生物学特性密切相关, 其作用的分子机制尚待进一步研究。

■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; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■研发前沿

TSLC1是近年来研究较多的抑癌基因,为指导临床诊断和治疗提供了一个新的靶点,但其精确作用点、作用机制及在胰腺癌等肿瘤中的重要性有待进一步研究。

关键词: 胰腺癌; 免疫组织化学; TSLC1; DAL-1/4.1B

刘志清, 赵秋, 李德民, 覃华, 王渝, 廖宇圣, 张翠芳, 柯晓煜. TSLC1和DAL-1/4.1B在胰腺癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3585-3589

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3585.asp>

0 引言

TSLC1(tumor suppressor in lung cancer-1)是2001年由Kuramochi *et al*应用functional complementation蛋白融合技术在人类非小细胞肺癌(human non-small-cell lung cancer, NSCLC)中发现的一种抑癌基因,该基因的突变与失活与人类多种肿瘤,包括胰腺癌的发生发展密切相关^[1-2]. DAL-1(differentially expressed in adenocarcinoma of the lung)/4.1B是用差异显色PCR(DDPCR)技术在原发性NSCLC和NSCLC细胞系中发现表达减少的新型基因,其在人类多种原发肿瘤中发生缺失,并导致肿瘤细胞无限限制生长^[3]. 胰腺癌是消化系统一种常见的恶性肿瘤,大多数患者发现时均为中晚期,预后较差. 考虑到TSLC1和DAL-1/4.1B在人类多种组织中的广泛表达,我们推测二者与胰腺癌也有密切联系. 应用免疫组化方法检测TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白在胰腺癌组织中的表达情况,旨在探讨TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白表达与胰腺癌的发生、发展和临床病理学特征及预后的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集同济医学院附属同济医院2000-01/2007-06手术切除的胰腺癌标本42例,其中男29例,女13例,年龄18-76(54.76±14.73)岁. 淋巴结转移: 阳性者16例,阴性者26例. TNM分期: I-II期23例, III-IV期19例. 分化程度: 按WHO分类,高分化腺癌12例,中分化腺癌17例,低分化腺癌13例. 取11例胰腺炎组织标本和9例正常胰腺组织标本做对照. 所有标本均经40 g/L缓冲中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋, 5 μm厚度连续切片, 1张行常规HE染色,供组织学观察并行病理分型和诊断,另3张制成涂胶白片作免疫组织化学染色用. 兔抗人多克隆抗体TSLC1购自Santa Cruz Biotechnology USA, 羊抗人多克隆抗体DAL-1/4.1B购自Abcam公司,免疫组化SP试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法 采用免疫组织化学S-P法对胰腺癌组

织和胰腺炎组织中TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白的表达进行检测. 实验步骤严格按照试剂盒说明书操作,石蜡切片经脱蜡,梯度酒精水化后,用30 mL/L双氧水37℃温箱孵育20 min, 0.01 mol/L (pH = 6.0)枸橼酸盐缓冲液在电炉加热90-95℃中修复抗原,加入50 mL/L山羊血清或兔血清分别孵育30 min后再分别加入一抗(TSLC1工作液浓度1:100; DAL-1/4.1B工作液浓度: 1:1500) 4℃过夜,再分别加二抗和生物素化过氧化酶37℃温箱孵育30 min, DAB显色,苏木素复染,封片,镜检. 阳性对照采用已知阳性片为标准,阴性对照采用PBS代替一抗为标准,其余步骤相同. TSLC1蛋白以细胞膜或细胞质内出现棕黄色颗粒判断为阳性细胞,按照国外文献方法^[4],高倍镜下随机选取10个视野,每个视野200个细胞,计算阳性细胞数<30%为阴性(-),阳性细胞数≥30%为阳性(+). DAL-1/4.1B蛋白以胞质或胞膜有棕黄色颗粒判断为阳性细胞. 染色结果判断标准方法: 先按染色强度计分: 0分为无色, 1分为浅黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色; 再在高倍镜下(×400倍)对每张切片随机选取5个高倍镜视野观察细胞,每个视野500个细胞,共计2500个,按阳性细胞所占的百分比计分: 0分为阴性, 1分为阳性细胞<10%, 2分为10%-50%, 3分为>50%, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积≥2分为免疫组化阳性(+),否则计为免疫组化阴性(-).

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行 χ^2 检验和四格表的精确概率法判断TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白表达与各病理指标的相互关系,运用Spearman相关系数来判断TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白表达之间的相关关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白在胰腺癌组织中的表达 TSLC1蛋白阳性表达以正常胰腺组织、胰腺炎组织和胰腺癌细胞胞膜或胞质内出现棕黄色颗粒为标准. DAL-1/4.1B蛋白阳性表达以细胞胞质出现棕黄色颗粒为标准,部分细胞膜着色. 胰腺癌组织中TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白的阳性表达率均较正常胰腺组织、胰腺炎组织低,差异有显著性($P<0.05$). 而胰腺炎组织中TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白的阳性表达率均较正常胰腺组织高,差异无显著性($P>0.05$,表1)。

2.2 TSLC1, DAL-1/4.1B蛋白表达和胰腺癌临床病理学特征的关系 在42例胰腺癌组织中,

■相关报道

研究发现TSLC1在非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、食管癌和宫颈癌等多种肿瘤中表达下调,并可通过抑制癌细胞增殖及诱导凋亡、改变肿瘤细胞的生长特性和抑制上皮间质转化等抑制肿瘤的发生发展。

表 1 TSLC1, DAL-1/4.1B在正常胰腺、胰腺炎和胰腺癌组织中的表达

分组	n	TSLC1 阳性表达率	DAL-1/4.1B 阳性表达率
正常胰腺组织	9	77.78	66.67
胰腺炎组织	11	81.82	81.82
胰腺癌组织	42	30.95 ^{ab}	28.57 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 正常胰腺组织; ^b $P < 0.01$ vs 胰腺炎组织.

TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白在伴有淋巴结转、分化程度低和TNM分期III-IV期中的表达阳性率均低于无淋巴结转移、分化程度高和TNM分期I-II期, 差异有显著性统计意义($P < 0.05$), 而跟年龄、性别、部位和病理分型无关(表2).

2.3 TSLC1及DAL-1/4.1B在胰腺癌组织中表达的相关性 42例胰腺癌组织中TSLC1和DAL-1/4.1B均阳性表达者为19.05%, TSLC1和DAL-1/4.1B均阴性表达者为59.52%, 两者的表达呈正相关($r_s = 0.489$, $P < 0.01$, 表3).

3 讨论

TSLC1基因位于染色体11q23.2, 全长大于300 kb, 含10个外显子, 其转录产物为4.4 kb或1.6 kb长的mRNA前体, 翻译生成442个氨基酸残基的跨膜糖蛋白. TSLC1蛋白含胞外区(373个氨基酸、跨膜区和胞质区(46个氨基酸). 胞外区包括3个免疫球蛋白样C2型片段, 与人神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)高度同源; 跨膜区为一疏水的 α 螺旋; 胞质区结构与血型糖蛋白C类似, 包括一个FERM(protein 4.1/ezrin/radixin/moesin)结合模体和一个PDZ(PSD-95/Dlg/ZO-1)结合模体, 并能与相应蛋白结合发挥其特殊功能. TSLC1属于免疫球蛋白超家族(IGSF), 编码一类免疫球蛋白超家族细胞黏附分子IgCAM, 该分子是参与细胞与细胞之间相互作用的一种膜蛋白^[1], 除外周血淋巴细胞外, 人体绝大部分正常组织均表达TSLC1分子, 他通过介导同种或异种细胞之间的相互黏附, 在抑制上皮组织来源的恶性肿瘤中起重要作用^[1,5]. 目前的研究发现, TSLC1是一种重要的抑癌基因, TSLC1的表达缺失或减少参与多种肿瘤的发生发展, 包括非小细胞肺癌^[1,6]、乳腺癌^[6-7]、脑脊膜瘤^[8]、前列腺癌^[9]、胃癌^[10]、鼻咽癌^[11-12]、食管癌^[13]和宫颈癌^[14-15]. 临床病理学研究分析显示TSLC1的失活在肿瘤晚期发生更

 表 2 TSLC1,DAL-1/4.1B的表达及与胰腺癌临床病理因素之间的关系 $n(\%)$

临床病理特征	n	TSLC1表达		DAL-1/4.1B表达	
		阳性(%)	P值	阳性(%)	P值
性别					
男	29	8(27.59)	0.731	9(31.03)	0.874
女	13	5(38.45)		3(23.08)	
年龄					
≤45	12	2(16.67)	0.370	1(8.33)	0.145
>45	30	11(36.67)		11(36.67)	
肿瘤部位					
胰头癌	18	3(16.67)	0.348	6(33.33)	0.689
胰体癌	16	7(43.75)		5(31.25)	
胰尾癌	6	2(33.33)		1(16.67)	
壶腹部癌	2	1(50.00)		0(0.00)	
分化程度					
高分化	12	7(58.33)	0.023	5(41.67)	0.023
中分化	17	5(29.41)		7(41.18)	
低分化	13	1(7.69)		0(0.00)	
淋巴结转移					
有	16	2(12.50)	0.042	1(6.25)	0.031
无	26	11(42.31)		11(42.31)	
病理分型					
管状腺癌	38	10(55.56)	1.000	12(31.58)	0.308
其他	4	1(25.00)		0(0.00)	
TNM分期					
I-II期	23	11(47.83)	0.023	11(47.83)	0.007
III-IV期	19	2(10.53)		1(5.26)	

频繁. 例如, 在原发性NSCLC中, 在肿瘤的Ib-IV期比Ia期优先检测到TSLC1甲基化^[6]. 在原发性食管癌中, TSLC1的缺失在II到IV期较I期发生频率更高^[13]. Uchino *et al*用免疫组化法发现TSLC1的表达与肿瘤分期, 淋巴结受累, 淋巴管渗透以及血管入侵呈负相关, 而且TSLC1表达缺失的肺腺癌的四生存期和生存期更短^[16]. Goto和Ito也发现TSLC1表达在肺泡腺癌的侵袭部位的表达下调^[4,17]. Yang *et al*^[15]研究发现在宫颈癌的CIN IIIs期比CIN IIs期更容易检测到TSLC1表达缺失, 而且具侵袭性的宫颈癌常伴有TSLC1表达缺失. 因此, 我们推测TSLC1可能与肿瘤的生物行为, 包括侵袭和转移有关. 本研究显示, TSLC1表达与胰腺癌分化程度, 淋巴结转移, TNM分期有关($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤部位以及病理分型无关($P > 0.05$), 研究结果与国外现有文献报道一致, 说明TSLC1可能影响胰腺癌的发生、发展、转移, TSLC1蛋白可以作为判断胰腺癌恶性程度的一个重要的生物学指标.

■创新盘点

本文检测了抑癌基因TSLC1在胰腺癌中的表达, 分析其与胰腺癌临床病理因素间的关系及与DAL-1/4.1B蛋白表达的相关性, 探讨TSLC1基因在胰腺癌发生发展中的作用及可能的分子机制.

■应用要点

本文对TSLC1和DAL-1/4.1B在胰腺癌中的相关性作出了初步探讨, 为深入了解TSLC1信号通路在肿瘤进展中的作用奠定了基础.

■名词解释

TSLC1: TSLC1属于免疫球蛋白超家族, 位于染色体11q23.2, 与神经细胞黏附分子(NCAM)高度同源。TSLC1又名免疫球蛋白超家族成员4(IGSF4)、突触细胞黏附分子1(SynCAM1)、RA175、柄蛋白样分子-2(Nect-2)及精子发生的免疫球蛋白超家族成员(SgIGSF)。

表 3 TSLC1和DAL-1/4.1B在胰腺癌中表达的相关性

	TSLC1(+)(%)	TSLC1(-)(%)	P	r_s
DAL-1/4.1B(+)	8/42(19.05)	4/42(9.52)	0.001	0.489
DAL-1/4.1B(-)	5/42(11.90)	25/42(59.52)		

DAL-1/4.1B定位于人类染色体的18P11.3区域, 该基因编码的蛋白产物的N末端的300个氨基酸与存在于所有的4.1超家族的蛋白中的一致性, 因此被认为是蛋白4.1超家族的一个新成员^[3]。DAL-1/4.1B在多种组织中都有表达, 包括胰腺组织, 但该基因的表达在大于半数的NSCLC^[3]或脑膜瘤、室管膜瘤^[18-20]和乳腺癌^[21]中表达极度减少。据Ohno *et al*^[22]报道DAL-1/4.1B在消化系统中可能不仅有维持其正常结构构建的作用, 而且有维持正常细胞增殖和黏附的作用, 因此可抑制小肠上皮细胞的恶性转化。Kikuch *et al*^[23]研究发现在肺腺癌DAL-1/4.1B甲基化的发生率随病理分期的升高而逐渐增高($P = 0.0026$)。迄今为止, 国内外没有DAL-1/4.1B和胰腺癌的相关报道, 本研究首次研究了DAL-1/4.1B在胰腺癌组织的表达情况。结果显示DAL-1/4.1B表达与胰腺癌分化程度、淋巴结转移、TNM分期有关($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤部位以及病理分型无关($P > 0.05$), 说明DAL-1/4.1B可能影响胰腺癌的发生、发展、转移, 进一步证实了DAL-1/4.1B是一种广泛存在的抑癌基因。

Yageta *et al*^[24]研究表明TSLC1可能通过其胞质侧的FERM结合模体与蛋白DAL-1/4.1B结合, 参与相邻细胞间肌动蛋白细胞骨架的构建, 从而维持稳定的黏附结构, 当其中的一种蛋白表达缺失时, 就会影响正常细胞黏附而导致癌的转移。另外, Heller *et al*^[25]发现由于TSLC1和DAL-1/4.1B基因甲基化引起的表达沉默在乳腺癌的发生过程中有重要作用。Heller *et al*^[26]研究证实了其中一种基因的甲基化发生的几率在II-III期比I期更高, 并且阐明了TSLC1和DAL-1/4.1B的表达沉默与NSCLC的病理学过程有重要关系。TSLC1-DAL-1/4.1B级联反应也影响原发性脑脊膜瘤^[8,18]的发生发展。这些都说明TSLC1和DAL-1/4.1B之间存在密切联系, 二者共同参与细胞骨架的构建和维持正常细胞的黏附功能的稳定。当TSLC1或DAL-1/4.1B表达失活时就会引起肿瘤的转移和侵袭, 从而在人体的多种

肿瘤中发挥重要的作用。我们用免疫组化方法研究了胰腺癌中两种基因的表达及其相互关系, 结果显示TSLC1、DAL-1/4.1B在胰腺癌组织中的阳性率分别为30.95%、28.57%, 明显低于正常胰腺组织77.78%、66.67%($P < 0.05$)和胰腺炎组织81.82%、81.82%($P < 0.01$); TSLC1表达与DAL-1/4.1B表达呈正相关($P < 0.01$)。肿瘤组织中TSLC1与DAL-1/4.1B的相关性尚待进一步研究。

总之, TSLC1与DAL-1/4.1B在胰腺癌组织表达下调或缺失, 两者基因表达失活均与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移及TNM分期有关, 并且二者具有相关性。TSLC1蛋白可能与DAL-1/4.1B蛋白共同参与胰腺癌的发生、发展和转移。

4 参考文献

- 1 Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2001; 27: 427-430
- 2 Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 543-552
- 3 Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 35-43
- 4 Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, Fukayama M. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci* 2005; 96: 480-486
- 5 Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y, Ohki M. A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics* 1999; 62: 139-146
- 6 Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 107: 53-59
- 7 Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, Launonen V, Winqvist R. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 384-389
- 8 Houshmandi SS, Surace EI, Zhang HB, Fuller GN, Gutmann DH. Tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) functions as a glioma tumor suppressor. *Neurology* 2006; 67: 1863-1866
- 9 Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhashi M, Nobukuni T, Maruyama T, Isogai K, Sekiya T, Shuin T, Kitamura T, Reeves RH, Murakami Y. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human

- prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 605-609
- 10 Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, Kawata S, Kimura W, Nishizuka S, Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 857-860
 - 11 Hui AB, Lo KW, Kwong J, Lam EC, Chan SY, Chow LS, Chan AS, Teo PM, Huang DP. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 2003; 38: 170-178
 - 12 Lung HL, Cheng Y, Kumaran MK, Liu ET, Murakami Y, Chan CY, Yau WL, Ko JM, Stanbridge EJ, Lung ML. Fine mapping of the 11q22-23 tumor suppressive region and involvement of TSLC1 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 112: 628-635
 - 13 Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, Guan XY, Sham JS, Chua D, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, Lung ML. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 9385-9392
 - 14 Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, Snijders PJ. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 294-305
 - 15 Yang YX, Yang AH, Yang ZJ, Wang ZR, Xia XH. Involvement of tumor suppressor in lung cancer 1 gene expression in cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1868-1872
 - 16 Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, Tsubota N, Okita Y, Kitamura Y. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83: 1175-1183
 - 17 Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, Okita Y, Okada M. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2003; 98: 1002-1007
 - 18 Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1495-1500
 - 19 Charboneau AL, Singh V, Yu T, Newsham IF. Suppression of growth and increased cellular attachment after expression of DAL-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2002; 100: 181-188
 - 20 Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, Weaver A, Gutmann DH. Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 872-879
 - 21 Perry A, Giannini C, Raghavan R, Scheithauer BW, Banerjee R, Margraf L, Bowers DC, Lytle RA, Newsham IF, Gutmann DH. Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 994-1003
 - 22 Ohno N, Terada N, Murata S, Yamakawa H, Newsham IF, Katoh R, Ohara O, Ohno S. Immunolocalization of protein 4.1B/DAL-1 during neoplastic transformation of mouse and human intestinal epithelium. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 579-586
 - 23 Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2954-2961
 - 24 Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5129-5133
 - 25 Heller G, Geradts J, Ziegler B, Newsham I, Filipits M, Markis-Ritzinger EM, Kandioler D, Berger W, Stiglbauer W, Depisch D, Pirker R, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 103: 283-291
 - 26 Heller G, Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfützenreuter A, Lang G, Gazdar AF, Minna JD, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene* 2006; 25: 959-968

■同行评价

本文检测TSLC1和DAL-1/4.1B蛋白在胰腺癌组织中的表达, 选题新颖, 有一定临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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!

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈力 教授
浙江大学医学院附属第二医院外科

陈耀凯 副教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

郭晓钟 教授
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

韩新巍 教授
河南省郑州大学第一附属医院放射科

姜慧卿 教授
河北医科大学第二医院消化科

李增山 副教授
中国人民解放军第四军医大学病理教研室

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘彬彬 副研究员
复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

任粉玉 副教授
延边大学附属医院消化内科

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

万军 主任医师
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王蒙 副教授
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

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化内科

张筱茵 副教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

张占卿 主任医师
上海市(复旦大学)公共卫生中心

张志坚 教授
福州总医院消化内科

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科

朱传武 副主任医师
江苏省苏州市第五人民医院传染科