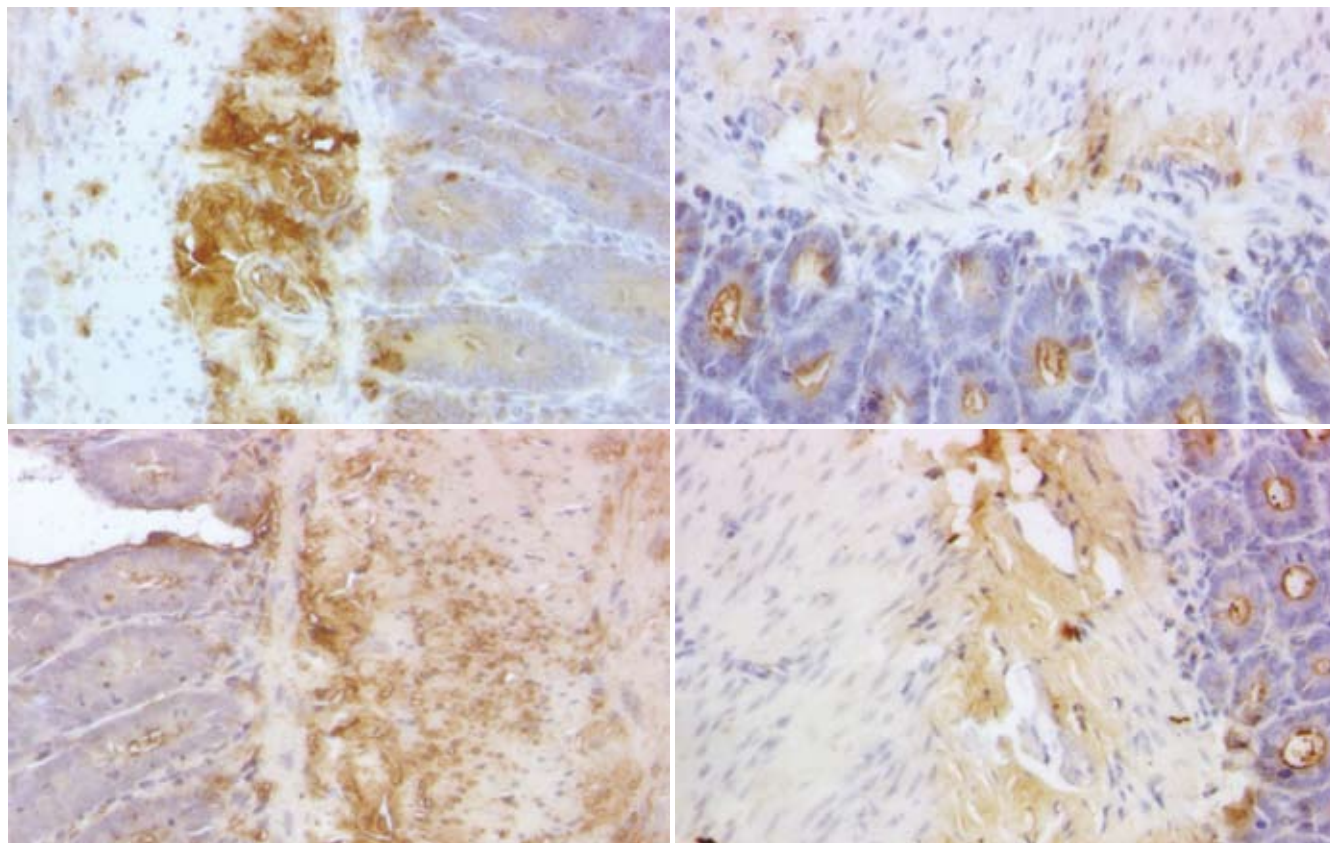


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年5月28日 第17卷 第15期 (Volume 17 Number 15)



15 / 2009

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

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄象谦教授  
黄志强教授  
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  
杨思风教授  
姚希贤教授  
岳茂兴教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 常务编委

程英升教授  
范学工教授  
高毅主任医师  
江学良主任医师  
李岩教授  
刘连新教授  
吕宾教授  
罗和生教授  
聂青和教授  
王小众教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
聂新明教授  
陈洪副教授

陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
崔立红副教授  
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  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
何松教授  
洪天配教授  
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  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李祖国副教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海林主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
马欣主任医师

倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
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  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承尧副教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
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  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
周国雄主任医师  
朱春兰主任医师  
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  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
仇毓东副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
单云峰副主任医师  
丁义涛教授  
董明教授  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
葛海燕教授  
龚建平教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何超教授  
何裕隆教授  
黄志勇副教授  
季加孚教授  
英卫东副主任医师  
蒋龙元副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李靖副教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师

李文岗副教授  
李旭副教授  
梁力建教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘作金副教授  
卢实春教授  
陆才德教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
裘正军教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施诚仁教授  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
汤恢焕教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王要军教授  
王悦华副主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪副主任医师  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨家和主任医师  
杨秋蒙副主任医师  
杨维良教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈耀凯副教授  
陈志辉副主任医师  
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  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
林菊生教授  
刘杞教授  
刘正稳教授  
貌盼勇研究员  
宁琴教授  
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  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
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  
宣世英教授  
杨江华副主任医师  
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  
赵连三教授  
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  
李军祥教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘孟安教授  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
沈洪教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
谢鸣教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
张声生教授

### 消化肿瘤学

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  
沈克平主任医师  
肖文华主任医师  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
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

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授

吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
樊红副教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
胡旭初副教授  
黄文林教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
梅林教授  
彭曦副研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授

周晓东研究员  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
李淳副教授  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
马大烈教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
魏蕾教授  
阎晓初副教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 5 月 28 日 第 17 卷 第 15 期 (总第275期)

## 述 评

1485 CT在儿童肝脏疾病诊治中的应用

谭艳, 肖恩华

## 基 础 研 究

1489 人STIM1基因真核表达载体的构建及其在肝细胞中的表达

张振亚, 张宗明, 潘丽洁

1493 端粒酶逆转录酶和P53在大鼠肝癌发生中的动态变化

陈颖, 孔庆忠

1498 HSV-TK+GFP/GCV自杀基因系统对小鼠胰腺癌的治疗作用

刘为青, 杨军, 董坚

1504 槐耳清膏对缺氧结肠癌SW480细胞VEGF及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响

吕赤, 苏琪, 徐锋, 殷红专

1508 幽门螺杆菌动物模型驯化菌株SS1与其初始菌株的差异蛋白质组分析

李晶, 赵飞, 肖迪, 何利华, 张建中

## 临 床 研 究

1513 TMEM16A在食管鳞癌中的表达及意义

柏文霞, 施瑞华, 王建宁, 郝波, 刘伟

1517 兰州胃癌及异型增生组织微卫星不稳定性的检测

杨永成, 周永宁, 罗冲, 郭娴, 陈静, 王学红, 芦永福

1522 中国部分汉族人群中IL-6基因启动子-572G/C多态性与HBV感染易感性的关系

戴悦, 刘晓琳, 柴庆波, 盖郁慧, 李岩, 刘宝国

## 文 献 综 述

1527 胃幽门螺杆菌检测技术进展

闫伟, 曹建彪

1534 瘦素抵抗与胰岛素抵抗

张莉, 柳涛, 郑培永, 季光

1540 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展

高金生, 杨书良

## 研 究 快 报

1545 肉桂油对小鼠胃白念珠菌感染的治疗作用

马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联

1548 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价

安钰, 白殿卿, 付健, 孙晓宁

1552 正丁酸盐诱导的大鼠非炎症性结肠致敏模型

叶建明, 胡品津, 薛存宽, 何学斌, 蒋朋, 汪晓珍

1558 丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆

## 临 床 经 验

1561 caveolin-1、Dnmt1基因与胃癌发生发展的关系及其临床意义

刘斌, 顾立萍, 邢传平, 哈英娣, 高自芳, 苏勤军, 张俊会, 钱震, 董亮

1567 产ESBLs细菌在肝硬化合并自发性腹膜炎患者腹水中的检测及其耐药性

骆成林, 呼闯营, 殷国建, 睦振宇, 程桂莲, 王少峰

	<p>1570 广西肝癌高、低发区CYP3A5基因多态性的对比 卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 冯震博</p> <p>1575 恶性阻塞性黄疸临床分析153例 刁同进, 高百春, 蔡宏剑, 宫林, 矫学黎, 于茜茜</p> <p>1582 中国人群幽门螺杆菌感染相关因素的Meta分析 张天哲, 张铁民, 赵丹丹, 唐桂钰</p>
致 谢	1590 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1497 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>1521 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>1526 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>1533 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1539 中国科技期刊引证报告(核心版)发布WJG 2007年影响因子0.745</p> <p>1544 世界华人消化杂志投稿方式</p> <p>1547 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>1551 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>1557 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>1566 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>1574 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>1581 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568</p> <p>1589 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p>
封面故事	<p>Liu J, Wan R, Xu XF, Wang XP, Yang WJ, Xia YJ, Liu H, Yan QL, Yan DX, Guo CY. Effect of Lianshu preparation on lipopolysaccharide-induced diarrhea in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(16): 2009-2015 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp</a></p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div> <div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-05-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>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</div>	<div>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</div> <div>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</div> <div>印刷 北京科信印刷厂</div> <div>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)</div> <div>订购 全国各地邮电局</div> <div>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</div>	<div>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。</div> <div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 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。</div> <div>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。</div> <div>2009年版权归世界华人消化杂志所有</div>		
中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079</b> <b>CN 14-1260/R</b>	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每册24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

# World Chinese Journal of Digestology

## May 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 15

<b>EDITORIAL</b>	1485 Application of computed tomography for diagnosis and treatment of liver diseases in children <i>Tan Y, Xiao EH</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1489 Construction of human STIM1 eukaryotic expression vector and its expression in HL-7702 cells <i>Zhang ZY, Zhang ZM, Pan LJ</i></p> <p>1493 Dynamic changes of telomerase reverse transcriptase and P53 in the development of rat hepatocellular carcinoma <i>Chen Y, Kong QZ</i></p> <p>1498 Effects of HSV-TK+GFP/GCV suicide gene therapy system on mouse pancreatic cancer cells <i>Liu WQ, Yang J, Dong J</i></p> <p>1504 Effect of Huaier cream on expression of VEGF and HIF-1<math>\alpha</math> in colon cancer cells SW480 under hypoxia <i>in vitro</i> <i>Lv C, Su Q, Xu F, Yin HZ</i></p> <p>1508 Comparative proteomic analysis of <i>Helicobacter pylori</i> animal model adapted SS1 and its original strain <i>Li J, Zhao F, Xiao D, He LH, Zhang JZ</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>1513 Expression and significance of TMEM16A in esophageal squamous cell carcinoma <i>Bai WX, Shi RH, Wang JN, Hao B, Liu W</i></p> <p>1517 Detection of microsatellite instability in gastric cancer and dysplasia tissue in Lanzhou province of China <i>Yang YC, Zhou YN, Luo C, Guo X, Chen J, Wang XH, Lu YF</i></p> <p>1522 Relationship between the -572G/C polymorphism in IL-6 gene promoter and hepatitis virus B infection in Chinese Han population <i>Dai Y, Liu XL, Chai QB, Gai YH, Li Y, Liu BG</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>1527 Progress in detection of gastric <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Yan W, Cao JB</i></p> <p>1534 Leptin resistance and insulin resistance <i>Zhang L, Liu T, Zheng PY, Ji G</i></p> <p>1540 Advance in causes and mechanisms of intestinal injury <i>Gao JS, Yang SL</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1545 Therapeutic effect of cinnamon oil on gastric <i>candida albicans</i> infection in mice <i>Ma YH, Deng JH, Wang GS, Zhang XG, Wang AX, Si RL</i></p> <p>1548 Establishment and evaluation of a rat IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress <i>An Y, Bai DQ, Fu J, Sun XN</i></p> <p>1552 A butyrate-induced model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats <i>Ye JM, Hu PJ, Xue CK, He XB, Jiang P, Wang XZ</i></p> <p>1558 Sodium butyrate induces apoptosis and regulates caspase-3 in colorectal cancer cells COLO205 <i>Diao B, Tang Y, Wen Y, Wang XK</i></p>

<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1561 Clinical significance and association of caveolin-1, Dnmt1 gene with carcinogenesis and development of gastric carcinomas <i>Liu B, Gu LP, Xing CP, Ha YD, Gao ZF, Su QJ, Zhang JH, Qian Z, Dong L</i></p> <p>1567 Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases producing strains and drug resistance analysis in ascitic patients with spontaneous bacterial peritonitis <i>Luo CL, Hu CY, Yin GJ, Sui ZY, Cheng GL, Wang SF</i></p> <p>1570 Comparative analysis on the genetic polymorphisms of CYP3A5 between hepatocellular carcinoma high and low incidence area in Guangxi Zhuang Autonomous Region <i>Lu FM, Liu DP, Meng QY, Guo MF, Feng ZB</i></p> <p>1575 Malignant biliary obstructive jaundice: a clinical analysis of 153 cases <i>Diao TJ, Gao BC, Cai HJ, Gong L, Jiao XL, Yu QQ</i></p> <p>1582 Meta-analysis of factors relative to <i>Helicobacter pylori</i> infection in China <i>Zhang TZ, Zhang TM, Zhao DD, Tang GY</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>1590 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Liu J, Wan R, Xu XF, Wang XP, Yang WJ, Xia YJ, Liu H, Yan QL, Yan DX, Guo CY.</i> Effect of Lianshu preparation on lipopolysaccharide-induced diarrhea in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(16): 2009-2015 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993  
Renamed on January 25, 1998  
Publication date May 28, 2009

### 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](mailto: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](mailto: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

© 2009 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at [www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# CT在儿童肝脏疾病诊治中的应用

谭艳, 肖恩华

谭艳, 肖恩华, 中南大学湘雅二医院放射科 湖南省长沙市 410011

肖恩华, 博士后, 教授, 主要从事肝脏疾病影像诊断与介入治疗研究。

作者贡献分布: 本文综述由谭艳完成, 肖恩华审校。

通讯作者: 肖恩华, 教授, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院放射科. [cjr.xiaoenhua@vip.163.com](mailto:cjr.xiaoenhua@vip.163.com)

电话: 0731-5292116

收稿日期: 2009-02-20 修回日期: 2009-03-25

接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-05-28

## Application of computed tomography for diagnosis and treatment of liver diseases in children

Yan Tan, En-Hua Xiao

Yan Tan, En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. [cjr.xiaoenhua@vip.163.com](mailto:cjr.xiaoenhua@vip.163.com)

Received: 2009-02-20 Revised: 2009-03-25

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-05-28

### Abstract

Computed tomography (CT) has become an extremely valuable tool for disease diagnosis since it was invented. With the rapid development of technology in recent years, CT has become more widely used, especially in this particular group of children. This article sums up on the application of CT for liver cancer, portal lesions, liver trauma and the application of low-dose CT in children.

Key Words: Children; Liver cancer; Portal lesion; Liver trauma; Low-dose computed tomography

Tan Y, Xiao EH. Application of computed tomography for diagnosis and treatment of liver diseases in children. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1485-1488

### 摘要

近年来, 伴随着CT技术的迅猛发展, CT在疾病诊治中的应用更为广泛。特别是为儿童这一特

殊群体带来了更多的便利。本文就CT在儿童肝脏肿瘤, 门脉病变, 外伤中的应用以及低剂量CT等方面作一综述。

关键词: 儿童; 肝脏肿瘤; 门脉病变; 肝脏外伤; 低剂量CT

谭艳, 肖恩华. CT在儿童肝脏疾病诊治中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1485-1488

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1485.asp>

### 0 引言

计算机断层成像(computed tomography, CT)自问世就成为一种极有诊断价值的工具。近年来CT技术的迅猛发展, 使其得到更为广泛的应用, 特别是为儿童这一特殊群体带来了更多的便利。本文就CT在儿童肝脏肿瘤, 门脉病变, 外伤及低剂量CT的应用等方面作一综述。

### 1 CT在儿童肝脏肿瘤的应用

肝脏肿瘤是继肾母细胞瘤和神经母细胞瘤之后第3种常见的儿童腹部肿瘤, 约占儿童肿瘤的0.3%-2%<sup>[1]</sup>, 一般恶性肿瘤的发生率是良性肿瘤的2倍。儿童肝脏的恶性肿瘤中以肝母细胞瘤(hepatocarcinoma, HB)最常见, 约占儿童的0.9%, 通常发生在3岁以前; 其次为肝细胞癌, 肝未分化肉瘤罕见。王中林 *et al* 回顾性分析1990-2005年复旦大学附属儿科医院住院诊断为肝脏恶性肿瘤的52例患儿临床病理资料, 其中HB为主(29/52), 其次为肝细胞癌(12/52)<sup>[2]</sup>。Andres *et al* 回顾性研究78名患肝脏肿瘤的儿童, 大部分是恶性肿瘤(57例), 最常见的是HB(47例), 随后是肝细胞癌(5例), 肉瘤(4例)和淋巴瘤(1例)<sup>[3]</sup>。这里主要介绍儿童肝脏的恶性肿瘤。

1.1 HB HB属于胚胎性肿瘤, 源于未分化的胚胎组织中能分化为肝细胞和胆管上皮细胞的多潜能干细胞。组织学上分为上皮型(56%)及上皮/间充质混合型, 混合型常见。常表现为无症状性上腹部增大包块, 表现体质量减轻、食欲减退、呕吐、腹痛出现则预示病情加重。大约90%患儿血

### ■背景资料

CT能使肝脏肿瘤的部位、大小范围、性质、血供以及肿瘤与周围组织的关系显示的更好。特别是三维重建图像能够旋转从不同侧面观察肿瘤, 重建图像为半透明, 可以测量肿瘤的大小及确定肿瘤与血管的空间关系。

### ■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

## ■研发前沿

如何使儿童在CT扫描腹部的辐射减少,是亟待研究的问题。

清甲胎蛋白(AFP)水平升高,且升高水平与疾病程度具有相关性。

HB多为单个巨大分叶状低密度肿块,多见于右叶,平扫边缘清楚或不清,内可见多发散在更低密度区,巨型或肝下部肿瘤常突入腹腔,边缘性外生性肿瘤呈哑铃状,约半数病例肿瘤内可见散在或聚集状钙化灶;增强扫描病灶周围呈结节状、片状明显强化,密度高于肝脏,门脉期呈低密度<sup>[4]</sup>。HB转移的主要部位是肺和门静脉<sup>[5]</sup>。多发结节型、弥漫型及囊性HB均属罕见,CT表现缺乏特异性。HB瘤的鉴别诊断应包括儿童期的原发性肝细胞癌、未分化胚胎性肉瘤及一些良性肿瘤。

**1.2 肝细胞癌** 原发性肝细胞癌仅次于HB,位居儿童肝肿瘤第2位,与癌基因激活和抑癌基因的失活有关,也与乙型肝炎病毒关系密切<sup>[6-7]</sup>。大部分肝细胞癌患者临床症状比较隐匿,通常无明显的临床表现或仅腹部扪及肿块。肝细胞癌患者年龄多>4岁,CT表现常为多发结节,出血及钙化少见,更易发生肝内及肝外转移<sup>[8]</sup>。

CT能使肝脏肿瘤的部位、大小范围、性质、血供以及肿瘤与周围组织的关系显示的更好。特别是三维重建图像能够旋转从不同侧面观察肿瘤,重建图像为半透明,可以测量肿瘤的大小及确定肿瘤与血管的空间关系。CT三维成像能提供肿瘤的高质量图像及其与肝脏重要血管的相对位置。和传统影响技术相比,CT三维成像能提供相对准确的方法来帮助外科医生对肿瘤准确定位,并设计相对安全的手术策略。有了这种技术帮忙,外科医生能术前鉴别肝脏重要血管,以避免术中大出血。Dong *et al*研究过去5年18例肝脏巨大肿瘤或肝门区肿瘤的儿童,均在“肿瘤游离”微观边界的引导下治愈性手术切除,术中及术后并未发生重大的并发症<sup>[9]</sup>。

## 2 CT在儿童先天性门静脉异常的应用

一些儿童显示先天性门静脉异常并伴随症状,这需要放射科医生的认识及识别;再者,腹部的炎症和肿瘤也可引起门静脉系统的继发改变<sup>[10]</sup>。这里着重介绍儿童先天性门静脉异常。

门静脉一般是由脾静脉及肠系膜上静脉在L2水平融合形成,位于下腔静脉前,胰腺之后。Patriquin *et al*在156位无肝脏疾病的儿童研究中显示,在出生时门静脉直径约3-5 mm,1岁时约4-8 mm,5岁时约6-8 mm,10岁时约6-9 mm,15岁时约7-11 mm(被研究者在静息,仰卧位,平静呼

吸,禁食1-3 h的状态下测量)<sup>[11]</sup>。多层螺旋CT在静脉注射造影剂,延迟扫描约60 s能较好显示门静脉的解剖结构;多维平面重建,特别是冠状重建,是显示门脉解剖结构的理想模式。

**2.1 先天性门静脉缺失** 先天性门静脉缺失,血液经肠系膜上静脉及脾静脉经肝的侧枝回流到体循环静脉。这首次是在1793年被Abernathy发现,并成为门体分流术的模板<sup>[12]</sup>。Morgan *et al*<sup>[13]</sup>及Howard *et al*<sup>[14]</sup>随后提出将门静脉分流分为2种不同的类型: I型为门静脉所有的血流经肝脏的侧支循环回流到体循环,这种类型的分流叫完全分流; II型为门静脉的部分血液直接经肝脏回流,这种类型的分流叫部分分流。区分这两种类型对血管手术有非常重要的意义。I型患者一旦侧枝被阻塞,患者的结局将不乐观,因为这是门静脉回流的唯一途径<sup>[15]</sup>;然而II型患者能经血管结扎成功治疗<sup>[16]</sup>。Morgan *et al*<sup>[13]</sup>将I型进一步分为I a, I b: I a指肠系膜上静脉及脾静脉在门静脉血流分流到体循环之后融合(门静脉解剖和生理的缺失),然而I b指肠系膜上静脉及脾静脉在门静脉血流进入体循环前融合(门静脉生理的缺失)。

这种分类中,据报道I型好发于女性,特别是I a型<sup>[14,17]</sup>。门静脉先天缺失常合并其他先天异常,包括心血管发育缺陷,骨骼异常(如戈尔登哈综合征),内脏转位,多脾和肝脏病理改变(如肝细胞癌,局灶性结节增生,肝毒细胞瘤,腺瘤,胆道闭锁,门脉高压和肝性脑病)<sup>[17]</sup>。

**2.2 门静脉分支先天发育不全** 门脉主要分支发育不全是较常见的先天异常。先天发育不全与继发门脉萎缩的重要区别是门脉主干的缺失伴随相应肝叶的缺失<sup>[18]</sup>,门脉分支及相应肝叶的缺失理论上可能是由原发门脉分支发育不良<sup>[19]</sup>,或是在胚胎期门脉主干血栓形成并累及相应肝段<sup>[20]</sup>。

**2.3 门静脉发育不全,闭锁和狭窄** 门静脉发育不全常见于胆道闭锁的患者,并能增加肝移植患者的并发症<sup>[21]</sup>。门静脉发育不全,闭锁和狭窄能引起血管阻塞,并发门脉高压,脾大和消化系出血,合称班替氏综合征(Banti's syndrome)。与先天性门静脉缺失概念性的区别是,先天性门静脉缺失的门脉血流是直接回流到体循环,而门静脉闭锁是门静脉血流的阻塞。先天门静脉闭锁可累及整个门脉或局限于肝门区的分支。出生后脐静脉和静脉导管在正常退化中过度闭锁则提示这些变异<sup>[22]</sup>。

**2.4 肝门的血管瘤和动静脉畸形** 血管瘤和动静脉

## ■应用要点

随着CT技术的进一步发展,在儿童肝脏疾病中的应用将发挥越来越重要的作用。

脉畸形在病理过程中有着本质的不同,但是经常一起讨论并有着相似的影像学特征,并表现肝大,充血性心力衰竭和贫血等相似的征象<sup>[23]</sup>.血管瘤是良性新生物,早期的增殖期和随后的退化期,是婴儿最常见的血管新生物<sup>[24]</sup>.然而动静脉畸形是没有增殖和退化的潜能<sup>[23]</sup>.

### 3 CT在儿童肝脏外伤诊治中的应用

虽然脑部和胸部创伤是最常见死亡和致残的原因,但是腹部外伤是儿童最常见的最初无法辨识的致命伤.肝脏作为腹部最大的实质器官在腹部外伤中很容易受伤,因为他的包膜相对薄,并且相对于肋骨和脊柱位置较固定<sup>[25]</sup>.儿童腹部外伤肝脏容易受累,因为儿童肋骨较成年人更柔韧,这就允许更大的力传导到肝脏,并且儿童肝脏未完全发育,结缔组织框架较成人薄弱<sup>[25]</sup>.基于这些原因,查明危及儿童生命的肝脏损伤具有重要的意义.

肝脏外伤的主要CT表现是肝脏撕裂伤,包膜下和实质血肿,活动性出血和肝脏静脉损伤;次要表现包括门静脉周密度减低和下腔静脉变扁.肝脏撕裂伤在CT增强扫描呈现不规则区域.肝脏撕裂伤若累及肝脏第七段的后上方即肝脏裸区,可能伴随下腔静脉周腹膜后血肿和右侧肾上腺血肿.肝脏包膜下血肿在CT增强扫描表现为在肝包膜和肝实质间椭圆形低密度影.血肿压迫肝脏.肝实质出血或挫伤在CT增强扫描表现肝实质局部不规则,边界不清的低密度灶.急性血肿在CT增强扫描相对于正常肝实质明显强化,CT值约40-60 HU<sup>[26]</sup>.肝脏钝伤引起的急性出血可在CT增强扫描早期可见,表现为局部高密度,代表了含有造影剂的动脉血外渗. Willmann *et al*报道在多层螺旋CT上活动性动脉血外渗CT值为91-274(平均155) HU,血凝块CT值为28-82(平均54) HU<sup>[27]</sup>.肝挫裂伤的胆汁渗漏很常见,但大部分都是短暂和局限性的,且没有不利的并发症.要明确肝内或肝外胆管损伤来明确治疗方案相对少见<sup>[26]</sup>.CT扫描胆管损伤可能表现像肝脏撕裂伤,腹水或局部的肝周积液.然而肝胆管的闪烁显像能显示胆管破裂处胆汁的活动性外渗<sup>[28]</sup>.

John *et al*发现胰腺的损伤常合并严重的肝脏损伤.这个发现很重要,因为胰腺损伤早期在CT扫描容易遗漏或误诊,但是有较高的发病率和死亡率<sup>[29]</sup>.因此在儿童严重肝脏损伤应高度怀疑伴随胰腺损伤,特别是监护患者. CT随访和实

验室检查至关重要.虽然CT能较好的显示肝脏外伤,然而腹部外伤儿童的表现和密切检测对儿童的治疗非常重要<sup>[30]</sup>.

### 4 低剂量CT在儿童患者中应用

最近报道提出了密切关注的癌症风险是由于儿童在CT扫描腹部的辐射暴露,这就需要重新评估CT的适应证.但由于对病变显示的独特优势,CT检查在儿童临床应用中仍具有不可替代的作用,因此提出了低剂量CT.

降低CT辐射剂量的策略: (1)一般方法: 在作CT检查前,要全面衡量CT检查的利弊,如果利大于弊,且为不可替代的检查手段时,就要尽可能减少照射野,或者使用特制的防护装置.据 Hopper *et al*<sup>[31]</sup>和Fricke *et al*<sup>[32]</sup>调查在胸部CT检查时,用防护垫可以减少乳腺的照射量,在成人和儿童分别为29%-57%,而不影响诊断质量.此外还要注意对较大儿童进行呼吸训练,以锻炼闭气的能力,从而减少不必要的重复照射. (2)扫描参数的调节: 降低管电流;增加螺距;降低管电压.

腹部结构复杂,包括腹部脏器以及腹腔、腹膜后间隙,他们彼此之间存在着不同程度的自然对比,同肺部相比,腹部诸结构的对比分辨率较低,因此更依赖提高空间分辨率来显示病变,如提高管电流等方法,这使得低剂量CT在腹部的应用受到一定限制.最近Frush *et al*<sup>[33]</sup>利用计算机模拟技术,分别用100、80、60和40 mA 4种管电流进行CT检查,然后对高对比的组织,如肾上腺和镰状韧带周围脂肪及低对比组织,如肝固有动脉、肝内血管和胆总管等进行对比分析,发现80 mA是显示低对比组织较好的电流,而上述任一电流均可将高对比组织显示清楚,表明低剂量CT也可以在腹部应用.一般低剂量CT在实质性脏器(如肝脏、胰腺、脾脏和肾脏等)扫描的管电流多控制在100-180 mA.

### 5 结论

由于CT的灵敏度,特异性及准确性高,CT在儿童肝脏疾病中的应用占着很重要的作用,为临床医生提供了大量的信息,但是由于儿童在CT扫描腹部的辐射暴露,又使CT的应用受到一定限制和顾虑,相信CT技术的进一步发展,能克服这一弊端,更好地为医生和患者服务.

### 6 参考文献

- 1 von Schweinitz D. Management of liver tumors in

### ■名词解释

班替氏综合征(Banti's syndrome): 门静脉发育不全、闭锁和狭窄引起血管阻塞,并发门脉高压,脾大和消化系统出血,称为班替氏综合征.

## ■同行评价

本文列举CT在儿童肝脏疾病中应用,值得借鉴或推荐,是一篇较好的综述。

- 2 childhood. *Semin Pediatr Surg* 2006; 15: 17-24
- 3 王中林, 王晓红, 王岱明. 儿童肝脏恶性肿瘤52例分析. *复旦学报* 2008; 35: 133-135
- 4 Andres AM, Hernandez F, Lopez-Santamaría M, Gámez M, Murcia J, Leal N, López Gutierrez JC, Frauca E, Sastre A, Tovar JA. Surgery of liver tumors in children in the last 15 years. *Eur J Pediatr Surg* 2007; 17: 387-392
- 5 李新华, 杨有优, 邓德茂, 李胜男, 姜国华. 儿童肝母细胞瘤的CT诊断. *实用放射学杂志* 2007; 23: 795-797
- 6 周莺, 顾晓红, 奚文华, 朱铭. 儿童肝脏肿瘤的CT诊断价值. *中国医学影像技术* 2007; 23: 1847-1849
- 7 Chen CH, Chen YY, Chen GH, Yang SS, Tang HS, Lin HH, Lin DY, Lo SK, Du JM, Chang TT, Chen SC, Liao LY, Kuo CH, Lin KC, Tai DI, Changchien CS, Chang WY, Sheu JC, Chen DS, Liaw YF, Sung JL. Hepatitis B virus transmission and hepatocarcinogenesis: a 9 year retrospective cohort of 13676 relatives with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 40: 653-659
- 8 Amin J, Dore GJ, O'Connell DL, Bartlett M, Tracey E, Kaldor JM, Law MG. Cancer incidence in people with hepatitis B or C infection: a large community-based linkage study. *J Hepatol* 2006; 45: 197-203
- 9 张定, 牟奇猛. 小儿肝母细胞瘤的CT诊断. *实用医技杂志* 2007; 14: 3844-3846
- 10 Dong Q, Xu W, Jiang B, Lu Y, Hao X, Zhang H, Jiang Z, Lu H, Yang C, Cheng Y, Yang X, Hao D. Clinical applications of computerized tomography 3-D reconstruction imaging for diagnosis and surgery in children with large liver tumors or tumors at the hepatic hilum. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 1045-1050
- 11 Corness JA, McHugh K, Roebuck DJ, Taylor AM. The portal vein in children: radiological review of congenital anomalies and acquired abnormalities. *Pediatr Radiol* 2006; 36: 87-96, quiz 170-171
- 12 Patriquin HB, Perreault G, Grignon A, Boisvert J, Filiatrault D, Garel L, Blanchard H. Normal portal venous diameter in children. *Pediatr Radiol* 1990; 20: 451-453
- 13 Abernathy J. Account of two instances of uncommon formation in the viscera of the human body. *Philos Trans R Soc Lond* 1793; 83: 59-66
- 14 Morgan G, Superina R. Congenital absence of the portal vein: two cases and a proposed classification system for portosystemic vascular anomalies. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1239-1241
- 15 Howard ER, Davenport M. Congenital extrahepatic portocaval shunts--the Abernethy malformation. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 494-497
- 16 Murray CP, Yoo SJ, Babyn PS. Congenital extrahepatic portosystemic shunts. *Pediatr Radiol* 2003; 33: 614-620
- 17 Shinkai M, Ohhama Y, Nishi T, Yamamoto H, Fujita S, Take H, Adachi M, Tachibana K, Aida N, Kato K, Tanaka Y, Takemiya S. Congenital absence of the portal vein and role of liver transplantation in children. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1026-1031
- 18 De Gaetano AM, Gui B, Macis G, Manfredi R, Di Stasi C. Congenital absence of the portal vein associated with focal nodular hyperplasia in the liver in an adult woman: imaging and review of the literature. *Abdom Imaging* 2004; 29: 455-459
- 19 Ozgun B, Warshauer DM. Absent medial segment of the left hepatic lobe: CT appearance. *J Comput Assist Tomogr* 1992; 16: 666-668
- 20 Sato M, Ishida H, Konno K, Naganuma H, Komatsuda T, Hamashima Y, Watanabe S. Congenital absence of the horizontal portion of the left portal vein: ultrasound findings. *Eur Radiol* 2000; 10: 362-364
- 21 Radin DR, Colletti PM, Ralls PW, Boswell WD Jr, Halls JM. Agenesis of the right lobe of the liver. *Radiology* 1987; 164: 639-642
- 22 Mitchell A, John PR, Mayer DA, Mirza DF, Buckels JA, De Ville De Goyet J. Improved technique of portal vein reconstruction in pediatric liver transplant recipients with portal vein hypoplasia. *Transplantation* 2002; 73: 1244-1247
- 23 Marks C. Developmental basis of the portal venous system. *Am J Surg* 1969; 117: 671-681
- 24 Gallego C, Miralles M, Marín C, Muyor P, González G, García-Hidalgo E. Congenital hepatic shunts. *Radiographics* 2004; 24: 755-772
- 25 Kassarian A, Dubois J, Burrows PE. Angiographic classification of hepatic hemangiomas in infants. *Radiology* 2002; 222: 693-698
- 26 Alonso M, Brathwaite C, Garcia V, Alonso M, Brathwaite C, Garcia V, Patterson L, Scherer T, Stafford P, Young J. Practice Management Guidelines for the Nonoperative Management of Blunt Injury to the Liver and Spleen. East Practice Management Guidelines Work Group, Eastern Association for the Surgery of Trauma, 2003
- 27 Yoon W, Jeong YY, Kim JK, Seo JJ, Lim HS, Shin SS, Kim JC, Jeong SW, Park JG, Kang HK. CT in blunt liver trauma. *Radiographics* 2005; 25: 87-104
- 28 Willmann JK, Roos JE, Platz A, Pfammatter T, Hilfiker PR, Marincek B, Weishaup D. Multidetector CT: detection of active hemorrhage in patients with blunt abdominal trauma. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 437-444
- 29 Gupta A, Stuhlfaut JW, Fleming KW, Lucey BC, Soto JA. Blunt trauma of the pancreas and biliary tract: a multimodality imaging approach to diagnosis. *Radiographics* 2004; 24: 1381-1395
- 30 Deluca JA, Maxwell DR, Flaherty SK, Prigozen JM, Scragg ME, Stone PA. Injuries associated with pediatric liver trauma. *Am Surg* 2007; 73: 37-41
- 31 Visrutaratna P, Na-Chiangmai W. Computed tomography of blunt abdominal trauma in children. *Singapore Med J* 2008; 49: 352-358; quiz 359
- 32 Hopper KD, King SH, Lobell ME, TenHave TR, Weaver JS. The breast: in-plane x-ray protection during diagnostic thoracic CT--shielding with bismuth radioprotective garments. *Radiology* 1997; 205: 853-858
- 33 Fricke BL, Donnelly LF, Frush DP, Yoshizumi T, Varchena V, Poe SA, Lucaya J. In-plane bismuth breast shields for pediatric CT: effects on radiation dose and image quality using experimental and clinical data. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 407-411
- 34 Frush DP, Slack CC, Hollingsworth CL, Bisset GS, Donnelly LF, Hsieh J, Lavin-Wensell T, Mayo JR. Computer-simulated radiation dose reduction for abdominal multidetector CT of pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1107-1113

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 人STIM1基因真核表达载体的构建及其在肝细胞中的表达

张振亚, 张宗明, 潘丽洁

张振亚, 张宗明, 潘丽洁, 清华大学医学院 清华大学第一附属医院消化中心普外科 北京市 100016

张振亚, 2006年清华大学医学院博士, 主要从事细胞离子通道与肝胆外科疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30270532, No. 30670774

清华-裕元医学科学研究基金资助项目, No. 20240000531, No. 20240000547

作者贡献分布: 张宗明设计课题、指导实验研究; 张振亚参与设计课题、主要完成实验研究; 潘丽洁完成部分实验研究; 张振亚与张宗明撰写论文。

通讯作者: 张宗明, 教授, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化中心普外科。

zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

电话: 010-64372362

收稿日期: 2009-03-04 修回日期: 2009-04-15

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

## Construction of human STIM1 eukaryotic expression vector and its expression in HL-7702 cells

Zhen-Ya Zhang, Zong-Ming Zhang, Li-Jie Pan

Zhen-Ya Zhang, Zong-Ming Zhang, Li-Jie Pan, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30270532, No. 30670774; and the Tsinghua-Yue-Yuen Medical Science Foundation, No. 20240000531, No. 20240000547

Correspondence to: Professor Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2009-03-04 Revised: 2009-04-15

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To construct eukaryotic expression vector of human stromal interaction molecular 1 (STIM1) gene and to observe its expression in human liver cell line (HL-7702).

**METHODS:** Total RNA was extracted from HL-7702 cells and the coding sequence of STIM1 gene was amplified using RT-PCR. After purification, the fragment and eukaryotic expression vector pGM-T plasmid were ligated. The recombinant plasmid was verified by agarose gel electrophoresis and sequencing. Expression of

STIM1 gene and growth of transfected HL-7702 cells were evaluated by electrophoresis and Western blot, respectively.

**RESULTS:** The length of specific fragment amplified by PCR was 342 bp, the recombinant plasmid pGM-T-STIM1 showed two correct bands by digestion using restriction endonuclease *EcoR*, and sequencing results were as expected, suggesting that STIM1 gene had been cloned into pGM-T vector. Results of agarose gel electrophoresis and Western blot revealed that with the transfection, the expression level of STIM1 gene and protein were all elevated in HL-7702 cells.

**CONCLUSION:** The recombinant eukaryotic expression vector pGM-T-STIM1 was successfully constructed and stably expressed in HL-7702 cells. It is meaningful for the research of cytoplasm calcium concentration regulation and secretion function in human liver cells.

**Key Words:** STIM1; Eukaryotic expression vector; HL-7702 cells; Gene expression

Zhang ZY, Zhang ZM, Pan LJ. Construction of human STIM1 eukaryotic expression vector and its expression in HL-7702 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1489-1492

## 摘要

**目的:** 构建人STIM1基因真核表达载体, 并观察其在人肝细胞株(HL-7702)中的表达。

**方法:** 提取HL-7702细胞总RNA, RT-PCR扩增, 经纯化回收后将片段克隆至pGM-T载体, 酶切琼脂糖凝胶电泳分析鉴定并测序, 最后用重组质粒转染HL-7702细胞, 通过PCR-电泳和Western blot法检测STIM1基因的表达。

**结果:** PCR扩增的片段长度为342 bp, 测序结果以及重组质粒pGM-T-STIM1的酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定结果均证明STIM1基因成功克隆到真核表达载体中。PCR-电泳和Western blot实验结果分别显示转染重组质粒后的

## ■背景资料

肝细胞内游离 $Ca^{2+}$ 作为第二信使, 在正常生理条件下, 对维持细胞分裂、增殖、运动、能量代谢、氧化代谢、 $Ca^{2+}$ 依赖性蛋白激酶和磷脂酶激活等方面具有十分重要的作用。钙池操纵的钙通道(SOC)作为肝细胞主要钙离子通道的候选者, 已经发现其存在于肝细胞质膜上, 但迄今为止, 引起SOC通道 $Ca^{2+}$ 内流的胞内信号传导机制尚不清楚。

## ■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

## ■研发前沿

新近研究表明,肝细胞SOC的激活与基质交感蛋白(STIM1)密切相关。尽管STIM1激活SOC的具体机制尚不完全清楚,但其与几种相关蛋白-Orai1, TRPC1对肝细胞SOC的影响是当前该领域的研究热点。

HL-7702细胞在基因与蛋白水平表达STIM1均有所增强。

**结论:**成功构建了人STIM1基因的真核表达载体pGM-T-STIM1,并在人肝细胞株HL-7702中稳定表达,为研究STIM1蛋白在人肝细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度调控方面及其对人肝细胞分泌功能的影响奠定了良好的实验基础。

**关键词:** STIM1; 真核表达载体; 人肝细胞株HL-7702; 基因表达

张振亚, 张宗明, 潘丽洁. 人STIM1基因真核表达载体的构建及其在肝细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1489-1492  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1489.asp>

## 0 引言

钙池操纵的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道(store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, SOC)广泛存在于非兴奋性细胞和部分兴奋细胞膜上,是胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流的主要通道之一,参与多种生理和病理生理过程,对维持细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度稳定具有重要作用,因此受到广泛重视。基质交感蛋白(stromal interaction molecular, STIM)是近年来研究SOC通道的一个热点,其有两种亚型,即STIM1和STIM2,其中STIM1被认为与SOC通道的激活高度相关, Liou *et al*<sup>[1]</sup>及Roos *et al*<sup>[2]</sup>实验充分证明了这一点,他们均发现了利用siRNA技术沉默掉STIM1可以阻断SOC电流;而STIM2与SOC通道的关系目前尚不十分明确,各种实验结果的报道也有所不同。

肝细胞作为非兴奋性细胞的代表,已经发现其质膜上存在SOC<sup>[3-4]</sup>,我们的前期研究也证实了这一点<sup>[5-6]</sup>。为了深入研究STIM1在肝细胞SOC通道的激活过程中扮演的角色,以及他的表达情况在肝脏病理条件下的改变,我们构建了人STIM1重组质粒,并成功在人肝细胞株HL-7702中表达,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人正常肝细胞株HL-7702(中国科学院细胞所); TRIzol、Lipofectamine2000(美国Invitrogen公司); 蛋白酶抑制剂、苯酚AS-MX磷酸盐、快红(美国Sigma公司); RPMI 1640培养液、新生牛血清(天津灏洋生物制品公司); *EcoR* I 内切酶(大连TaKaRa公司); pGM-T克隆试剂盒、cDNA第一链合成试剂盒、PCR Master Mix试剂及质粒提取试剂盒(北京天根生化科技公

司); 兔抗人STIM1抗体(北京西美杰科技有限公司); ALP标记的羊抗兔抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** HL-7702细胞在含200 g/L新生牛血清的RPMI 1640培养液中,于37℃、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养。

**1.2.2 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR):** 参照文献[7]中方法,用酚/氯仿抽提法提取细胞总RNA,按cDNA第一链合成试剂盒操作说明进行反转录:反应体系为总RNA 1  $\mu\text{g}$ 、10 $\times$ RT Mix 2  $\mu\text{L}$ 、dNTP混合液2  $\mu\text{L}$ 、Oligo-dT<sub>15</sub> 2  $\mu\text{L}$ 、Quant Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ , RNase-free水补足至20  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增引物设计为,上游: GTTTGCCT ATATCCAGAACCGTTA,下游: TACCATGAGC TGTGAGATTCTAGC,由上海生工生物工程服务有限公司合成。PCR反应条件为: 94℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 循环30次,最后72℃延伸5 min。

**1.2.3 重组质粒构建、提取与鉴定:** 参照文献[8]的方法,纯化回收目的片段并添A后,与pGM-T载体按照5:1的比例混合,加入连接体系中的其他成分后,置于PCR仪16℃反应过夜。将连接产物转化入感受态细胞中扩增,提取并选择纯化pGM-T-STIM1重组质粒进行测序(由上海英骏生物技术有限公司完成)。采用*EcoR* I 内切酶于37℃水浴中切开已提取的质粒,琼脂糖凝胶电泳检测片段连接情况,电泳过程中设立空质粒作为对照。

**1.2.4 细胞转染与RT-PCR检测:** 参考Lipofectamine2000试剂说明向HL-7702细胞转染重组质粒pGM-T-STIM1,培养24-48 h后重新提取转染后细胞的总RNA,并进行RT-PCR反应,取一定量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,同时设立空质粒转染组与正常细胞组对照以观察转染重组质粒对HL-7702细胞表达STIM1基因的影响。

**1.2.5 Western blot检测:** 用低张蛋白提取液(35 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mmol/L EDTA, 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 g/L蛋白酶抑制剂, pH7.4)解离细胞,离心弃去不溶物,上清液中的蛋白含量用BCA微板法定量,使用牛血清白蛋白(BSA)作为参照物。蛋白样品参照文献[9]中的方法完成SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移至聚偏氟乙烯(PVDF)吸附膜后,分别与兔抗人STIM1抗体(一抗)、ALP标记的羊抗兔抗体(二抗)结合,最后与ALP底物溶

## ■创新盘点

本文旨在通过构建质粒和脂体质体转染的方法,提高人肝细胞系HL-7702中STIM1的表达,并利用RT-PCR和Western blot等方法进行验证。

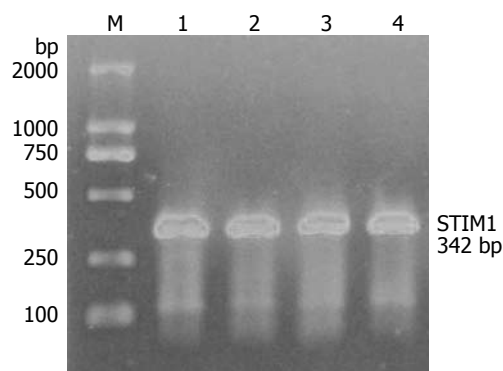


图 1 RT-PCR扩增STIM1电泳结果. M: D2000 Marker; 1-4: RT-PCR扩增STIM1的产物.

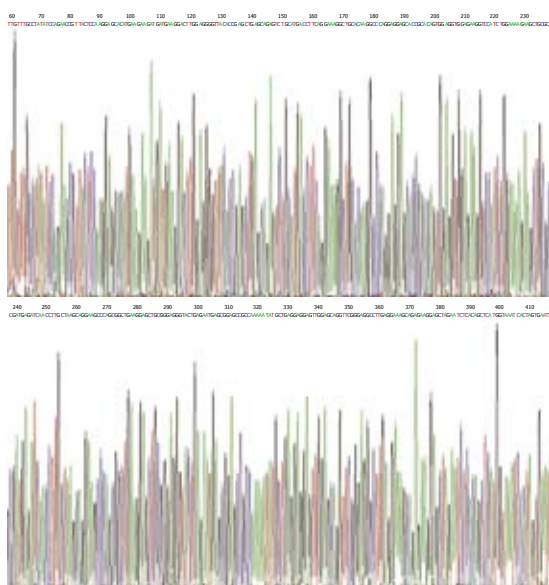


图 2 重组质粒pGM-T-STIM1的测序结果(包含待测序列在内的360个碱基对).

液(10  $\mu$ L Tris-HCl缓冲液(pH9.5、0.1 mol/L)中加入2 mg事先用10  $\mu$ L无水乙醇溶解的萘酚AS-MX磷酸盐和5 mg快红)反应至特异蛋白带清晰显现, 平板扫描摄像. 该实验同样设立转染重组质粒组、转染空质粒组与正常细胞对照组.

## 2 结果

**2.1 RT-PCR扩增STIM1电泳** 应用PCR技术扩增的产物经电泳检测, 特异性条带显示在342 bp左右, 与预期结果相符(图1).

**2.2 重组质粒pGM-T-STIM1的鉴定** 重组质粒的测序结果(图2)显示目的基因片段已经正确插入载体中, 故选用*EcoR* I 限制性内切酶对构建好的质粒进行酶切, 同时设立空质粒作为阴性对照, 结果显示重组质粒pGM-T-STIM1经酶切在342 bp处有条带, 空质粒组未见条带(图3).

**2.3 RT-PCR检测转染细胞的STIM1基因表达** 提

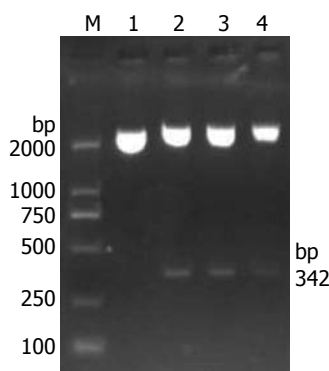


图 3 重组质粒pGM-T-STIM1的酶切鉴定结果. M: D2000 Marker; 1: 空质粒; 2-4: 重组质粒pGM-T-STIM1.

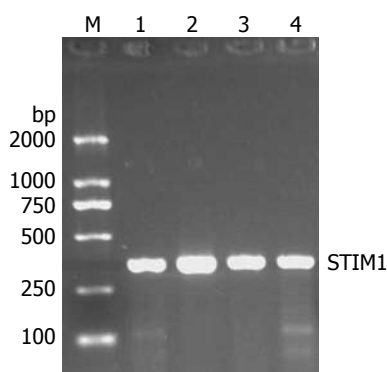


图 4 转染后HL-7702细胞的STIM1基因表达. M: D2000 Marker; 1、3: 正常细胞对照组; 2: 转染重组质粒组; 4: 转染空质粒组.

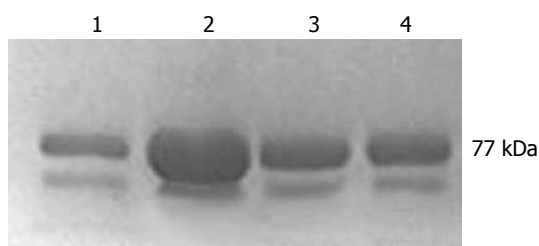


图 5 Western blot检测转染细胞STIM1蛋白表达. 1、3: 正常细胞对照组; 2: 转染重组质粒组; 4: 转染空质粒组.

取转染后HL-7702细胞的总RNA进行RT-PCR反应, 并取一定量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 同时设立转染前细胞组作为对照. 实验结果表明, 质粒转染后的HL-7702细胞STIM1基因表达明显增强(图4), 这说明构建的重组质粒已经将STIM1基因导入HL-7702, 并有稳定表达.

**2.4 Western blot检测转染细胞的STIM1蛋白表达** 分别提取各组细胞的蛋白质, 定量并进行Western blot分析, 结果如图5所示, 转染重组质粒细胞组表达STIM1蛋白明显增强, 而转染空质粒细胞组与正常对照组相差不大, 提示重组质粒转染组细胞STIM1蛋白表达增强确由转染重组质粒引起.

## 3 讨论

肝脏在人体内具有非常重要的作用, 这与肝细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的维持是密不可分的; 当肝细胞

### ■应用要点

本研究通过提高人肝细胞系HL-7702中STIM1的表达, 为进一步深入研究STIM1在激活人肝细胞SOC过程中的作用奠定基础, 并可能为以后通过抑制STIM1来实现预防或治疗某些肝脏疾病等目的提供新的方向和思路.

### ■同行评价

本实验设计合理,方法先进,结果可信,图片质量较好,对探讨Ca<sup>2+</sup>与肝细胞分泌功能的关系有重要理论指导意义。

发生损伤时,胞质中的Ca<sup>2+</sup>浓度会一定程度的升高,在这一过程中, SOC通道似乎又扮演着关键的角色<sup>[10]</sup>。业已了解STIM1是SOC的重要组成部分,而且他的过表达或缺失将显著影响多种细胞的SOC电流。基于STIM1蛋白在细胞内的定位,围绕STIM1如何影响SOC通道的问题目前存在三种假说: (1)STIM1蛋白存在于内质网膜上的和细胞膜上的STIM1形成复合体<sup>[2]</sup>,这种假说首先需要承认细胞膜上存在STIM1,并且他对激活SOC有十分重要的意义。(2)绝大多数或者全部STIM1蛋白在钙池耗竭之前都存在于内质网膜上,钙池耗竭后, STIM1转移靠近并插入到细胞膜中<sup>[11]</sup>。(3)STIM1蛋白只存在于内质网膜上<sup>[1]</sup>。钙池耗竭后, STIM1接近细胞表面却不直接插入细胞膜; STIM1蛋白的C末端与SOC通路的某些组分(或者通路本身)相互作用,从而促进钙离子的内流。此三种假说各有实验支持,但却尚未见有STIM1蛋白在人类正常肝细胞中研究的报道。因此, STIM1蛋白是否存在于人类的肝细胞中? 他在人肝细胞中又是通过何种机制来影响SOC通道的功能? 有待进一步深入研究。

在新近的一些研究中, STIM1基因表达载体已被成功构建并应用于某些领域,如Tamarina *et al*<sup>[12]</sup>通过EYFP-STIM1载体的构建与研究,发现STIM1蛋白在胰岛β细胞中迁移对其分泌具有重要作用。Aromataris *et al*<sup>[13]</sup>研究发现, STIM1蛋白在大鼠肝癌细胞H4-IIE中的位置决定着其胆汁酸的分泌;表明STIM1对于大鼠肝癌细胞的分泌活动也有着举足轻重的作用。本研究成功构建了人STIM1基因的真核表达载体pGM-T-STIM1,并在人肝细胞株HL-7702中稳定表达,为研究人肝细胞中SOC通道的功能特性以及STIM1蛋白在人肝细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度调控方面及其对人肝细胞分泌功能的影响奠定了良好的实验基础。

### 4 参考文献

- 1 Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW,

- 2 Ferrell JE Jr, Meyer T. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 2005; 15: 1235-1241
- 3 Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velichelebi G, Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 2005; 169: 435-445
- 4 Gregory RB, Sykietis D, Barritt GJ. Evidence that store-operated Ca<sup>2+</sup> channels are more effective than intracellular messenger-activated non-selective cation channels in refilling rat hepatocyte intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Cell Calcium* 2003; 34: 241-251
- 5 Rychkov G, Brereton HM, Harland ML, Barritt GJ. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels with a high selectivity for Ca<sup>2+</sup> identified by patch-clamp recording in rat liver cells. *Hepatology* 2001; 33: 938-947
- 6 黄昌州, 张宗明, 裘法祖. 钙池操纵的钙通道抑制剂对大鼠肝细胞钙池操纵的钙通道电流的影响. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 311-312
- 7 黄昌州, 张宗明, 裘法祖. 缺血再灌注损伤对大鼠肝细胞钙池操纵的钙通道电流的影响及药物拮抗. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 739-742
- 8 徐智, 沈苏南, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞. 人CD40 ligand基因真核表达质粒的构建及对人肝癌细胞HepG2的促凋亡作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2413-2419
- 9 Fan CF, Mei XG. A simple, efficient, and economical method for recovering DNA from agarose gel. *Prep Biochem Biotechnol* 2005; 35: 71-78
- 10 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林. 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1679-1683
- 11 张振亚, 张宗明, 潘丽洁, 税朝祥, 王尧尧. 人TRPC1基因真核表达载体的构建及肝细胞表达. *中华实验外科杂志* 印刷中
- 12 Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 2005; 437: 902-905
- 13 Tamarina NA, Kuznetsov A, Philipson LH. Reversible translocation of EYFP-tagged STIM1 is coupled to calcium influx in insulin secreting beta-cells. *Cell Calcium* 2008; 44: 533-544
- 14 Aromataris EC, Castro J, Rychkov GY, Barritt GJ. Store-operated Ca(2+) channels and Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) are targets for the actions of bile acids on liver cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 874-885

编辑 李军亮 电编 何基才

# 端粒酶逆转录酶和P53在大鼠肝癌发生中的动态变化

陈颖, 孔庆忠

陈颖, 河南科技学院生命科技学院 河南省新乡市 453003  
孔庆忠, 山东蓝金生物工程有限公司 山东大学生命科学学院 山东省济南市 250100  
陈颖, 博士, 讲师, 主要从事分子细胞生物学研究。  
作者贡献分布: 此课题由孔庆忠设计, 由陈颖完成; 数据分析及论文写作由陈颖与孔庆忠共同完成。  
通讯作者: 孔庆忠, 教授, 250100, 山东省济南市华阳路69号, 山东蓝金生物工程有限公司。kongcellbrain@msn.com  
电话: 0531-88118011  
收稿日期: 2009-03-11 修回日期: 2009-04-12  
接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

## Dynamic changes of telomerase reverse transcriptase and P53 in the development of rat hepatocellular carcinoma

Ying Chen, Qing-Zhong Kong

Ying Chen, School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxian 453003, Henan Province, China  
Qing-Zhong Kong, Shandong Lanjin Bioengineering Co., Ltd., School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China  
Correspondence to: Professor Qing-Zhong Kong, Shandong Lanjin Bioengineering Co., Ltd., 69 Huayang Road, Jinan 250100, Shandong Province, China. kongcellbrain@msn.com  
Received: 2009-03-11 Revised: 2009-04-12  
Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

### Abstract

**AIM:** To explore the expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) and P53 in the development of rat hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** A HCC model was induced by diethyl nitrosoamine (DENa); telomerase activity was assayed using telomeric repeat amplification protocol (TRAP) method, whereas the expression of TERT and P53 was determined using immunofluorescence and Western blot, respectively.

**RESULTS:** Compared with low expression level of TERT and telomerase activity, which were detected and maintained at a relative stable level in normal tissue and inflammatory lesion, the over-

expression of telomerase and TERT were detected in hepatocirrhosis and HCC stage. However, the expression of P53 was significantly increased in inflammatory stage, and dramatically decreased in hepatocirrhosis stage, even undetectable in HCC stage. When quantified, in inflammation stage, the P53 expression level showed significant difference compared with control group ( $3.53\% \pm 0.17\%$  vs  $2.19\% \pm 0.15\%$ ,  $P = 0.00$ ), whereas in hepatocirrhosis stage, the expression level of P53 was only  $0.98\% \pm 0.05\%$ . Contrary to the trend of P53 expression, the expression of telomerase, and TERT were very low in inflammation stage, which were  $34.47\% \pm 6.21\%$  and  $6.43\% \pm 1.14\%$ , respectively. But in hepatocirrhosis, telomerase activity, and TERT protein expression levels showed significant difference compared with control group and tended to culminate in HCC. Statistically analysis showed that telomerase was correlated with TERT ( $r = 0.954$ ,  $P = 0.046$ ). As for P53, no relationship was found between P53 and telomerase and TERT.

**CONCLUSION:** Accelerated telomerase, and TERT expression with P53 inactivation might synergistically contribute to carcinogenesis and be consistent with the progression of HCC, therefore the three factors may be useful tools in diagnosis and prognosis of HCC.

**Key Words:** Telomerase reverse transcriptase; P53; Telomerase; Hepatocellular carcinoma; Telomeric repeat amplification protocol

Chen Y, Kong QZ. Dynamic changes of telomerase reverse transcriptase and P53 in the development of rat hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1493-1497

### 摘要

**目的:** 研究端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和P53在大鼠肝癌发生过程的动态变化。

**方法:** 二乙基亚硝胺诱导大鼠肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生; 免疫荧光方法检测TERT的表达变化; Western blot

### ■背景资料

目前普遍认为肿瘤的发生与基因组不稳定密切相关, 而与基因组不稳定有关的耐药性的产生又是肿瘤治疗失败的主要原因。在众多可能引起基因组不稳定的相关因素中, 端粒酶起着重要的作用。阐明端粒酶在肿瘤发生中的动态变化及作用不仅对理解肿瘤发生机制具有重要的理论指导意义, 而且在有效防治肿瘤方面还具有广阔的应用前景。

### ■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

## ■研究前沿

端粒酶和P53在肿瘤发生中的作用是肿瘤研究领域的一大热点,探寻二者在肿瘤发生的相互作用对肿瘤的防治都将具有重要的意义。

方法检测P53的表达;TRAP(telomeric repeat amplification protocol)方法检测端粒酶活性。

**结果:**端粒酶与TERT在诱癌过程中呈逐渐升高的趋势,而P53在诱癌早期表达迅速升高后在诱癌后期表达急剧下降。定量分析表明炎症期P53的表达显著高于正常组织( $3.53\% \pm 0.17\%$  vs  $2.19\% \pm 0.15\%$ ,  $P = 0.00$ ),而在肝硬化期P53的表达量仅为 $0.98\% \pm 0.05\%$ ,至肝癌病变中几乎检测不到。与P53的表达变化趋势不同,端粒酶与TERT在炎症期有小幅升高,分别为 $34.47\% \pm 6.21\%$ 和 $6.43\% \pm 1.14\%$ 。肝硬化阶段端粒酶与TERT的表达迅速升高,至肝癌阶段达到高峰。统计学分析显示端粒酶与TERT的表达呈正相关( $r = 0.954$ ,  $P = 0.046$ ),与P53的表达无相关性。

**结论:**诱癌过程中逐渐升高的端粒酶活性和TERT的表达与P53的失活共同促进了肿瘤的发生,且三者均与肝癌的发生发展相一致可作肝癌诊治的指标。

**关键词:**端粒酶逆转录酶; P53; 端粒酶; 肝细胞癌; 端粒重复序列扩增法

陈颖, 孔庆忠. 端粒酶逆转录酶和P53在大鼠肝癌发生中的动态变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1493-1497  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1493.asp>

## 0 引言

癌细胞通过端粒酶活性的升高来维持端粒长度的相对稳定,借此为其生长提供选择优势。大量的研究证实肿瘤细胞中端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)的过表达可引起细胞的永生化<sup>[1-2]</sup>。因而TERT通常被作为调控端粒酶活性的限速步骤而参与肿瘤的发生。P53是一种肿瘤抑制蛋白,在监测DNA损伤或基因组异常的过程中起关键作用。其激活可以导致细胞周期阻滞, DNA修复或细胞凋亡,同时P53还是TERT的负调控子<sup>[3-5]</sup>。为验证TERT与P53在肿瘤发生中的作用,本研究对二者在肝细胞癌发生过程中的动态表达变化进行了初步探索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ SD大鼠,月龄3 mo,平均体质量为 $120 \pm 5$  g,购于河南郑州大学实验动物中心,在温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ,湿度40%-70%,间隔12 h光照的条件下饲养。二乙基亚硝胺、PI购于Sigma公司;TERT、p53、actin抗体及化学发光试剂盒购于Santa Cruz; FITC-IgM、碱磷酶-IgM购于北京

中杉金桥。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组及取材:**大鼠适应环境1 wk后,随机分为对照组( $n = 42$ )和造模组( $n = 42$ )。根据Solt-Farber方法,以2 g/L的二乙基亚硝胺(diethyl nitrosoamine, DENA)制备肝癌模型,15 wk后停药。根据大鼠肝癌的诊断标准由两位病理医生进行病理分型<sup>[6]</sup>。造模组的病变可大致分为3阶段:炎症期(12 wk之前)、肝硬化期(15 wk)和肝癌期(18-21 wk)。分别在给药后3、6、9、12、15、18、21 wk随机处死对照组及造模组中的6只大鼠。取少量新鲜肝组织置于40 g/L的多聚甲醛,4℃固定过夜后行石蜡包埋和HE染色。其余组织迅速放入液氮中冷冻,随后置-80℃保存。

**1.2.2 免疫荧光方法检测TERT蛋白表达:**组织切片置柠檬酸抗原修复液修复,200 g/L山羊血清封闭后,加抗TERT抗体(sc-7212, Santa Cruz)(1:600)4℃孵育过夜。FITC标记的二抗(ZF-0311, 北京中杉)(1:400)25℃孵育40 min,20 mg/L PI(Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO)室温标记细胞核后封片,激光共聚焦显微镜检测并对TERT蛋白的表达强度进行相对荧光强度分析<sup>[7-8]</sup>。相对荧光强度 = 荧光强度 × 面积/细胞总数。每组实验重复3次。

**1.2.3 P53蛋白表达的检测:**细胞总蛋白75 μg在60 g/L SDS-PAGE中恒压电泳后转移至硝酸纤维素膜上并用50 g/L的脱脂奶粉封闭。加入P53(sc-6243)(1:50)和actin(sc-1616)(1:1000)一抗4℃孵育过夜。ECL(sc-2048)化学发光检测试剂盒进行显色。Labworks 4.0软件(UVP, Inc. USA)定量分析表达强度。Actin作为内对照。每组实验重复3次。

**1.2.4 端粒酶活性的检测:**用Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA试剂盒以端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)方法检测端粒酶活性。操作步骤按说明书。端粒酶相对活性 = (样本 $A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ /阳性对照 $A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ ) × 100。每组实验重复3次。

**统计学处理** 实验数据均用mean ± SD表示,SPSS11.0软件对实验数据进行方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 有显著性差异, $P < 0.01$ 有极显著差异。

## 2 结果

**2.1 肝癌发生过程中TERT蛋白表达的动态变化** 免疫荧光结果显示TERT在整个诱癌时期的表

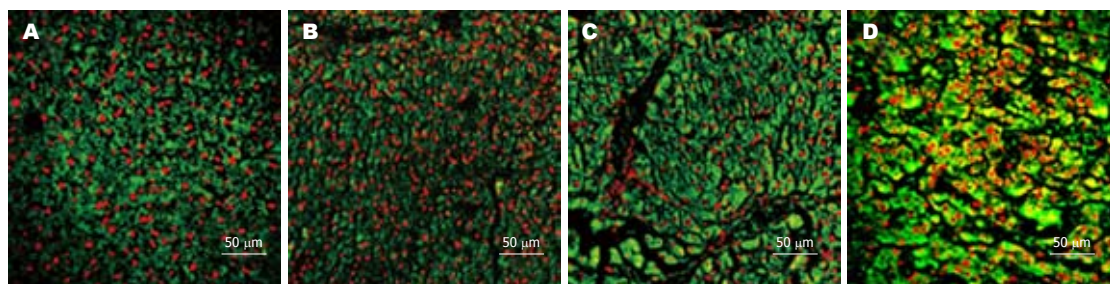


图1 大鼠肝癌诱导过程中TERT的表达(免疫荧光). A: 对照组; B: 炎症期; C: 肝硬化期; D: 肝癌期.

达呈逐渐升高的趋势(图1). 对照组有少量TERT表达. 造模组在炎症期即表达升高, 在随后的肝硬化及肝癌期表达量激增. 定量分析显示炎症期TERT蛋白表达强度为 $6.43 \pm 1.14$ , 与对照组( $4.48 \pm 0.09$ )相比未有显著性差异. 而至肝硬变和肝癌期其表达量分别为 $13.47 \pm 0.66$ 和 $18.36 \pm 4.36$ , 是对照组的3.00-4.10倍, 有极显著性差异( $P = 0.000$ , 图2A).

**2.2 端粒酶活性的变化** 对照组端粒酶活性较低为 $22.90\% \pm 2.33\%$ . 造模组的炎症期端粒酶活性为 $34.47\% \pm 6.21\%$  ( $P = 0.007$ ). 随着病变的进展, 端粒酶相对活性在肝硬化期急增至 $62.90\% \pm 2.65\%$  ( $P = 0.000$ ), 并在其后的癌症发生过程中持续保持这一高水平( $64.27\% \pm 3.30\%$ ) ( $P = 0.000$ , 图2B).

**2.3 P53蛋白表达的变化** Western blot检测结果显P53在肝癌发生过程中呈先上升后下降的趋势(图3). 对照组有少量表达的P53. 造模组在炎症早期P53表达骤增, 随后在炎症后期和肝硬化期表达量将至正常以下. 至肝癌阶段几乎检测不出. 定量分析表明正常组织P53的表达量为 $2.19\% \pm 0.15\%$ . 而在炎症期为 $3.53\% \pm 0.17\%$ , 是正常表达量的1.61倍, 有显著性差异( $P = 0.00$ ). 随诱癌时间的延长, 肝硬化期P53的表达量进一步减少至 $0.98\% \pm 0.05\%$ , 是正常组织的0.45倍. 而在肝癌期几乎检测不到P53的表达(图2C).

**2.4 TERT、端粒酶及P53之间的相关性** 统计学分析显示TERT与端粒酶呈正相关( $r = 0.954$ ,  $P = 0.046$ ), 而二者与P53均无相关性.

### 3 讨论

肿瘤的发生是一多因素相互作用的极其复杂的过程. 端粒酶在肿瘤发生中具有双重作用, 其不仅可促进肿瘤的发生, 还可作为肿瘤抑制子抑制肿瘤的发生. 正常体细胞中端粒酶活性受到严格的调控, 而80%以上的肿瘤细胞中端粒酶活性显著升高, 且研究发现其催化亚基TERT的过

### ■创新盘点

本研究首次运用大鼠肝癌模型对端粒酶逆转录酶、端粒酶及P53的表达变化进行了研究, 并对三者的相关性进行了初步探索.

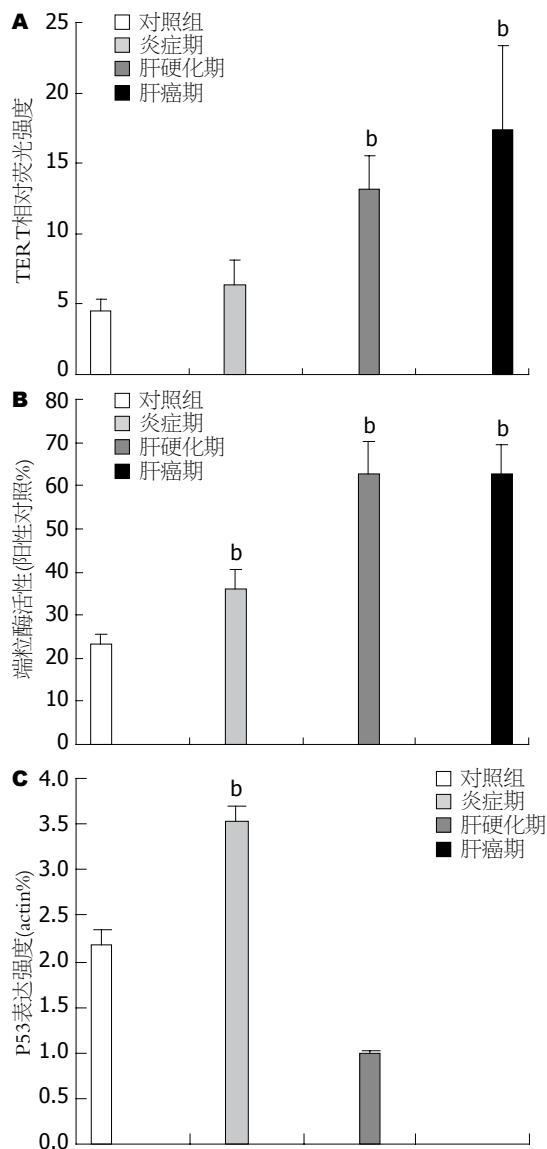


图2 TERT、端粒酶及P53在大鼠肝癌发生中的变化. A: TERT; B: 端粒酶; C: P53. \* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

表达可引起细胞的永生化<sup>[9]</sup>. P53是一种肿瘤抑制因子, 正常细胞端粒长度的程序性缩短及由此产生的端粒功能丧失可激活依赖P53的信号通路, 同时P53又可抑制端粒酶活性<sup>[5,10]</sup>. 故本研究对TERT和P53蛋白在肝细胞肝癌发生的动态变

### ■应用要点

本研究初步揭示端粒酶逆转录酶、端粒酶及P53在肝癌发生过程中的动态变化及相关性。这为下一步以三者为靶点的分子治疗奠定了基础,并对肝癌的诊断、治疗及预后有着积极指导作用。

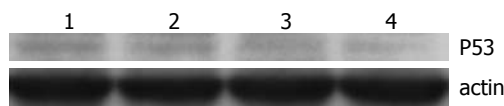


图3 大鼠肝癌诱导过程中P53的表达。1: 正常; 2: 炎症期; 3: 肝硬化期; 4: 肝癌期。

化进行了初步探索。

研究结果表明,端粒酶活性随肝癌的发生、发展逐步升高。正常肝组织和炎症期组织中端粒酶活性较低,至肝硬化和肝癌期端粒酶活性急剧升高。癌变过程中TERT蛋白的表达变化与端粒酶活性升高的趋势基本一致,并呈正相关( $r = 0.954$ ,  $P = 0.046$ )。提示TERT可调节端粒酶活性且肿瘤细胞中端粒酶活性越高,细胞的恶性程度也越高<sup>[11-13]</sup>。由于端粒酶的低水平表达不仅可延长肝细胞的寿命,还可增强其对DNA损伤的耐受性及抑制细胞凋亡,推测在对照组及造模组炎症期中TERT和端粒酶的这种表达方式对维持肝脏的正常功能起着积极的作用<sup>[14]</sup>。随着诱癌的过程,端粒酶及其组分的高水平表达促进病变由炎症期向肝硬化阶段的演进,并最终引起细胞不受调控的生长及癌症的发生。肝硬化阶段端粒酶和TERT的表达激增提示二者的表达变化是诱癌早期事件,因而可将异常表达的TERT和端粒酶活性作为肿瘤诊治的早期指标,选择性抑制端粒酶和TERT的过表达极有可能成为肿瘤治疗的又一可行方法<sup>[15-16]</sup>。

肿瘤抑制因子P53在保护基因组的稳定性方面起着重要的作用,约60%的肿瘤细胞中可检测到P53的失活。本研究发现正常肝细胞P53的表达量较低,炎症期P53表达升高。而肝硬化期P53的表达量却急剧下降,至肝癌期几乎检测不到。炎症期P53的表达上调可保护细胞避免死亡并可有效剔除端粒酶受损细胞,借此维持正常肝细胞的数量和功能<sup>[17-19]</sup>。在肝硬化及肝癌期P53的表达失活不仅使其丧失了抑制肿瘤发生的功能,同时还可激活某些原癌基因,从而共同促进肿瘤的发生,如P53的缺失可转录激活c-Myc和TERT<sup>[20-22]</sup>。

P53对端粒酶的调控可分为两类:(1)通过对端粒酶全酶的亚细胞定位的直接调控;(2)通过细胞周期的间接调控。由于P53是TERT表达的负调控子,因而P53对端粒酶活性的直接调控是通过P53与TERT启动子结合后抑制TERT的表达实现的。研究表明P53在其表达升高后的数小时内就可抑制TERT的表达,而且这种对TERT的抑

制作用不依赖于细胞周期的阻滞和凋亡。因端粒酶活性随细胞周期的变化而变化,其在G<sub>1</sub>/S期逐渐增加,S期达到高峰,G<sub>2</sub>/M期几乎不表达<sup>[23]</sup>,所以P53又可通过调节Cyclin D1和Cyclin E的表达间接调控端粒酶的活性<sup>[24]</sup>。考虑到端粒酶和TERT在整个诱癌时期的变化,P53可能对二者的调控可能是一非常复杂的过程。本研究发现炎症期P53表达的升高不仅没有表现出TERT及端粒酶的活性的显著降低,相反,TERT及端粒酶活性较对照组的表达还略有上升。由于TERT的少量增加可对抗P53引起的凋亡,提示P53对TERT的抑制可能需要在一定的阈值范围内实现,并且在P53升高的遗传背景下TERT的表达升高可能起到延缓细胞衰老和延长细胞寿命的作用<sup>[5,25]</sup>。至肝硬化及肝癌时,P53的缺失使其失去了对端粒酶及TERT表达的抑制作用,因而促进了二者活性的激增,最终导致细胞向癌变方向发展。尽管我们的研究结果显示P53与端粒酶和TERT在肿瘤发生中不存在相关性,但三者在诱癌过程中的表达变化提示P53的失活可能是肿瘤发生过程中端粒酶活性升高和TERT过表达所必需的。随着端粒持续丢失、基因组不稳定性增加,在P53缺失的细胞中端粒酶活性的增加有助于恢复细胞端粒的功能,并为细胞提供选择生长优势。

总之,P53与TERT和端粒酶之间不仅是负调控的关系,很可能是一种相互拮抗的动态变化过程。而这种复杂的相互关系反映了一种动态平衡在癌症发生中的双重作用。这种平衡的维持对细胞是一种保护作用,一旦被打破,就可能促使细胞向癌变的方向发展。同时提示三者可作为肿瘤诊治的候选指标。

### 4 参考文献

- 1 Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998; 8: 279-282
- 2 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352
- 3 Kan Q, Jinno S, Yamamoto H, Okayama H. Chemical DNA damage activates p21 WAF1/CIP1-dependent intra-S checkpoint. *FEBS Lett* 2007; 581: 5879-5884
- 4 Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 1996; 31:

- 295-301
- 5 Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, Inoue M. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1239-1247
- 6 Squire RA, Levitt MH. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res* 1975; 35: 3214-3223
- 7 Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P. Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 69-77
- 8 Lau WK, Yeung CW, Lui PW, Cheung LH, Poon NT, Yung KK. Different trends in modulation of NMDAR1 and NMDAR2B gene expression in cultured cortical and hippocampal neurons after lead exposure. *Brain Res* 2002; 932: 10-24
- 9 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-791
- 10 Lee CM, Hsu CY, Eng HL, Huang WS, Lu SN, Changchien CS, Chen CL, Cho CL. Telomerase activity and telomerase catalytic subunit in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 796-800
- 11 Oh BK, Kim H, Park YN, Yoo JE, Choi J, Kim KS, Lee JJ, Park C. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Lab Invest* 2008; 88: 144-152
- 12 Henderson YC, Breau RL, Liu TJ, Clayman GL. Telomerase activity in head and neck tumors after introduction of wild-type p53, p21, p16, and E2F-1 genes by means of recombinant adenovirus. *Head Neck* 2000; 22: 347-354
- 13 Shimojima M, Komine F, Hisatomi H, Shimizu T, Moriyama M, Arakawa Y. Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2004; 29: 31-38
- 14 Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003; 114: 241-253
- 15 Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008; 99: 1528-1538
- 16 Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomeres and telomerase : current status. *BioDrugs* 2007; 21: 375-385
- 17 Anderson CW. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 433-437
- 18 Garner E, Raj K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle* 2008; 7: 277-282
- 19 García-Cao I, García-Cao M, Tomás-Loba A, Martín-Caballero J, Flores JM, Klatt P, Blasco MA, Serrano M. Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep* 2006; 7: 546-552
- 20 Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60: 6788-6793
- 21 Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3735-3743
- 22 Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG, Pisa P. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19: 5123-5133
- 23 Zhu X, Kumar R, Mandal M, Sharma N, Sharma HW, Dhingra U, Sokoloski JA, Hsiao R, Narayanan R. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6091-6095
- 24 Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 549-554
- 25 Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, Viña J, Serrano M, Blasco MA. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 2008; 135: 609-622

#### ■同行评价

本研究设计较为合理, 研究内容比较新颖, 实验方法比较科学, 对肿瘤发病机制的研究有一定的意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

# HSV-TK+GFP/GCV自杀基因系统对小鼠胰腺癌的治疗作用

刘为青, 杨军, 董坚

## ■背景资料

作为现代医学和生物学一个新的研究领域, 肿瘤的自杀基因治疗尤其引人瞩目。人们已经利用TK基因进行了多种肿瘤的基因治疗研究, 并取得了较好的效果。

刘为青, 董坚, 昆明医学院第一附属医院生物治疗科 云南省昆明市 650032

杨军, 昆明医学院第一附属医院肿瘤治疗中心 云南省昆明市 650032

刘为青, 主要从事肿瘤生物治疗的研究。

作者贡献分布: 刘为青、杨军及董坚对此文所作贡献均等; 此课题由董坚设计; 研究过程由刘为青与杨军操作完成; 数据分析由刘为青、杨军及董坚完成; 本论文写作由刘为青、杨军及董坚共同完成。

通讯作者: 董坚, 教授, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院生物治疗科。dongjian18@yahoo.com

电话: 0871-5361621 传真: 0871-5361621

收稿日期: 2009-01-28 修回日期: 2009-03-14

接受日期: 2009-03-16 在线出版日期: 2009-05-28

## Effects of HSV-TK+GFP/GCV suicide gene therapy system on mouse pancreatic cancer cells

Wei-Qing Liu, Jun Yang, Jian Dong

Wei-Qing Liu, Jian Dong, Center of Biotherapy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Jun Yang, Center of Cancer, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Professor Jian Dong, Center of Biotherapy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. dongjian18@yahoo.com

Received: 2009-01-28 Revised: 2009-03-14

Accepted: 2009-03-16 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To study *in vitro* therapeutic effect on mouse pancreatic cancer, as well as the bystander effect with HSV-TK suicide gene in combination with prodrug GCV.

**METHODS:** HSV-TK and GFP were inserted into pcDNA3.1 (+) to construct pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP, and pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP was transferred into mouse pancreatic cancer cell MPC by Lipofectin. We then added GCV to these gene-modified cells and studied the sensitivity of the cells to GCV as well as the bystander effect.

**RESULTS:** The gene modified pancreatic cancer cells MPC/HSV-TK+GFP were

successfully developed. *In vitro* experiments showed that when the MPC/HSV-TK+GFP cells accounted for 10% of hybrid cells, the low concentration (20 mg/L) of GCV was about 50% of tumor cell killing. *In vivo* results showed that the low concentration of GCV killed the cells. And tumor growth of the mouse model was inhibited.

**CONCLUSION:** Our data demonstrate MPC/HSV-TK+GFP cells are sensitive to the treatment of GCV compared with unmodified tumor cells, and remarkable bystander effect is seen.

**Key Words:** Suicide gene therapy system; Bystander effect; Pancreatic cancer; Mouse

Liu WQ, Yang J, Dong J. Effects of HSV-TK+GFP/GCV suicide gene therapy system on mouse pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1498-1503

## 摘要

**目的:** 探讨HSV-TK+GFP/GCV自杀基因系统对小鼠胰腺癌细胞系MPC体外及体内杀伤作用及其产生的旁观者效应。

**方法:** 通过RT-PCR从基因组文库中扩增出HSV-TK基因全长CDS序列, 并将其与GFP基因定向克隆到质粒表达载体pcDNA3.1(+), 构建重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP。脂质体法将重组质粒转染小鼠胰腺癌细胞株MPC细胞, 得到带有HSV-TK和GFP基因的MPC/HSV-TK+GFP细胞, 并将其分别用于体外和体内实验。

**结果:** 重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP导入小鼠胰腺癌细胞株MPC细胞。体外实验结果显示, 当MPC/HSV-TK+GFP细胞数占混合细胞10%时, 低浓度(20 mg/L)的GCV就可将50%左右的肿瘤细胞杀死。体内实验结果显示GCV可明显抑制MPC/HSV-TK+GFP细胞在昆明小鼠体内的肿瘤形成。

**结论:** HSV-TK和GFP基因转入小鼠胰腺癌细胞株MPC细胞并获得稳定表达, HSV-TK+GFP/GCV自杀基因系统在体内外对小鼠胰腺癌均

## ■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

有杀伤作用, 且存在明显的旁观者效应。

**关键词:** 自杀基因治疗系统; 旁观者效应; 胰腺癌; 小鼠

刘为青, 杨军, 董坚. HSV-TK+GFP/GCV自杀基因系统对小鼠胰腺癌的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1498-1503  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1498.asp>

## 0 引言

胰腺癌是一种临床表现隐匿, 发病迅速且预后不良的消化系统恶性肿瘤。由于其早期症状不典型, 容易被忽略或被误认为胃肠道疾患, 不易早期发现。待肿瘤侵及或压迫胆道出现黄疸、或侵及周围组织出现疼痛症状而诊断明确时, 肿瘤往往已生长很大, 多已为疾病晚期。对胰腺癌进行深入的防治研究, 提高早诊率, 加强综合治疗, 是提高胰腺癌治疗水平的重要途径。

随着分子生物学及相关学科的进展, 肿瘤的基因疗法备受关注, 其中自杀基因疗法显示了较好的应用前景<sup>[1-2]</sup>。自杀基因又称为前药转换酶基因<sup>[3-4]</sup>, 将一些病毒或细菌基因组中的前药转换酶基因导入肿瘤细胞并表达TK, 将GCV磷酸化为二磷酸产物GCV-DP, 然后在哺乳动物细胞内激酶作用下形成三磷酸产物GCV-TP, GCV-TP具有强烈细胞毒性, 抑制DNA聚合酶, 掺入DNA合成链中, 导致链中止、染色体变性和姐妹染色单体交换, 最终导致细胞死亡<sup>[5-6]</sup>, 从而达到杀死肿瘤细胞的目的。这种独特的自杀效应能选择性的杀死肿瘤细胞, 保护正常组织细胞, 从而避免传统肿瘤治疗方法对人体带来的伤害。此外, 研究还表明, 转导了自杀基因的肿瘤细胞在给予药物前体后被杀死, 其相邻或更远的未被转染的肿瘤细胞也可被杀死, 这种作用被称为旁观者效应<sup>[7]</sup>。旁观者效应明显扩大了自杀基因的对细胞杀伤范围, 显示了其对于肿瘤治疗的独特优势, 并大大克服了自杀基因转染率的限制<sup>[8-9]</sup>。

目前已发现和克隆的自杀基因有多种, 在肿瘤治疗中以HSV-TK最为常用。用于HSV-TK基因疗法的前药有两类, 一是嘌呤核苷类似物, 包括ACV及其衍生物GCV、潘洛昔非(PCV)、布洛昔非(BCV), 其中GCV对转基因瘤细胞的抑制作用比ACV强10倍, 故成为目前肿瘤TK基因治疗中最常用的前药。

前期研究表明, HSV-TK/GCV系统具有极大的抗癌效应<sup>[10]</sup>。因此, 本实验中我们构建了含有

HSV-TK及绿色荧光蛋白GFP作为筛选标记的重组质粒, 将重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP体外转染小鼠胰腺癌细胞株MPC细胞, 利用TK基因进行小鼠胰腺癌的治疗研究。本研究检测HSV-TK+GFP/GCV系统对小鼠胰腺癌细胞的体外和体内杀伤性及其旁观者效应, 以期为临床治疗胰腺癌提供可用的理论基础及实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 质粒pcDNA3.1(+)购自Invitrogen公司, MPC小鼠胰腺癌细胞株为本室自行建株保存。RPMI 1640培养基和脂质体(Lipofectmine2000)为Gibco公司产品, 新生小牛血清为杭州四季青公司产品, MTT和GCV为Sigma公司产品, G418为Promega公司产品。小鼠抗TK单抗购自Novus公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自Invitrogen公司。昆明小鼠, ♀, 4-6 wk龄, 体重16-25 g左右, 购自昆明医学院实验动物中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP的构建:** 通过RT-PCR从基因组文库中扩增出HSV-TK基因以及GFP基因全长CDS序列, 并将二者定向插入真核表达载体pcDNA3.1(+), 构建重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP。

**1.2.2 重组质粒转染MPC小鼠胰腺癌细胞及表达产物的检测:** 接种 $5 \times 10^4$ 生长状态良好的MPC小鼠胰腺癌细胞于24孔板的各孔, 采用Lipofectmine2000转染试剂将重组质粒转染MPC小鼠胰腺癌细胞, 转染后48 h, 用含800 mg/L G418的培养液筛选细胞2 wk, 荧光显微镜检测GFP蛋白的表达以证实重组质粒已成功转染MPC小鼠胰腺癌细胞。将获得稳定表达GFP的细胞株接着采用96孔板有限稀释法进行单克隆细胞的筛选, 获得表达GFP的单克隆细胞株, 选取其中GFP表达量最高的单克隆细胞株作为实验细胞株, 并将其命名为MPC/HSV-TK+GFP。此外, 转染空载体pcDNA3.1(+)至MPC细胞以作为后续试验对照。将MPC/HSV-TK+GFP细胞于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱常规培养、传代以及冻存, 收集培养细胞裂解后取上清用于Western blot检测, 12 000 r/min离心15 min后取上清, SDS-PAGE分离后半干法转至硝酸纤维素滤膜, 50 g/L脱脂奶粉37℃封闭1 h, 加入小鼠抗TK单抗(一抗), 37℃孵育过夜, 再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(二抗)孵育1 h, ECL法显色后摄影。

## ■ 研发前沿

将HSV-TK+GFP/GCV自杀基因治疗系统联合化疗以及协同其他细胞因子进行基因治疗以提高疗效, 同时, 通过调整细胞生理, 诱导肿瘤细胞凋亡, 加强肿瘤与肿瘤细胞、肿瘤细胞与正常细胞之间的GJIC功能是当前肿瘤的自杀基因治疗领域中的研究热点。

# ■创新盘点

本研究选用了小鼠胰腺癌细胞株MPC作为肿瘤细胞构建MPC/HSV-TK+GFP细胞,同时,将GFP作为筛选标记与HSV-TK基因一同转导进入MPC细胞中,通过显微镜下观察可以清楚地显示出旁观者效应。

1.2.3 荧光显微镜下观察体外培养细胞对GCV药物作用:将MPC/HSV-TK+GFP细胞按 $5 \times 10^4$ 细胞/孔接种于24孔培养板,24 h后,加入合适浓度的GCV,并对MPC/HSV-TK+GFP细胞设置对照加入PBS溶液,使用荧光显微镜观察细胞的形态及生长情况。

1.2.4 体外细胞的旁观者效应观察:将MPC和MPC/HSV-TK+GFP细胞按常规方法制成 $3 \times 10^8$ /L的细胞悬液,将MPC和MPC/HSV-TK+GFP按以下比例接种96孔板:0, 1:20, 1:10, 1:5。接种后完全培养基每孔补足200  $\mu$ L,每个比列设12个复孔,于37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内静置培养,培养48 h后将每一比例中前3孔更换含GCV 5 mg/L的RPMI 1640培养液,另外3孔更换含GCV 20 mg/L的RPMI 1640培养液,另外3孔更换含GCV 50 mg/L的RPMI 1640培养液,余3孔更换普通培养液,培养4 d后,采用MTT法计算细胞存活率(%)。

1.2.5 体内实验: (1)小鼠胰腺癌模型的建立:昆明小鼠24只,分为3组,每组8只。常规培养MPC和MPC/HSV-TK+GFP细胞,第1组小鼠皮下接种转染空质粒载体的MPC肿瘤细胞;第2组以及第3组小鼠皮下接种MPC/HSV-TK+GFP肿瘤细胞。分别在各试验组小鼠左侧腋窝皮下接种 $1 \times 10^6$ 个相应的细胞,对侧腋窝接种 $1 \times 10^6$ 个MPC细胞。(2)GCV对MPC/HSV-TK+GFP细胞在小鼠体内成瘤的影响:第1组小鼠在肿瘤接种次日,开始给予GCV(100 mg/kg)腹腔(ip)内注射治疗,注射体积每只0.2 mL,每日1次,连续注射24 d;第2组小鼠在接种肿瘤细胞后次日,给予PBS腹腔(ip)内注射治疗,注射体积每只0.2 mL,每天1次,连续注射24 d;第3组小鼠在接种肿瘤细胞后次日,给予GCV(100 mg/kg)腹腔(ip)内注射治疗,注射体积每只0.2 mL,每日1次,连续注射24 d。观察各组肿瘤形成情况。

**统计学处理** 数据用mean $\pm$ SD表示,各组数据比较用SPSS10.0软件进行完全随机的方差分析,分析其显著性。

## 2 结果

2.1 重组质粒转染小鼠胰腺癌细胞MPC 荧光显微镜下观察到实验组小鼠胰腺癌细胞内有绿色荧光信号,实验组荧光强度强,而两对照组细胞内未检测到荧光信号,实验组细胞内荧光显像表明重组质粒MPC/HSV-TK+GFP已经成功转染小鼠胰腺癌细胞MPC(图1)。

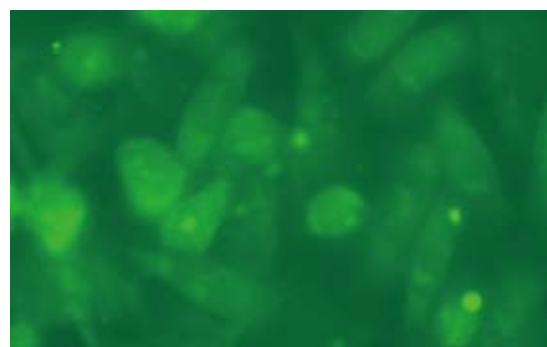


图1 荧光显微镜下观察重组质粒转染小鼠胰腺癌细胞MPC( $\times 200$ )。

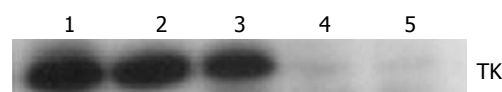


图2 Western blot检测TK基因的表达。

2.2 TK基因的表达 Western blot结果显示MPC/HSV-TK+GFP细胞中TK蛋白表达阳性(图2)。

2.3 体外细胞的旁观者效应观察 体外培养细胞置于倒置荧光显微镜下观察可见,当加入GCV后,转导了MPC/HSV-TK+GFP的肿瘤细胞在给予药物前体后被杀死,随着时间的推移,其相邻的未转染肿瘤细胞也可被杀死(图3)。

2.4 体外细胞的旁观者效应观察结果 将MPC/HSV-TK+GFP细胞和MPC细胞以不同的比例混合,加入不同浓度的GCV后观察细胞生存率的变化(图4)。当加入GCV浓度为5 mg/L,且MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞总数的0%、5%、10%和20%时,细胞生存率分别为96%、98%、86%和74%,其中, MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞的20%时有36%的细胞被杀灭;当加入GCV浓度为20 mg/L,且MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞总数的0%、5%、10%和20%时,细胞生存率分别为96%、92%、52%和6%,其中, MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞的10%以及20%时分别有48%及94%的细胞被杀灭;当加入GCV浓度为50 mg/L时, MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞总数的0%、5%、10%和20%时,细胞生存率分别为95%、93%、54%和7%,其中, MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞的10%和20%时分别有46%及93%的细胞被杀灭。显然,当GCV浓度增加时,被杀灭的肿瘤细胞数量逐渐增加,当GCV的浓度上升到50 mg/L时,其杀伤效果与浓度为20 mg/L GCV的杀伤效果相近;而随着MPC/HSV-TK+GFP细胞占混合细胞比例的增大,被杀灭的肿瘤细胞数量逐渐增加,这些都

**■应用要点**  
在当前体内转导基因方法不可能达到使肿瘤细胞全部转导目的基因的情况下, 自杀基因的旁观者效应无疑是一条重要的补充途径, 克服了转染率相对低下的限制问题, 明显扩大了自杀基因对肿瘤细胞的杀伤作用, 对恶性肿瘤的治疗有着十分重要意义。

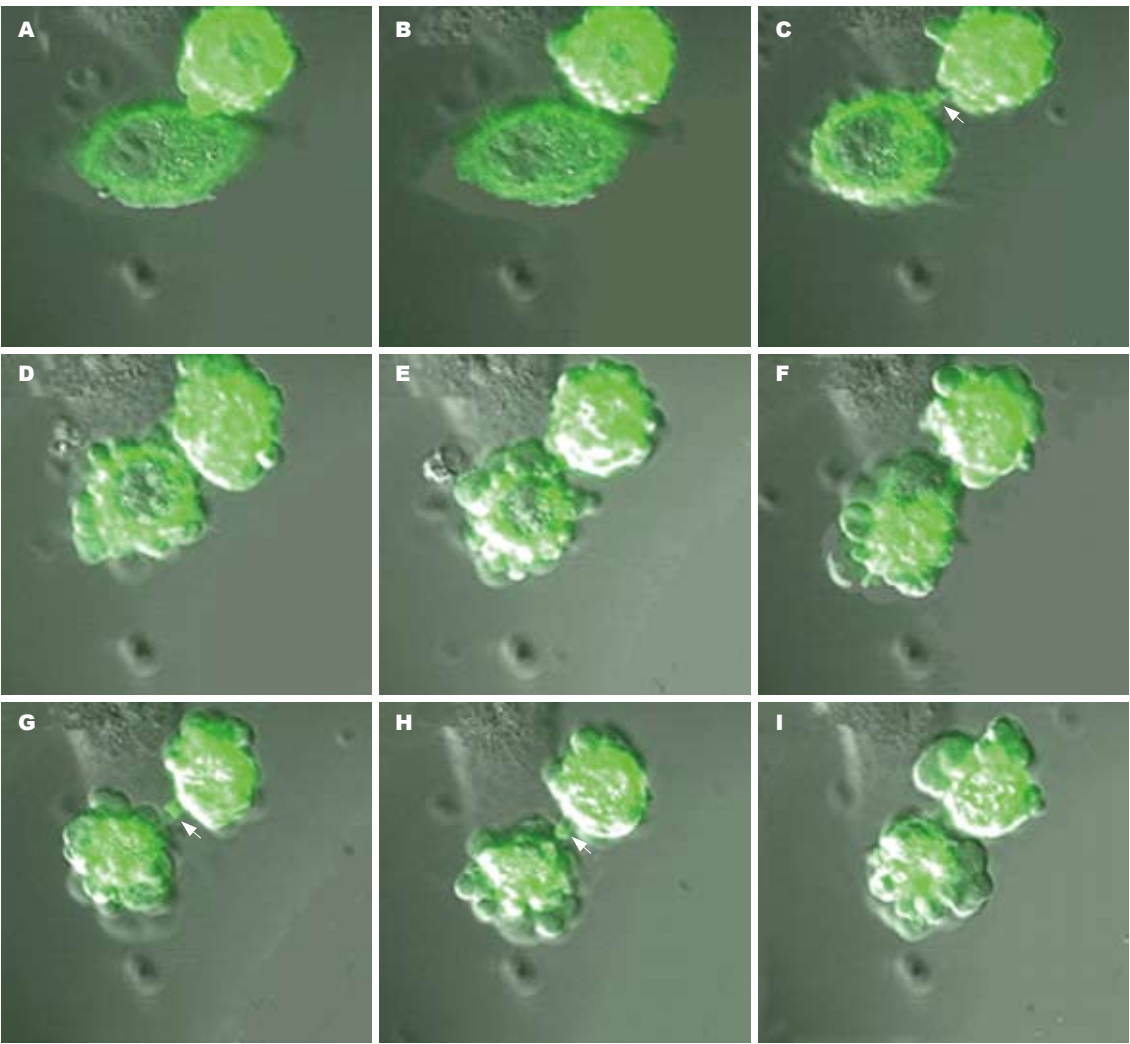


图 3 加入GCV药物后旁观者效应观察(×400). A: 0.000 s; B: 186.295 s; C: 372.591 s; D: 558.886 s; E: 745.181 s; F: 931.476 s; G: 17.772 s; H: 1304.067 s; I: 1490.362 s.

反映出旁观者效应能增强对肿瘤的杀伤作用。  
2.5 GCV对MPC/HSV-TK+GFP细胞在小鼠体内成瘤的观察结果 第1组小鼠给予GCV(100 mg/kg)腹膜腔(ip)内注射治疗, 连续注射24 d后观察, 每只小鼠左右腋窝肿瘤均增大, 且两侧肿瘤体积无明显差异; 第2组小鼠给予PBS腹膜腔(ip)内注射治疗, 连续注射24 d后, 每只小鼠左右腋窝肿瘤均增大, 且两侧肿瘤体积无明显差异; 第3组小鼠给予GCV(100 mg/kg)腹膜腔(ip)内注射治疗, 连续注射24 d后, 接种了MPC/HSV-TK+GFP细胞的左侧腋窝肿瘤体积、质量较右侧腋窝肿瘤明显为小, 并有显著差异(图5, 表1)。

3 讨论

胰腺癌是我国常见的主要恶性肿瘤之一, 具有恶性程度高, 转移早等特点, 是当前消化系统肿瘤治疗中效果较差的肿瘤之一。传统的治疗手段对于提高胰腺癌患者的生存率以及提高患者

表 1 各组小鼠离体肿瘤质量、体积 (n = 8, mean ± SD)		
分组	肿瘤质量(g)	肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )
第1组	7.93 ± 0.31	6.87 ± 0.40
第2组	7.73 ± 0.55	6.56 ± 0.34
第3组	2.19 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.34 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>c</sup>P<0.05 vs 第1、2组。

的生存质量方面无明显的改善。因此, 探索一种新型的胰腺癌基因治疗手段是当前胰腺癌研究中的热点。作为现代医学和生物学一个新的研究领域, 肿瘤的自杀基因治疗尤其引人注目。人们已经利用TK基因进行了多种肿瘤的基因治疗研究, 并取得了较好的效果<sup>[11-15]</sup>。当前国内外尚未见有关于HSV-TK/GCV自杀基因系统用于小鼠胰腺癌的研究, 因此, 我们选取我单位自行构建的小鼠胰腺癌细胞株MPC细胞进行HSV-TK/

# ■名词解释

自杀基因：又称前药转换酶基因，将一些病毒或细菌基因组中的前药转换酶基因导入肿瘤细胞并表达TK，将GCV磷酸化为二磷酸产物GCV-DP，然后在哺乳动物细胞内激酶作用下形成三磷酸产物GCV-TP，GCV-TP具有强烈细胞毒性，抑制DNA聚合酶，掺入DNA合成链中，导致链中止、染色体变性和姐妹染色单体交换，最终导致细胞死亡，从而达到杀死肿瘤细胞的目的。

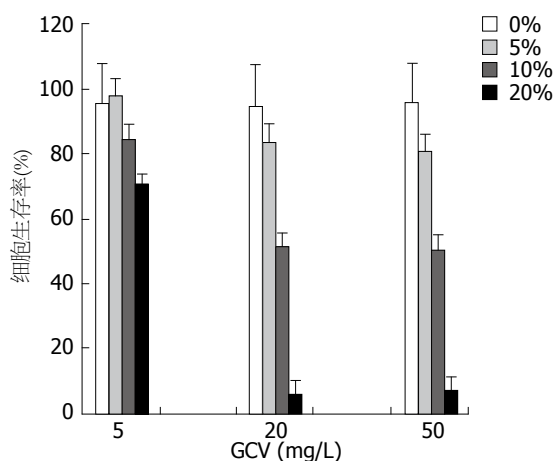


图4 MPC/TK细胞与亲代MPC细胞不同比率混合后在3个不同浓度的GCV杀伤实验。

## GCV自杀基因系统的小鼠胰腺癌体内外研究。

本实验构建了一种质粒载体进行小鼠胰腺癌细胞的体内外实验，以观察TK/GCV对小鼠胰腺癌细胞MPC的杀伤作用。实验中我们采用绿色荧光蛋白(GFP)作为筛选标记，与HSV-TK基因共同插入真核表达载体pcDNA3.1(+), 构建重组质粒pcDNA3.1+/HSV-TK+GFP，并将重组质粒转染小鼠胰腺癌MPC细胞制备MPC/HSV-TK+GFP细胞，Western blot证实TK基因能够在小鼠胰腺癌细胞中表达。

体外实验结果显示，当MPC/HSV-TK+GFP细胞数占混合细胞10%时，低浓度(20 mg/L)的GCV就可将50%左右的肿瘤细胞杀死，当MPC/HSV-TK+GFP细胞数占混合细胞20%时，几乎所有的肿瘤细胞被杀死。实验结果提示，当加入GCV后，转导了MPC/HSV-TK+GFP的肿瘤细胞在给予药物前体后被杀死，随着时间的推移，其相邻的未转染肿瘤细胞也可被杀死，显示出极强的旁观者效应。旁观者效应的意义在于只需少量肿瘤细胞转染自杀基因，就会对邻近的肿瘤细胞产生广泛的杀伤作用，在当前体内转导基因方法不可能达到使肿瘤细胞全部转导目的基因的情况下，无疑是一条重要的补充途径，克服了转染率相对低下限制问题，明显扩大了自杀基因对肿瘤细胞的杀伤作用，对恶性肿瘤的治疗有着十分重要意义。转染了自杀基因的肿瘤细胞其相邻或更远的未被转染的肿瘤细胞也可被杀死的机制可能是多重的，有研究表明磷酸化GCV核苷是通过细胞间隙从HSV-TK阳性细胞传递到周围细胞，另外GCV治疗下的HSV-TK转导的肿瘤细胞可分泌IL-6和IL-1作为旁分泌因子介导未转导细胞的死亡<sup>[16]</sup>。从濒死的

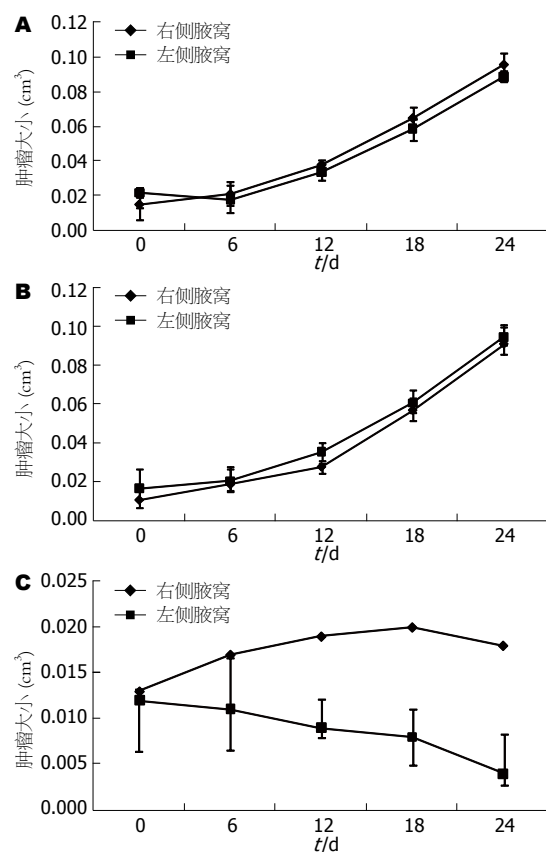


图5 GCV对MPC/HSV-TK+GFP细胞在小鼠体内成瘤的观察。A: 第1组; B: 第2组; C: 第3组。

转导了HSV-TK的细胞向临近细胞传递凋亡的信号也是旁观者效应的机制之一。HSV-TK/GCV治疗和死亡受体(CD95)聚集<sup>[17-19]</sup>以及Caspases的活化<sup>[20-21]</sup>等几者的联合可向临近细胞传递前凋亡信号。

体内实验中，采用多疗程注射的方法对小鼠进行注射，动物实验结果显示，多疗程注射GCV后，可明显抑制MPC/HSV-TK+GFP细胞在昆明小鼠体内的肿瘤形成。本实验中，虽然MPC/HSV-TK+GFP细胞对于GCV敏感，但是未能被完全杀死，实验组小鼠肿瘤体积及质量等较对照组为小，实验中未发现肿瘤完全消退现象，这可能与GCV注射时肿瘤体积大小有关<sup>[23]</sup>；此外，GCV治疗肿瘤的周期较短，实验研究过程中采用了多疗程注射的方法，可以克服基因转导效率低，体内短暂表达的缺点，同时，多疗程注射可以保持肿瘤的免疫反应，防止肿瘤的复发。

本研究结果显示，HSV-TK+GFP/GCV自杀基因治疗系统在抑制小鼠胰腺癌细胞的生长以及杀伤肿瘤细胞的过程中发挥了良好的作用，本研究结果为临床治疗胰腺癌提供了新的思路和实验依据。此外，将HSV-TK+GFP/GCV自杀基

因治疗系统联合化疗以及协同其他细胞因子进行基因治疗以提高疗效, 同时, 通过调整细胞生理, 诱导肿瘤细胞凋亡, 加强肿瘤与肿瘤细胞、肿瘤细胞与正常细胞之间的GJIC功能, 提高旁观者效应而增强自杀基因疗效的研究有待进一步深入。

#### 4 参考文献

- 1 Denny WA. Prodrugs for Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (Suicide Gene Therapy). *J Biomed Biotechnol* 2003; 2003: 48-70
- 2 Ozawa K. [Hematopoietic malignancies and gene therapy] *Gan To Kagaku Ryoho* 2003; 30: 478-482
- 3 Prados J, Melguizo C, Boulaiz H, Marchal JA, Aránega A. Cancer gene therapy: strategies and clinical trials. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005; 51: 23-36
- 4 Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 2005; 30: 71-88
- 5 Kwong KY, Zou Y, Day CP, Hung MC. The suppression of colon cancer cell growth in nude mice by targeting beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 2002; 21: 8340-8346
- 6 Mäkinen K, Loimas S, Wahlfors J, Alhava E, Jänne J. Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med* 2000; 2: 361-367
- 7 Mullen CA. Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmacol Ther* 1994; 63: 199-207
- 8 Wei MX, Bougnoux P, Sacré-Salem B, Peyrat MB, Lhuillery C, Salzmann JL, Klatzmann D. Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. *Cancer Res* 1998; 58: 3529-3532
- 9 Zhang Z, Shirakawa T, Hinata N, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Matsuo M, Gotoh A. Combination with CD/5-FC gene therapy enhances killing of human bladder-cancer cells by radiation. *J Gene Med* 2003; 5: 860-867
- 10 Pan X, Li ZS, Xu GM, Cui L, Tu ZX. Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26: 274-278
- 11 van der Linden RR, Haagmans BL, Mongiat-Artus P, van Doornum GJ, Kraaij R, Kadmon D, Aguilar-Cordova E, Osterhaus AD, van der Kwast TH, Bangma CH. Virus specific immune responses after human neoadjuvant adenovirus-mediated suicide gene therapy for prostate cancer. *Eur Urol* 2005; 48: 153-161
- 12 Kurozumi K, Tamiya T, Ono Y, Otsuka S, Kambara H, Adachi Y, Ichikawa T, Hamada H, Ohmoto T. Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus. *J Neurooncol* 2004; 66: 117-127
- 13 谭宇蕙, 吴映雅, 杜标炎, 胡岳山, 赵鹏, 李杰芬. 大鼠肝癌细胞HSV-tk/GCV自杀基因系统的构建及其旁观者效应. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2069-2073
- 14 Wang Y, Xu HX, Lu MD, Tang Q. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 224-230
- 15 Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplex virus thymidine kinase and cytokine genes expressed in gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 26-30
- 16 Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ. The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Lett* 1995; 92: 167-174
- 17 Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolais O, Rogister B, Merville MP, Bours V. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. *BMC Cancer* 2005; 5: 32
- 18 Kwon GY, Jeong J, Woo JK, Choi HY, Lee MJ, Ko JK, Shim YH, Kim CW. Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 756-763
- 19 Hall SJ, Canfield SE, Yan Y, Hassen W, Selleck WA, Chen SH. A novel bystander effect involving tumor cell-derived Fas and FasL interactions following Ad.HSV-tk and Ad.mIL-12 gene therapies in experimental prostate cancer. *Gene Ther* 2002; 9: 511-517
- 20 Zhang Z, Lin J, Chu J, Ma Y, Zeng S, Luo Q. Activation of caspase-3 noninvolved in the bystander effect of the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir (HSV-tk/GCV) system. *J Biomed Opt* 2008; 13: 031209
- 21 Chiu CC, Kang YL, Yang TH, Huang CH, Fang K. Ectopic expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene in human non-small cell lung cancer cells conferred caspase-activated apoptosis sensitized by ganciclovir. *Int J Cancer* 2002; 102: 328-333
- 22 Vlachaki MT, Chhikara M, Aguilar L, Zhu X, Chiu KJ, Woo S, Teh BS, Thompson TC, Butler EB, Aguilar-Cordova E. Enhanced therapeutic effect of multiple injections of HSV-TK + GCV gene therapy in combination with ionizing radiation in a mouse mammary tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51: 1008-1017

#### ■同行评价

本文立意新颖, 方法得当, 分析合理, 研究有一定意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

# 槐耳清膏对缺氧结肠癌SW480细胞VEGF及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响

吕赤, 苏琪, 徐锋, 殷红专

## ■背景资料

血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )是重要的氧调节转录因子, 二者与肿瘤缺氧状态下血管发生密切相关。槐耳清膏是槐栓菌质发酵后的热水提取物, 其味苦辛, 性平无毒, 具有“治风”、“破血”、“益力”之功效。近来发现他能抑制实体肿瘤的血管生成。

吕赤, 苏琪, 徐锋, 殷红专, 中国医科大学附属盛京医院第一微创外科 辽宁省沈阳市 110004

吕赤, 中国医科大学在读硕士, 主要从事大肠肿瘤的临床和基础研究。

作者贡献分布: 本课题由吕赤与苏琪设计; 研究过程由吕赤、苏琪、徐锋及殷红专完成; 数据分析由吕赤与殷红专完成; 本论文写作由吕赤与徐锋完成。

通讯作者: 苏琪, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院第一微创外科。

suqi100@yahoo.cn

电话: 024-83955057

收稿日期: 2009-03-21 修回日期: 2009-04-15

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

## Effect of Huaier cream on expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$ in colon cancer cells SW480 under hypoxia *in vitro*

Chi Lv, Qi Su, Feng Xu, Hong-Zhuan Yin

Chi Lv, Qi Su, Feng Xu, Hong-Zhuan Yin, the First Department of Minimally Invasive Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Qi Su, the First Department of Minimally Invasive Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. suqi100@yahoo.cn

Received: 2009-03-21 Revised: 2009-04-15

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Huaier cream on expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in SW480 colon cancer cell *in vitro*.

**METHODS:** Human SW480 colon cancer cells were cultured for 48 h *in vitro* and randomly divided into normoxic control group (NC group), hypoxia control group (HC group) and hypoxia group treated with Huaier at the concentration of 1 g/L (HH group). Levels of mRNA and protein expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in each group were detected using semi-quantitative RT-PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** VEGF or HIF-1 $\alpha$  mRNA expression levels were found significantly higher in HC

group and HH group than in NC group ( $4.71 \pm 0.07$ ,  $4.54 \pm 0.02$  vs  $1.19 \pm 0.03$ ;  $5.68 \pm 0.07$ ,  $5.58 \pm 0.05$  vs  $1.21 \pm 0.05$ , all  $P < 0.05$ ), but not significantly different between HC group and HH group. VEGF or HIF-1 $\alpha$  protein were also over expressed in HC group than in NC group ( $0.66 \pm 0.03$  vs  $0.38 \pm 0.02$ ;  $0.58 \pm 0.04$  vs  $0.31 \pm 0.03$ , both  $P < 0.05$ ). In HH group, however, the protein levels of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were inhibited significantly compared with HC group ( $0.37 \pm 0.03$ ;  $0.30 \pm 0.05$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Huaier cream down-regulates the protein expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF of SW480 cells which may be one of the mechanisms of anti-tumorigenesis.

**Key Words:** Vascular endothelial growth factor; Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; Huaier cream; SW480; Colonic carcinoma

Lv C, Su Q, Xu F, Yin HZ. Effect of huaier cream on expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in colon cancer cells SW480 under hypoxia *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1504-1507

## 摘要

**目的:** 观察槐耳清膏对体外培养人结肠癌SW480细胞系VEGF和HIF-1 $\alpha$ 表达的影响。

**方法:** 体外培养人结肠癌SW480细胞48 h, 随机分为常氧对照组(NC组)、低氧对照组(HC组)和低氧槐耳组(HH组), HH组RPMI 1640培养基含槐耳清膏(终浓度1 g/L)。半定量RT-PCR检测SW480细胞VEGF和HIF-1 $\alpha$  mRNA表达水平, Western blot检测两者蛋白表达水平。

**结果:** HH组和HC组VEGF、HIF-1 $\alpha$  mRNA表达水平均显著高于NC组( $4.71 \pm 0.07$ ,  $4.54 \pm 0.02$  vs  $1.19 \pm 0.03$ ;  $5.68 \pm 0.07$ ,  $5.58 \pm 0.05$  vs  $1.21 \pm 0.05$ , 均 $P < 0.05$ ), 但HH组与HC组比较无统计学差异。HC组VEGF、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达均显著高于NC组( $0.66 \pm 0.03$  vs  $0.38 \pm 0.02$ ;  $0.58 \pm 0.04$  vs  $0.31 \pm 0.03$ , 均 $P < 0.05$ ), 与

## ■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

HC组比较, HH组VEGF和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达均显著下降( $0.37 \pm 0.03$ ,  $0.30 \pm 0.05$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 槐耳清膏通过下调人结肠癌SW480细胞内HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋白表达抑制肿瘤生成.

**关键词:** 血管内皮生长因子; 缺氧诱导因子1 $\alpha$ ; 槐耳清膏; SW480细胞; 结肠腺癌

吕赤, 苏琪, 徐锋, 殷红专. 槐耳清膏对缺氧结肠癌SW480细胞VEGF及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1504-1507

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1504.asp>

## 0 引言

在我国大肠癌是发病率及病死率较高的消化系统恶性肿瘤, 研究大肠癌的治疗具有重要的临床意义. 中药在恶性肿瘤治疗中发挥着不可忽视的作用, 有研究证明金克槐耳能诱导直肠癌细胞凋亡, 但其作用机制尚不明确<sup>[1]</sup>. 早在1971年Folkman首次提出“肿瘤的生长和转移依赖于新生血管形成”的观点, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的促进血管生成因子之一. 虽然抑制肿瘤血管新生已成为当前抗肿瘤治疗热点之一<sup>[2]</sup>, 但金克槐耳是否具有抗结肠癌新生血管生成的作用尚未见文献报道. 本研究以人结肠癌SW480细胞株为对象, 研究缺氧条件下槐耳清膏对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其调节基因缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的抑制作用, 初步探讨槐耳清膏在抑制肿瘤新生血管形成方面的作用机制, 为结肠癌临床治疗提供新的理论和实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌SW480细胞株购于ATCC细胞库. RPMI 1640培养基购于Gibco公司. 小牛血清购于Clarkbio公司. 总RNA提取试剂、反转录试剂盒、Taq聚合酶均购于TaKaRa公司. 上下游引物由Invitrogen公司合成. HIF-1 $\alpha$  pAb和VEGF mAb购于Santa Cruz公司. 槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组及培养:** 人结肠癌细胞SW480培养于含100 g/L小牛血清、1 kU/L青霉素、1 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 200 mL/L O<sub>2</sub>的培养箱, 取对数生

长期细胞, 随机分为常氧对照组(NC组)、低氧对照组(HC组)和低氧槐耳组(HH组). NC组继续常氧培养48 h, 其余2组低氧(37 $^{\circ}\text{C}$ , 940 mL/L N<sub>2</sub>、50 mL/L CO<sub>2</sub>、10 mL/L O<sub>2</sub>)培养48 h, 其中HC组低氧不给药, HH组为RPMI 1640含终浓度1 g/L槐耳清膏(通过前期预实验证实1 g/L为最佳药效浓度).

**1.2.2 半定量RT-PCR方法检测VEGF mRNA和HIF-1 $\alpha$  mRNA:** 收集培养细胞, 采用TRIzol两步法提取各组SW480细胞内的总RNA, 测定A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>计算总RNA纯度和浓度. 每组取1  $\mu\text{g}$ 总RNA, 按试剂盒说明合成cDNA第1链, 以此cDNA为模板进行PCR反应. PCR反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ /49 $^{\circ}\text{C}$ /55.5 $^{\circ}\text{C}$ (VEGF/HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin)退火40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 共35个循环. 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却. 取PCR产物进行琼脂糖电泳. Gene Snap凝胶成像系统照相并进行灰度值分析, 以条带吸光度(A)值代表其目的片段的表达量, 以内参照 $\beta$ -actin的量校正, 取二者A值之比进行分析. 每组实验重复3次. RT-PCR中所引用引物见表1.

**1.2.3 Western blot检测各组细胞内VEGF, HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达:** 取各组细胞, 按试剂盒说明提取蛋白并用BCA法蛋白定量. 各组上样蛋白经SDS-PAGE电泳分离后, 湿转至PVDF膜上. 50 g/L脱脂奶粉37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h. 分别加入鼠抗人VEGF一抗(1:200稀释), 兔抗人HIF-1 $\alpha$ 一抗(1:200稀释)和兔抗人 $\beta$ -actin一抗(1:1000稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. TBST洗3次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG二抗(1:2000稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h. TBST洗3次, 增强化学发光剂(ECL)显色. Gene Snap凝胶成像系统照相. 用 $\beta$ -actin为内对照, 以阳性条带与内对照 $\beta$ -actin A值比作为阳性条带的相对表达值. 每组实验重复3次.

**统计学处理** 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析. 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 数据比较采用两独立样本t检验, Spearman相关分析,  $P < 0.05$ 有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 VEGF及HIF-1 $\alpha$  mRNA表达水平** HC组和HH组VEGF及HIF-1 $\alpha$  mRNA表达水平均显著高于NC组( $P < 0.05$ ). 但HH组与HC组比较两者无统计学差异( $P > 0.05$ , 表2, 图1).

**2.2 VEGF及HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平** HC组VEGF及

### ■研发前沿

抑制新生血管生成是当今抗肿瘤治疗的重要策略之一. 寻找并研发安全、高效的抗肿瘤新生血管药物是肿瘤防治研究领域亟待解决的关键问题.

### ■相关报道

有关研究发现槐耳清膏通过下调患者血清VEGF的表达, 降低原发性肝癌的转移复发率. 体外研究发现槐耳清膏能明显抑制VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖和分化成血管能力.

### ■创新盘点

目前国内外关于槐耳清膏对缺氧结肠癌细胞内VEGF和HIF-1 $\alpha$ 基因表达影响的报道并不多见。本研究观察人结肠癌细胞SW480在缺氧环境中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 表达的变化,发现槐耳清膏能通过下调结肠癌细胞中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达抑制肿瘤新生血管生成。

表 1 RT-PCR中所用引物

引物	序列	大小(bp)	温度(°C)
VEGF	CTTGCCTTGCTGCTCTAC	150	53
	GATGTCCACCAGGTCTC		
HIF-1 $\alpha$	AGTGTACCCTAAGTACCC	159	49
	CACAAATCAGCACCAAGC		
$\beta$ -actin	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	508	55.5
	CTCCTTAATGTACGCACGAT		

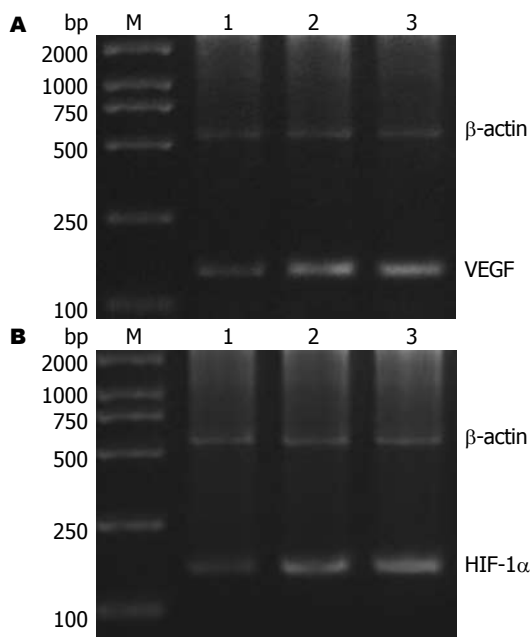


图 1 RT-PCR检测SW480细胞VEGF及HIF- $\alpha$  mRNA的表达。A: VEGF; B: HIF- $\alpha$ ; M: DNA Marker; 1: 常氧对照组; 2: 低氧对照组; 3: 低氧槐耳组。

HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平较NC组显著增加( $P<0.05$ )。HH组VEGF和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平明显低于HC组( $P<0.05$ ),且低于NC组水平,但无统计学差异( $P>0.05$ ,表2,图2)。

**2.3 相关性分析** HH组中VEGF mRNA与HIF-1 $\alpha$  mRNA表达呈正相关( $r = 0.943, P = 0.000$ ); HH组中VEGF与HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达呈正相关( $r = 0.919, P = 0.000$ )。

### 3 讨论

缺氧是恶性肿瘤发生发展过程中的普遍现象。当实体肿瘤处于生长旺盛时期,局部的氧供无法满足肿瘤细胞存活和生长需要,微环境就会缺氧。缺氧能激活多种血管生成相关因子表达<sup>[3-4]</sup>,此时新生血管的生成有利于肿瘤细胞的生存并增强其浸润和转移能力,而新生血管形成和血管通透性增加被认为是血管内皮细胞生长因子相

表 2 VEGF及HIF-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达 (mean  $\pm$  SD)

分组	mRNA		蛋白	
	VEGF	HIF-1 $\alpha$	VEGF	HIF-1 $\alpha$
NC组	1.19 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.03
HC组	4.54 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	5.58 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
HH组	4.71 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	5.68 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.30 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs NC组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs HC组。

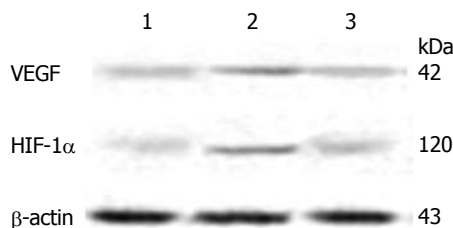


图 2 Western blot检测VEGF及HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达。1: 常氧对照组; 2: 低氧对照组; 3: 低氧槐耳组。

关疾病主要发病因素<sup>[5]</sup>。因此对缺氧的适应和新生血管的形成是恶性肿瘤发展过程的关键步骤。VEGF可以通过诱导内皮细胞分裂、增殖、迁移,促进新生血管的生成和肿瘤细胞的浸润转移,是目前所知的作用最强的促进VEGF。VEGF表达上调,能使结肠癌组织血管的生成增加,为肿瘤的生长提供更多的营养物质,有利于肿瘤细胞的生长与转移<sup>[6]</sup>。另有研究显示: VEGF反义核苷酸能够通过降低VEGF基因的表达,抑制人大肠癌HT-29细胞的体外增殖,并对其具有一定的凋亡诱导作用<sup>[7]</sup>。HIF-1是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种异源二聚体转录因子,主要由HIF-1 $\alpha$ 和HIF-1 $\beta$ 两个亚单位组成,其中HIF-1 $\alpha$ 是唯一的氧调节亚单位,决定HIF-1的活性<sup>[8-9]</sup>。实体肿瘤中HIF-1 $\alpha$ 可以参与调节适应缺氧环境的多种基因转录,包括VEGF、SDF-1、CXCR4<sup>[10]</sup>。缺氧条件下HIF在多个层面调节VEGF表达,包括增加VEGF mRNA稳定性和增强VEGF的活性<sup>[11]</sup>。研究显示抑制HIF-1 $\alpha$ 表达可以抑制血管生成相关基因表达<sup>[12]</sup>。

槐耳清膏是槐耳菌质发酵后的热水提取物,含有多种有机成分和10余种矿物质元素,主要活性成分为多糖蛋白(PS-T)。有研究发现槐耳通过下调患者血清VEGF的表达,可降低原发性肝癌的转移复发率<sup>[13]</sup>。体外研究槐耳清膏对VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein

### ■应用要点

研究槐耳清膏抑制结肠癌血管生成可能的作用靶分子,为寻找新的抗癌治疗靶点和研发、筛选新型临床抗结肠癌药提供一定的理论依据。

endothelial cell, HUVEC)增殖和分化成血管能力的影响,发现槐耳明显抑制VEGF诱导的内皮细胞增殖<sup>[14]</sup>。有关槐耳清膏具体通过何种途径调节VEGF从而发挥抑制新生血管的作用,国内外文献尚未有报道。本实验研究槐耳清膏抑癌作用是否与其影响血管生成相关基因VEGF及HIF-1 $\alpha$ 的表达有关。

本实验选用人结肠癌SW480细胞,体外实验结果表明:缺氧状态下,细胞内VEGF及HIF-1 $\alpha$  mRNA较常氧状态下显著高表达,进而导致相应蛋白高表达。表明肿瘤细胞在氧供不足的情况下,通过上述基因促进新生血管形成,适应缺氧环境并满足自身生存需要。予以槐耳清膏作用后,与血管生成相关蛋白:VEGF及HIF-1 $\alpha$ 表达均显著下降,提示槐耳清膏抗结肠癌的作用可能与其抑制肿瘤细胞VEGF和HIF-1 $\alpha$ 的表达有关,即可能通过抑制VEGF和HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的生长;降低新生血管的生成等环节,发挥抗癌功效。值得注意的是,本文的实验结果证明:虽然槐耳清膏可引起肿瘤细胞VEGF和HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达降低,但用药后VEGF及HIF-1 $\alpha$  mRNA表达却无显著降低。其原因我们认为可能是:(1)槐耳清膏并非在基因水平上调节HIF-1 $\alpha$ 的表达,很可能通过抑制HIF-1 $\alpha$ 的合成或增强HIF-1 $\alpha$ 的清除系统,如:脯氨酸羟化酶活性等途径,使肿瘤细胞的HIF-1 $\alpha$ 减少。(2)同样槐耳清膏也可影响VEGF的合成或清除环节而使肿瘤细胞的VEGF表达减少。

此外,尽管一般认为,HIF-1可以通过调节其靶基因VEGF基因<sup>[15]</sup>,而影响VEGF mRNA的表达,但HIF-1的靶基因多达200余种,被HIF-1激活的众多靶基因之间如何相互作用,互相调节、控制等是极为复杂和尚须解决的问题。本研究观察到:槐耳清膏抑制了肿瘤细胞HIF-1的表达,同时也抑制了VEGF的表达,且两者显著相关;

但VEGF mRNA却无显著变化的原因,是否与同时被激活的其他靶基因之间的调节有关?以及其意义如何等尚待今后深入探讨。

#### 4 参考文献

- 1 程若川, 汤礼贵, 兰丽琴, 贾伟. 槐耳清膏诱导人直肠癌HR8348细胞凋亡的实验研究. 中国普外基础与临床杂志 2003; 10: 568-571
- 2 杨军, 陈明清, 董坚. VEGF/VEGFR2信号转导通路在抗肿瘤血管生成中的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3611-3616
- 3 Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410
- 4 Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 10-17
- 5 Pourgholami MH, Morris DL. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 343-347
- 6 陈建华. 结肠癌及癌前病变组织中COX-2及VEGF的表达. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2167-2169
- 7 焦得闯, 吴爱国, 邵国利, 纪术峰. VEGF反义寡核苷酸对体外生长的大肠癌HT-29细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2831-2835
- 8 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 4010-4015
- 9 Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709-720
- 10 Hoenig MR, Bianchi C, Rosenzweig A, Sellke FW. Decreased vascular repair and neovascularization with ageing: mechanisms and clinical relevance with an emphasis on hypoxia-inducible factor-1. *Curr Mol Med* 2008; 8: 754-767
- 11 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677-684
- 12 侯伟, 覃华, 刘爽, 王颖, 刘南植, 赵秋, 田德安. 姜黄素对缺氧HepG2细胞中HIF-1 $\alpha$ 表达的影响及可能机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2354-2358
- 13 赵建军, 蔡建强, 毕新宇, 杨晓洁. 槐耳颗粒对原发性肝癌术后转移复发的影响. 中国综合临床 2007; 23: 245-247
- 14 许戈良, 英卫东, 马金良, 余继海. 槐耳清膏体外抑制血管生成的实验研究. 中国药理学通报 2003; 19: 1410-1412
- 15 Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 678-685

#### ■同行评价

本研究立题新颖,设计合理,结果可信,具有重要的研究价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 幽门螺杆菌动物模型驯化菌株SS1与其初始菌株的差异蛋白质组分析

李晶, 赵飞, 肖迪, 何利华, 张建中

## ■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)动物模型菌株SS1筛选自大批量的临床菌株,由其原始株在小鼠体内经过多次传代获得,每克小鼠胃的SS1的定植数量比原始株高出两个数量级,在体外传代20次以内定植能力不会降低,其良好的定植能力在许多实验室被验证。以26695菌株基因组作标准,SS1及其原始株基因水平上的变化涉及48个基因,没有丢失或获得26695菌株中已知的基因。

李晶, 赵飞, 肖迪, 何利华, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所北京市 102206

李晶,在读博士,主要从事幽门螺杆菌黏附相关因素的研究。

“十一五”国家科技支撑计划重点基金资助项目, No. 2007BAI04B02

作者贡献分布: 本研究由李晶与张建中设计; 实验过程由李晶、赵飞、肖迪及何利华共同完成; 蛋白鉴定由李晶与肖迪完成; 数据分析由李晶与赵飞完成; 本论文写作由李晶与张建中完成。

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

电话: 010-61739456 传真: 010-61730233

收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2009-04-09

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-28

## Comparative proteomic analysis of *Helicobacter pylori* animal model adapted SS1 and its original strain

Jing Li, Fei Zhao, Di Xiao, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang

Jing Li, Fei Zhao, Di Xiao, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Supported by: the National Science and Technology Infrastructure Program, No. 2007BAI04B02

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. helico99@sina.com  
Received: 2009-03-02 Revised: 2009-04-09  
Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To analyze the protein profiles of mouse-adapted *H. pylori* SS1 and its initial strain 10700 and to find out the proteins associated with enhanced adhesive ability of SS1.

**METHODS:** Three sets of cellular proteins of SS1 and 10700 were prepared independently. The samples were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) technique, and the gels were scanned and recorded as digitalized images with high-resolution scanner. The images were analyzed by Image Master 2D software. Spots on gels were paired between 10700 and SS1. Differently expressed proteins in all three sets were cut for in-gel digestion and identified by MALDI-

TOF-TOF/MS. Peptide mass fingerprints were searched in the NCBI and Swiss-Prot database.

**RESULTS:** Eleven down-regulated spots presented with ten proteins. Four were related to anti-oxidation, namely, catalase, thioredoxin reductase, superoxide dismutase and thioredoxin. Five were enzymes associated with metabolism, including proline peptidase, fructose-bisphosphate aldolase, inorganic pyrophosphatase, 3-oxoacid CoA-transferase subunit B and Elongation factor P. Another one was a putative protein HPAG0942.

**CONCLUSION:** In the course of mouse-adapted, *H. pylori* strain SS1 may increase its adhesive ability by decreasing metabolism and anti-oxidative level measurably.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Animal model; Two-dimensional gel electrophoresis; Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry

Li J, Zhao F, Xiao D, He LH, Zhang JZ. Comparative proteomic analysis of *Helicobacter pylori* animal model adapted SS1 and its original strain. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1508-1512

## 摘要

**目的:** 比较*H. pylori*动物模型适应菌株SS1与其初发菌株10700间蛋白质组差异, 试图获得*H. pylori*在小鼠体内适应过程中可能与定植能力增强相关的蛋白特征。

**方法:** 在相同件下培养SS1菌株及其初始菌株, 并制备全菌蛋白样品, 相同实验条件下重复3次, 样品经二维电泳分离, 扫描获得数字化的电泳图像并用ImageMaster2D图像分析软件比较分析, 识别SS1与初始菌株间的差异蛋白点。取3次制备的样品间的共同差异点进行胶内酶解, 经基质辅助激光电离解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF/MS)获得肽质量指纹图谱, 用Mascot软件在Swiss-Prot和NCBI数据库中搜索匹配蛋白。

## ■同行评议者

吴建国, 教授, 武汉大学生命科学院

**结果:** 表达量有明显下降的11个点, 经鉴定对应10个蛋白: 4个属于*H pylori*的氧化还原系统, 即过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、硫氧还蛋白和环氧蛋白还原酶; 5个蛋白与代谢有关, 即脯氨酸肽酶(proline peptidase)、果糖磷酸氢盐醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)、无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase)、3-含氧酸辅酶A转移酶亚单位B(3-oxoacid CoA-transferase subunit B)和延伸因子(elongation factor P); 另1个蛋白为假想蛋白HPAG0942。

**结论:** *H pylori*在小鼠体内的定植适应过程中, 伴有代谢酶表达的降低和抗氧化水平的减弱, 提示代谢和抗氧化能力适度下调可能与菌株的定植力增强相关。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 动物模型; 二维电泳; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

李晶, 赵飞, 肖迪, 何利华, 张建中. 幽门螺杆菌动物模型驯化菌株SS1与其初始菌株的差异蛋白质组分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1508-1512  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1508.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是定植于人体胃部的革兰阴性微需氧细菌, 他能引起胃炎、胃溃疡、甚至胃癌等多种胃部疾病<sup>[1]</sup>。*H pylori*的宿主特异性和组织特异性很强, 在小鼠体内的黏附定植能力弱, 为了建立小动物模型便于*H pylori*的致病机制研究及防治, 人们筛选了许多种动物做实验模型<sup>[2-4]</sup>, 也在小动物体内驯化*H pylori*以获得定植能力好的菌株<sup>[5-6]</sup>, 比如中国人民解放军第三军医大学驯化的蒙古沙土鼠适应株M13<sup>[7]</sup>, 本实验室驯化26695所得的88-3887(未发表), 澳大利亚Lee团队驯化的SS1及SS2000, 其中应用最为广泛的适应株当属SS1, 该菌株的黏附能力清楚, 符合洛桑会议提出的建立动物模型的标准: 动物感染后窦部和体部的定植和致病程度明确; 每克胃组织内所含的*H pylori*数目明确; 黏附出现和消失的时间明确; 感染达到的最长时间明确; 菌株在体外传代多少次还能够保证有黏附能力明确。SS1具有稳定的能达到 $10^7$ - $10^8$  cfu/g小鼠胃的良好定植能力, 其初始菌株10700在小鼠体内能达到 $10^6$  cfu/g小鼠胃, 经过驯化, SS1定植能力明显增强。研究其定植前后的适应性变化可能会为整体上阐释*H pylori*的适应性机制找到线索, 也有助于说明*H pylori*在适应过程中与小鼠间的相互作用关系, 并为对比该菌

在人体内的情况有何不同提供参考。

由O'Farrell *et al*<sup>[8]</sup>在1975年建立的双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2DE)技术可以同时分离数千种蛋白, 结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)的快速鉴定蛋白能力, 可以对*H pylori*的蛋白表达有全面的认识。本实验拟通过SS1及其初始菌株10700驯化前后的蛋白质组差异分析, 了解小鼠体内连续传代导致的细菌适应性变化规律。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *H pylori*动物模型适应菌株SS1、SS1初始菌株10700均由澳大利亚新南威尔士大学生物技术和分子生物学学院Jani O'Rourke博士惠赠。哥伦比亚琼脂为Oxoid产品, 两性霉素B、多黏菌素B、万古霉素、磺胺增效剂TMP均为Amresco产品, DTT、尿素、溴酚兰、CHAPS、Tris为Amersham Biosciences产品, 蛋白定量试剂盒、pH3-10非线性干胶条、IPG Buffer、考马斯亮兰G-250为GE Healthcare产品, 碘乙酰胺、丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺、硫脲、胰酶、乙腈为Sigma产品, 三氯醋酸为Fluka产品。其他试剂购于北京化学试剂厂。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养:** 将SS1和10700菌株接种于含50 mL/L绵羊全血的哥伦比亚琼脂平板上, 平板中含有两性霉素B 200 mg/L、多黏菌素B 200 mg/L、万古霉素250 mg/L、TMP 300 mg/L。平板置于50 mL/L O<sub>2</sub>, 100 mL/L CO<sub>2</sub>, 850 mL/L N<sub>2</sub>的微需氧气体环境中37℃培养48 h后刮取菌苔, 用8.5 g/L的NaCl溶液洗涤3次以去除培养基成分和死菌, 每次离心条件为4500 g、4℃、10 min, 弃上清, 保留沉淀。

**1.2.2 制备蛋白:** 用丙酮三氯醋酸法制备*H pylori*全菌蛋白<sup>[9]</sup>。向洗涤后的沉淀(约3皿细菌所得)中加入4-8 mL、-20℃预冷的含2 g/L二巯基苏糖醇(DTT)、200 g/L三氯醋酸(TCA)的丙酮溶液, 边加边搅拌, 然后置于-20℃约2 h; 4500 g离心后去除上清; 沉淀于-80℃冰箱中预冻1 h后冻干。蛋白干粉溶于裂解液中, 终浓度约为5-10 g/L, 蛋白裂解液在4℃放置约4 h, 超声助溶, 至溶液澄清透明时离心, 17000 g、4℃、10 min, 弃沉淀取上清分装保存于-80℃冰箱中备用。蛋白定量按GE Healthcare产品说明书进行。

**1.2.3 二维电泳:** 第一向等电聚焦(IEF)使用24 cm

## ■研发前沿

SS1菌株是使用范围最广的*H pylori*动物模型适应菌株, 与其他临床菌株相比, 经驯化后的SS1黏附定植能力更稳定, 驯化前后变化的原因不详。

## ■相关报道

筛选出SS1菌株的实验室又筛选得一株定植能力良好的小鼠适应株SS2000, 并在基因组水平上比较了适应前后的变化; 郭刚 *et al*<sup>[10]</sup>研究了HP0318基因在*H pylori*适应蒙古沙土鼠过程中的作用。

# ■创新盘点

本实验中所用菌株为传代次数在7代以内的原始株和SS1, 原始株临床分离后未经过驯化, 尽量保持SS1和原始株各自的蛋白表达水平的原貌。

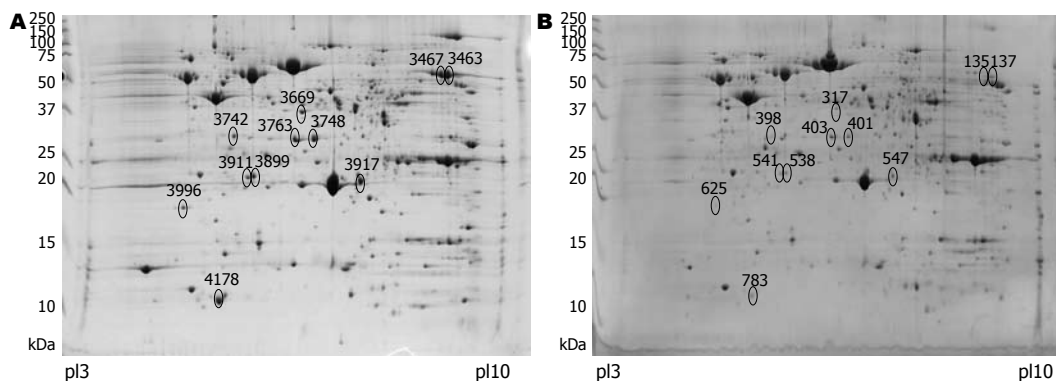


图1 三批蛋白样品中的同批样品*H. pylori*菌株SS1及10700的全菌蛋白2D电泳图谱。A: 10700; B: SS1; 各差异点以圆圈标出, 数字对应各点序号。

pH3-10非线性干胶条, 上样量为800  $\mu$ g/胶, 设置聚焦仪(Amersham Biosciences)程序为: 30 V, 6 h; 60 V, 6 h; 100 V, 1 h; 600 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 10 h, gradient; 聚焦至VhT80000将胶条取出。先后置于含10 g/L DTT和48 g/L碘乙酰胺的平衡液中振荡平衡各15 min后, 转至浓度为12.5%的聚丙烯酰胺凝胶, 进行第二向电泳: 2.5 W/胶, 30 min; 18 W/胶, 4.5 h至溴酚蓝线跑到胶最底部。考马斯亮兰G-250染色, 并用ImageMaster 2D Platinum 5.0分析软件采集图像。同一批制备的10700和SS1蛋白样品做差异比较, 2-DE胶上匹配点占蛋白总量的百分含量增加或降低1.5倍的为差异点, 切取3批样品中变化一致的差异点, 按说明书用胰酶进行胶内酶解。

1.2.4 质谱鉴定: ABI4700基质辅助激光电离解析飞行时间质谱分析, Nd: YAG激光器, 335 nm, 200 Hz激光激发, 应用GSP Explorer Workstation软件搜索NCBI数据库。

## 2 结果

2.1 2-DE图谱及差异蛋白分析 10700和SS1蛋白样品的部分2-DE图谱见图1。SS1与其初始菌株10700相比, 两个图的蛋白点分布非常相似, 差异蛋白共11个, 均为表达量减少, 差异点在2-DE图谱中的位置为图2所示。

2.2 2D图谱及差异蛋白的质谱鉴定 分析每批次内制备的样品10700与SS1间的差异点, 切取三批样品的共同差异点, 胶内酶解后经MALDI-TOF/TOF-MS鉴定, 取蛋白得分值大于95%的作为鉴定结果。每块2-DE胶切下11个点, 均表现为表达量下降倍数 $\geq 1.5$ 倍, 鉴定结果表明为10种蛋白。其中4个属于氧化还原系统蛋白: 过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶, 硫氧还蛋白, 硫氧还蛋白还原酶; 5个蛋白与代谢有关: 脯氨酸肽酶

(proline peptidase)、果糖磷酸氢盐醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)、延伸因子Elongation factor P、无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase)、3-含氧酸辅酶A转移酶亚单位B(3-oxoacid CoA-transferase subunit B); HPAG0942为假想蛋白, 该蛋白点的表达量下降幅度比较明显。各蛋白点鉴定时, 蛋白与离子的置信区间均高于95%, 且至少有两个肽段得分大于50或一个肽段得分大于60, 确认蛋白。鉴定信息见表1。

## 3 讨论

SS1菌株在小鼠体外传代20次以后仍然能够以 $10^7$ - $10^8$  cfu/g的定植能力定植于小鼠<sup>[5]</sup>, 本实验中所用的*H. pylori*在体外传代的次数均小于20次。在菌株尽可能保持其定植能力的情况下, 减小细菌培养和样品制备造成的误差, 用相同的培养条件、操作方法获得其全菌蛋白是差异蛋白质组的前提, 本次实验培养细菌3次并分别制备蛋白样品。同批次内的样品做差异点分析, 取3批样品的共同差异点用MALDI-TOF-MS/MS鉴定。*H. pylori*蛋白的等电点大部分集中在pI 4-7和pI 7.5-10<sup>[10]</sup>, 实验采用了pH3-10的胶条进行第一向等电聚焦。

2DE电泳目前仍然是分离水溶性较好的蛋白质的主流技术。用本实验室长期使用的适合于*H. pylori*的蛋白提取方法和2DE条件提取、分离蛋白, SS1及其原始菌株的蛋白质组轮廓很相似, 没有发现在某菌株中独特表达的菌株, 也验证了Thompson *et al*<sup>[6]</sup>关于SS1和初始菌株基因水平变化极小的说法。

表达下降的蛋白中, 有4个蛋白属于抗氧化系统。许多实验都证明了抗氧化系统对*H. pylori*的重要性, 抗氧化系统能帮助*H. pylori*消除中性粒细胞和巨噬细胞产生的氧自由基的杀伤

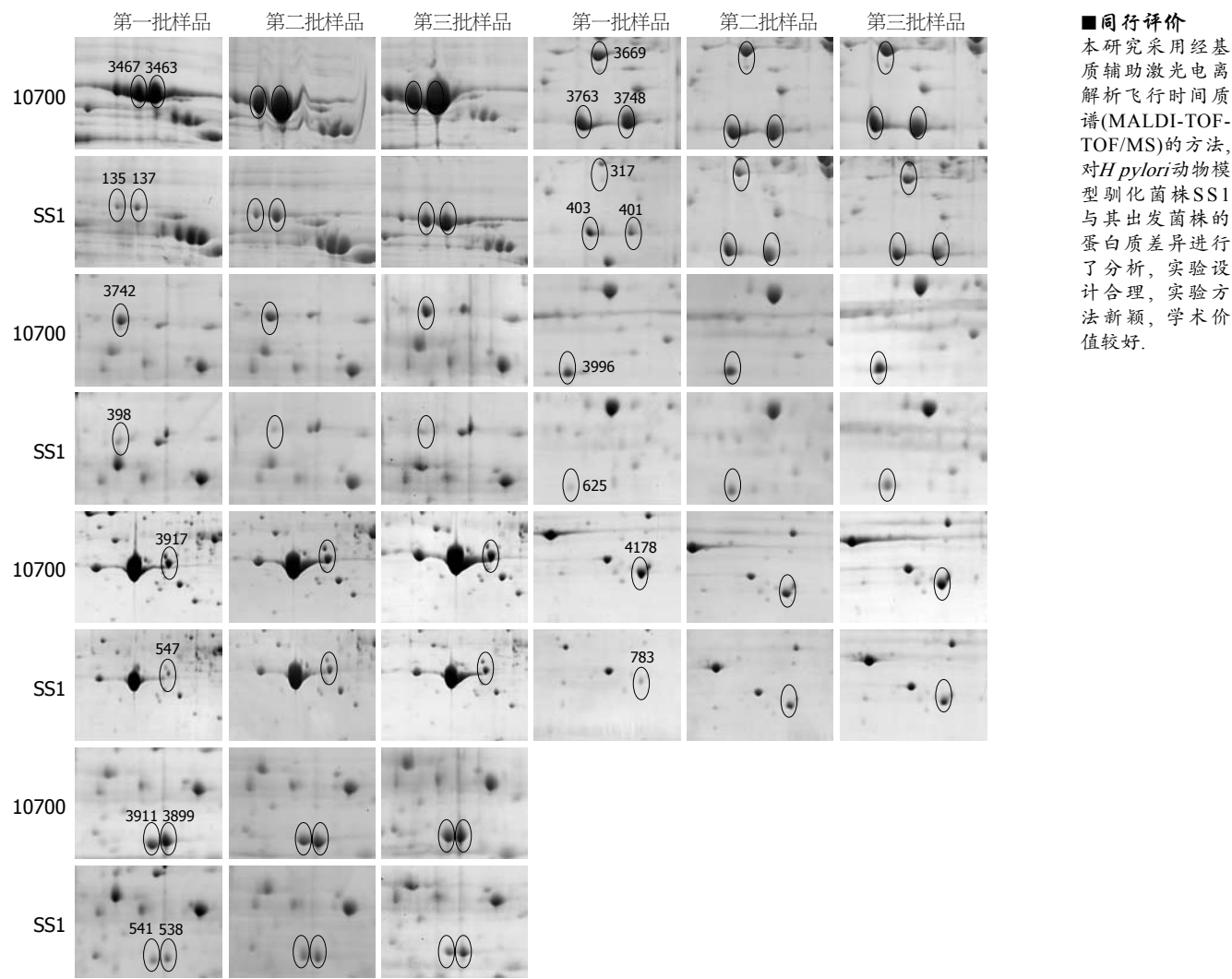


图 2 差异点在二批样品的2-DE图谱比较图.

表 1 10700和SS1差异蛋白鉴定结果					
10700	SS1	Protein spot	表达量降低倍数	Accession No.	pI/MW[Dal]
3463	137	Catalase	5.7	gi 84626117	8.7/58489.1
3467	135	Catalase	5.4	gi 84626117	8.7/58489.1
3669	317	Proline peptidase	1.8	gi 108562835	5.88/40818.9
3742	398	HPAG0942/jhp0892/HP0958	3.8	gi 108563367	5.6/29515.4
3748	401	Fructose-bisphosphate aldolase	1.6	gi 15611232	5.9/33776.4
3763*	403	Thioredoxin reductase	1.6	gi 15611831	5.93/33411.8
3899	538	Elongation factor P	1.8	gi 18075740	5.43/20388.5
3911	541	3-oxoacid CoA-transferase subunit B	1.8	gi 2370065	5.42/22243.5
3917	547	Superoxide dismutase	1.8	gi 54111600	6.19/24458.2
3996	625	Inorganic pyrophosphatase	1.6	gi 15384250	4.99/19228.8
4178	783	Thioredoxin	1.5	gi 15611830	5.16/11847.1

作用<sup>[11]</sup>, 缺失了过氧化氢酶<sup>[12]</sup>和超氧化物歧化酶<sup>[13]</sup>的SS1定植于小鼠的能力大为下降. 体外克隆表达的*H. pylori*环氧蛋白<sup>[14]</sup>能特异地还原IgG、IgA和黏液素(mucin)的链间二硫键, 环氧蛋白还原酶主要能够还原环氧蛋白, 回复环氧蛋白的活性<sup>[15]</sup>. 脯氨酸胺酶是自然界分布最广泛的渗透保护性物质, 可以防止渗透胁迫对生物造成的伤害, 且能清除自由基. 这些结果说

明抗氧化系统对于*H pylori*的生存和定植非常重要. 在本实验中过氧化氢酶表达量明显降低, 超氧化物歧化酶、环氧蛋白和环氧蛋白还原酶也有不同程度的降低, 提示2种可能: 一方面是*H pylori*的防御系统有所减弱但并不明显影响其生存; 另一方面*H pylori*的抗氧化能力的减弱可能有助于增加定植局部的炎性反应强度, 产生有利于*H pylori*生存的小环境.

部分差异蛋白与代谢相关. 果糖磷酸氢盐醛缩酶催化果糖-1, 6-二磷酸形成甘油磷酸和甘油醛-3-磷酸<sup>[16]</sup>, 是能量代谢中重要的一环. 无机焦磷酸酶催化无机焦磷酸水解为正磷酸, 保证细胞内焦磷酸的平衡, 同时释放出能量<sup>[17]</sup>. 延伸因子促进翻译和肽键合成的有效进行<sup>[18]</sup>. 3-含氧酸辅酶A转移酶亚单位B也参与能量代谢<sup>[19]</sup>. 能量代谢降低, 可能伴随着细菌生长速度的减慢、对生存条件中营养要求的降低, 反而利于*H pylori*在动物体内的生存.

据Lee *et al*报道<sup>[5]</sup>, SS1与10700之间大约48个基因有细小变化<sup>[6]</sup>, 但与本实验中鉴定出的蛋白没有直接对应关系, 说明本实验中的蛋白表达量变化可能并不是直接由于基因的变化导致. 就全菌蛋白水平来说, 可能通过调节部分抗氧化蛋白和代谢相关蛋白, SS1获得了明显增强的定植能力.

假想蛋白HPAG0942功能尚不清楚, 为何在定植能力提高的*H pylori*菌株SS1中表达量降低还需要进一步分析.

总之, 小鼠适应株SS1与初始菌株10700相比, 伴随着定植能力的增加, 代谢相关的蛋白、抗氧化蛋白表达量明显下降, 表明SS1菌株与机体的相互作用对长期、稳定、高效定植十分重要, 此研究结果为进一步认识*H pylori*与人体的相互提供了重要线索.

#### 4 参考文献

- Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 10-14
- Lachman LB, Ozpolat B, Rao XM, Graham DY, Osato M. Development of a murine model of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 1997; 2: 78-81
- Hirayama F, Takagi S, Yokoyama Y, Iwao E, Ikeda Y. Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 9: 24-28
- Lee JU, Kim O. Natural maternal transmission of *H. pylori* in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5663-5667
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997; 112: 1386-1397
- Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, Mitchell H, Lee A. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun* 2004; 72: 4668-4679
- Guo G, Tong WD, Zeng H, Liu KY, Zou QM. [Comparative proteomics analysis of *Helicobacter pylori* after adaptive colonization in Mongolian gerbils] *Weishengwu Xuebao* 2007; 47: 461-464
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-4021
- Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* 2004; 1023: 317-320
- Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, Paik YK, Walsh BJ, Cordwell SJ. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* 2003; 3: 569-579
- Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2006; 61: 847-860
- Harris AG, Wilson JE, Danon SJ, Dixon MF, Donegan K, Hazell SL. Catalase (KatA) and KatA-associated protein (KapA) are essential to persistent colonization in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model. *Microbiology* 2003; 149: 665-672
- Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001; 69: 4034-4040
- Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 2003; 149: 121-129
- Windle HJ, Fox A, Ni Eidhin D, Kelleher D. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 2000; 275: 5081-5089
- Fonvielle M, Coincon M, Daher R, Desbenoit N, Kosieradzka K, Barilone N, Gicquel B, Sygusch J, Jackson M, Therisod M. Synthesis and biochemical evaluation of selective inhibitors of class II fructose bisphosphate aldolases: towards new synthetic antibiotics. *Chemistry* 2008; 14: 8521-8529
- Chao TC, Huang H, Tsai JY, Huang CY, Sun YJ. Kinetic and structural properties of inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Proteins* 2006; 65: 670-680
- Aoki H, Xu J, Emili A, Chosay JG, Golshani A, Ganoza MC. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. *FEBS J* 2008; 275: 671-681
- Jacob U, Mack M, Clausen T, Huber R, Buckel W, Messerschmidt A. Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. *Structure* 1997; 5: 415-426

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# TMEM16A在食管鳞癌中的表达及意义

柏文霞, 施瑞华, 王建宁, 郝波, 刘伟

柏文霞, 王建宁, 南京医科大学附属江宁医院消化科 江苏省南京市 211100

施瑞华, 郝波, 刘伟, 南京医科大学附属第一医院消化科 江苏省南京市 210029

柏文霞, 在职硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 柏文霞与施瑞华对此文所作贡献均等; 此课题由柏文霞、施瑞华、王建宁及刘伟设计; 研究过程由柏文霞与施瑞华操作完成; 研究所用试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由柏文霞与郝波完成; 本论文写作由柏文霞、王建宁及刘伟完成。

通讯作者: 施瑞华, 教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学附属第一医院消化科. ruihuashi@126.com

电话: 025-52281848-82028

收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2009-04-17

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

## Expression and significance of TMEM16A in esophageal squamous cell carcinoma

Wen-Xia Bai, Rui-Hua Shi, Jian-Ning Wang, Bo Hao, Wei Liu

Wen-Xia Bai, Jian-Ning Wang, Department of Gastroenterology, the Jiangning Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 211100, Jiangsu Province, China

Rui-Hua Shi, Bo Hao, Wei Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2009-03-02 Revised: 2009-04-17

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To identify the expression of TMEM16A in esophageal squamous cell cancer (ESCC) and to explore its potential role in carcinogenesis and progression of esophageal cancer.

**METHODS:** A total of 60 cases with esophageal squamous cell carcinoma, which were cancerous tissues and their adjacent tissues, were collected at Jiangning hospital affiliated Nanjing medical university from 2007-01 to 2008-04. All tumor tissues were matched with distant tissues at least 5 cm away from cancer. Immunohistochemistry staining (SP method) and Western blot were performed to detect protein TMEM16A expression in ESCC and its corre-

sponding para-cancerous tissues.

**RESULTS:** Immunohistochemistry revealed that the positive rate of TMEM16A protein was 52.50% in carcinoma of esophagus, significantly higher than that in cancer-adjacent tissues (20%,  $P < 0.05$ ). There was significant difference in TMEM16A expression between the lymph node positive group and the lymph node negative group (65.38% vs 21.43%,  $P < 0.05$ ). The positive rates of TMEM16A protein in tumor of high, middle and low differentiation groups were 27.27%, 43.75% and 84.62%, respectively, with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). No significant association was observed between the positive expression of TMEM16A and TNM stages; we also found a higher expression of TMEM16A in ESCC than in para-cancer tissues by Western blot ( $t = 42.16$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TMEM16A may play an important role in carcinogenesis of ESCC. TMEM16A is expected to be a new significant biomarker in molecular diagnosis, gene therapy, and prognosis evaluation for ESCC.

**Key Words:** TMEM16A; Expression; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Western blot

Bai WX, Shi RH, Wang JN, Hao B, Liu W. Expression and significance of TMEM16A in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1513-1516

## 摘要

**目的:** 探讨TMEM16A在食管鳞状细胞癌发生发展中的意义。

**方法:** 2007-01/2008-04南京医科大学附属江宁医院手术切除的食管鳞癌标本60例, 均为癌组织及距癌至少5 cm远的配对癌旁组织。应用免疫组织化学SP法及Western blot法检测食管鳞癌组织及相应癌旁组织的TMEM16A蛋白表达。

**结果:** 免疫组织化学结果: 食管鳞癌组织、

## ■背景资料

在食管癌发生的早期, 有许多基因在其结构、表达及生物学功能方面发生了改变, 因此导致了细胞周期及细胞凋亡过程的异常, 如Survivin、Fas、FasL、MMP-7等。目前, TMEM16A基因在食管鳞癌研究中的报道较少。本研究选取TMEM16A作为目标基因, 应用免疫组织化学及Western blot的方法在组织水平进一步研究, 检测其与食管癌发生、发展、分化、转移等的相关性, 以便寻找与食管鳞癌相关的新的分子标志物。

## ■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

## ■研发前沿

食管鳞状细胞癌的发生与发展是一个多基因变异累计的复杂过程,涉及多种肿瘤抑制基因失活、癌基因激活和凋亡相关基因变化,并且其转移的出现对肿瘤的治疗是最棘手的问题之一。

癌旁组织中TMEM16A蛋白的表达差异具有统计学意义(52.50% vs 20.00%,  $P < 0.05$ ), TMEM16A在淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于无淋巴结转移组(65.38% vs 21.43%,  $P < 0.05$ ),不同分化程度高分化、中分化、低分化的食管鳞状细胞癌中, TMEM16A的阳性表达率分别为27.27%、43.75%和84.62%, 3者比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。TMEM16A表达与食管鳞癌的TNM分期无明显相关性; Western blot法检测发现TMEM16A在食管癌组织的表达较癌旁组织强( $t = 42.16$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** TMEM16A可能在食管癌的发生中有一定的作用,有望为食管癌的分子诊断、基因治疗和预后评估提供新的分子靶点。

**关键词:** TMEM16A; 表达; 食管鳞癌; 免疫组织化学; 蛋白免疫印迹

柏文霞, 施瑞华, 王建宁, 郝波, 刘伟. TMEM16A在食管鳞癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1513-1516  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1513.asp>

## 0 引言

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,我国是食管癌高发地区,每年因食管癌死亡患者约15万,占癌症患者死亡率近四分之一,居第2位<sup>[1]</sup>。在食管癌发生的早期,有许多基因在其结构、表达及生物学功能方面发生了改变,因此导致了细胞周期及细胞凋亡过程的异常,如Survivin、Fas、FasL、MMP-7等<sup>[2]</sup>。目前, TMEM16A基因在食管鳞癌研究中的报道较少。前期工作中,我们已应用Agilent寡核苷酸芯片对食管鳞癌发生过程中基因表达谱变化进行初步分析,比较了食管鳞癌组织与癌旁组织、癌旁组织与正常食管组织中的基因表达差异,结果发现:两组的差异表达基因,出现同向变化的上调基因38个,下调基因61个。其中, TMEM16A有显著上调表达。Real time RT-PCR结果证实芯片检测结果准确。与Carneiro *et al*<sup>[3]</sup>研究一致。以上研究的基础上,我们选取TMEM16A作为目标基因,应用免疫组织化学及Western blot的方法在组织水平进一步研究,检测其与食管癌发生、发展、分化、转移等的相关性,以便寻找与食管鳞癌相关的新的分子标志物。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本组免疫组织化学病例为2007-01/2008-02南京医科大学附属江宁医院手术切除的

食管鳞癌标本40例,均为癌组织及距癌至少5 cm远的配对癌旁组织。病例中男28例,女12例,年龄40-70(平均58.12)岁;高、中、低分化者分别为11例、16例、13例;有淋巴结转移者26例,无淋巴结转移者14例。经南京医科大学附属江宁医院病理科术后病检证实食管鳞癌诊断;肿瘤的原发灶大小、深度、淋巴结转移、分化等亦由病理确定;患者术前均未行化疗或放疗。20例Western blot病例为2008-03/2008-04南京医科大学附属江宁医院手术切除的食管鳞癌,均为癌组织及距癌至少5 cm远的配对癌旁组织。根据组织学特征,分别分离出癌组织,癌旁组织,编号、标记后置-70℃保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学检测:** 应用SP免疫组织化学检测法,40例食管癌组织及癌旁组织均经甲醛固定,石蜡包埋,4 μm厚连续切片。兔抗人TMEM16A多克隆抗体购自Abcam公司。SP免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司, TMEM16A多抗稀释倍数为1:150。DAB显色,苏木素复染。染色步骤严格按说明书进行,以PBS液代替一抗作阴性对照。

**1.2.2 免疫组织化学结果判断标准:** (1)阳性结果判断:经DAB染色后胞膜和/或细胞质呈棕黄色颗粒沉着。每例标本选5个高倍视野,根据染色程度和染色细胞百分比进行评分。(2)染色程度:基本不着色为0级;着色呈淡黄色为1级;着色呈黄色为2级;着色呈棕褐色为3级。(3)染色阳性细胞百分比:着色阳性细胞占计数细胞<5%为0级;6%-25%为1级;26%-50%为2级;超过51%为3级。将胞质染色程度分级与染色细胞百分比相乘,乘积大于4者为阳性表达,0-3者为阴性表达。

**1.2.3 Western blot法检测:** 提取组织蛋白,蛋白定量,绘制标准蛋白曲线,SDS-PAGE电泳,每个孔中加入总蛋白量40 μg,恒流,电流30 mA,待示踪剂通过浓缩胶后,改用40 mA,电泳结束后,转膜,恒压100 V,根据目的蛋白的分子质量大小设定转膜时间。封闭,转移后的PVDF膜置于含50 g/L脱脂奶粉的TBST封闭液中,室温作用1 h。将膜置于用封闭液稀释的一抗:鸡抗人TMEM16A多克隆抗体(购自Abcam公司,稀释浓度1:500)中,4℃过夜。第二天用TBST洗涤3次,每次5 min。将膜置于用含50 g/L脱脂奶粉的TBST封闭液稀释的DSE-0310辣根过氧化物酶标记兔抗鸡IgG(购自北京博尔森,稀释浓度1:5000)二抗中,37℃轻摇1 h。TBST洗涤3次,每次5 min。显色,化学法

## ■相关报道

Zheng *et al*报道 TMEM16A基因可能是离子转运蛋白家族的成员。West *et al*研究发现 TMEM16A在胃肠间质瘤的细胞表面有特异性高表达,而在其他的软组织瘤中较少表达,推测 TMEM16A可作为诊断和治疗胃肠间质瘤的指标。

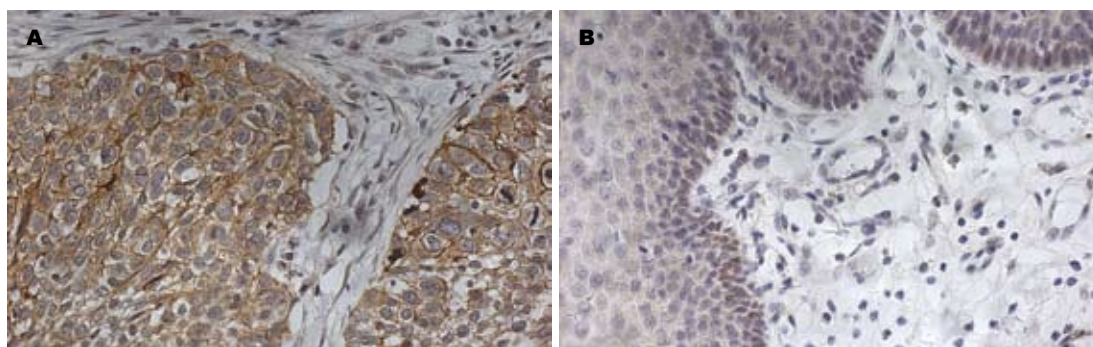


图1 TMEM16A在食管组织中的表达( $\times 200$ ). A: 鳞癌组织; B: 食管鳞癌癌旁组织.

**■应用要点**  
随着对TMEM16A基因研究的不断深入, TMEM16A基因有望为食管癌的诊断、基因治疗和预后评估提供新的分子靶点.

表1 TMEM16A表达与食管鳞状细胞癌临床病理特征关系

病理特征	<i>n</i>	阳性( <i>n</i> )	阴性( <i>n</i> )	阳性率(%)
肿瘤分化程度				
高分化	11	3	8	27.27 <sup>a</sup>
中分化	16	7	9	43.75 <sup>a</sup>
低分化	13	11	2	84.62
淋巴结转移				
有	26	17	9	65.38 <sup>c</sup>
无	14	3	11	21.43
TNM分期				
II	13	6	7	46.15
III	24	13	11	54.17
IV	3	2	1	66.67

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 低分化组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 无淋巴结转移组.

发光法显色, 以Tublin- $\alpha$ (稀释浓度为1:5000)为内参照, 观察结果.

**统计学处理** 率的比较用 $\chi^2$ 检验, 相关性检验用非参数Spearman相关处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义. 数据应用SPSS10.0进行统计, 结果以mean $\pm$ SD表示, 两均数比较采用 $t$ 检验.

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学检测结果** TMEM16A蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒样物质, 在细胞膜和或细胞质中见表达(图1A). 蛋白在食管鳞癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为52.50%(21/40), 20.00%(8/40). 食管鳞癌癌旁组织的阴性表达见图1B.

**2.2 基因TMEM16A表达与食管鳞癌临床病理特征的关系** 从表1可以看出, 不同分化程度高分化、中分化、低分化的食管鳞状细胞癌中, TMEM16A的阳性表达率分别为27.27%、43.75%和84.62%, 三者比较差异有显著性( $P < 0.05$ ), 随着分化程度的降低, TMEM16A的阳

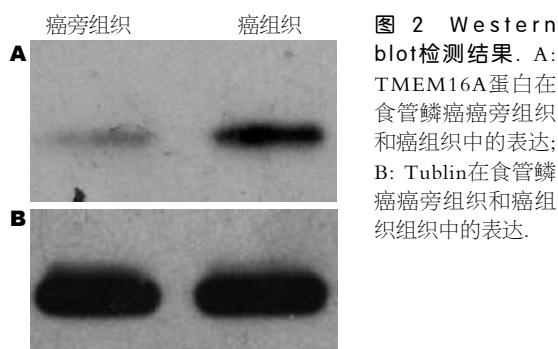


图2 Western blot检测结果. A: TMEM16A蛋白在食管鳞癌癌旁组织和癌组织中的表达; B: Tublin在食管鳞癌癌旁组织和癌组织中的表达.

性表达率升高; 有无淋巴结转移食管鳞状细胞癌中, TMEM16A的阳性表达率分别为65.38%和21.43%, 两者比较差异有显著性( $P < 0.05$ ), 有淋巴结转移的食管鳞状细胞癌组织中TMEM16A的阳性表达率高; 不同TNM分期II期、III期与IV期的食管鳞状细胞癌中, TMEM16A的阳性表达率分别为46.15%、54.17%和66.67%, 3者比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

**2.3 Western blot检测结果** Western blot检测结果显示: 在20例食管癌蛋白及相应癌旁组织蛋白中, 均见TMEM16A蛋白的表达, 其相对分子质量为114 kDa, 但TMEM16A在癌组织的表达明显高于癌旁组织, 如图2A(前个条带为癌旁组织的表达, 后个条带为癌组织的表达). 而作为内参照的Tublin的表达如图2B, 相对分子质量为: 55 kDa. 经吸光度测定, 癌旁组织组吸光度值显著低于癌组织组( $0.57 \pm 0.17$  vs  $0.96 \pm 0.15$ ,  $t = 42.16$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

TMEM16A基因, 又名TAOS2<sup>[4]</sup>, DOG1<sup>[5]</sup>, FLJ10261或ORAOV2<sup>[6]</sup>, 是TMEM家族的一员<sup>[7]</sup>, 位于人11号染色体长臂1区3带的CCND1-EMS1基因座内, 编码与C12orf3、C11orf25及FLJ34272基因产物同源的8-跨膜蛋白<sup>[8]</sup>, 所编码的蛋白功能尚未可知, 在食管癌、膀胱癌和乳腺癌中均有

# 同行评价

本研究设计基本合理,方法得当,具有一定的学术价值。

表达。TMEM16A与鼠TMEM16A基因有89.8%的同源性<sup>[9]</sup>, 11号染色体长臂1区3带的基因是人类基因组中最常被扩增的基因之一。Zheng *et al*<sup>[10]</sup>报道TMEM16A基因可能是离子转运蛋白家族的成员。West *et al*<sup>[11]</sup>研究发现TMEM16A在胃肠间质瘤的细胞表面有特异性高表达,而在其他的软组织瘤中较少表达,推测TMEM16A可作为诊断和治疗胃肠间质瘤的指标<sup>[12]</sup>。

自TMEM16A基因发现以来,引起了人们的广泛重视,取得了一些进展,但TMEM16A基因的表达调控机制、生物学功能和在肿瘤发生发展中的机制等仍不明确,这些都有待于进一步研究和探讨。随着对TMEM16A基因研究的不断深入, TMEM16A基因有望为食管癌的分子诊断、基因治疗和预后评估提供新的分子靶点。

本研究也表明, TMEM16A在食管鳞癌组织中的表达明显高于癌旁组织, TMEM16A在低分化患者的表达明显高于中分化及高分化者,推测TMEM16A蛋白可能是促进食管鳞癌发生的一个重要因素;同时还发现, TMEM16A的表达与食管癌患者淋巴结转移有密切相关,伴有淋巴结转移的食管鳞癌患者的癌组织中表达明显高于无淋巴结转移者,提示TMEM16A可能参与食管癌的淋巴结转移,为临床过程中判断患者病情预后提供一个重要的参考;但是,在我们的研究中发现, TMEM16A在食管鳞癌组织中的表达和患者的临床TNM分期无明显相关性,分析原因可能是病例选择数较少有关,或者是TMEM16A蛋白表达对食管癌血管侵袭无明显影响,还有待于进一步的临床、基础研究。由此研究可以推测TMEM16A可能对食管癌的诊断、治疗以及预后有一定的意义。

食管鳞状细胞癌的发生与发展是一个多基因变异累计的复杂过程<sup>[13]</sup>, 涉及多种肿瘤抑制基因失活、癌基因激活和凋亡相关基因变化,并且其转移的出现对肿瘤的治疗是最棘手的问题之一。肿瘤的侵袭转移是一个极其复杂的多基因调控和多步骤发展过程,涉及一系列肿瘤侵袭转移相关基因的结构或功能的异常,一些基因被激活,一些基因受抑制,而另一些基因则表现为缺失或功能失活或者相互拮抗,从而影响抗侵袭转移功能的正常发挥。我们的研究为临床取材研究,是食管癌术后标本的基因蛋白水平检测,无法完成与正常食管上皮细胞中表达

的比较研究,进一步研究我们会在动物实验中完成。

# 参考文献

- 1 Zhang H, Chen SH, Li YM. Epidemiological investigation of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1834-1835
- 2 Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J* 2005; 46: 597-613
- 3 Carneiro A, Isinger A, Karlsson A, Johansson J, Jönsson G, Bendahl PO, Falkenback D, Halvarsson B, Nilbert M. Prognostic impact of array-based genomic profiles in esophageal squamous cell cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 98
- 4 Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, McCarty KS Jr, Gollin SM. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and syntenic to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 1058-1069
- 5 Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML, van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 210-218
- 6 Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of TMEM16E and TMEM16F genes in silico. *Int J Oncol* 2004; 24: 1345-1349
- 7 Katoh M, Katoh M. GDD1 is identical to TMEM16E, a member of the TMEM16 family. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 927-928; author reply 928-929
- 8 Katoh M, Katoh M. FLJ10261 gene, located within the CCND1-EMS1 locus on human chromosome 11q13, encodes the eight-transmembrane protein homologous to C12orf3, C11orf25 and FLJ34272 gene products. *Int J Oncol* 2003; 22: 1375-1381
- 9 Rock JR, Futtner CR, Harfe BD. The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea. *Dev Biol* 2008; 321: 141-149
- 10 Zheng HC, Wang MC, Li JY, Yang XF, Sun JM, Xin Y. Expression of maspin and kai1 and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 2004; 19: 193-198
- 11 West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004; 165: 107-113
- 12 Sartor M, Steingrimsdottir H, Elamin F, Gåken J, Warnakulasuriya S, Partridge M, Thakker N, Johnson NW, Tavassoli M. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80: 79-86
- 13 Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1197-1206

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

## 兰州胃癌及异型增生组织微卫星不稳定性检测

杨永成, 周永宁, 罗冲, 郭娴, 陈静, 王学红, 芦永福

杨永成, 王学红, 芦永福, 青海大学附属医院消化科 青海省西宁市 810001

周永宁, 罗冲, 郭娴, 陈静, 兰州大学第一附属医院消化科 甘肃省兰州市 730000

杨永成, 硕士, 主治医师, 主要从事上消化系统肿瘤发生、发展及早期诊断的研究。

作者贡献分布: 本课题由杨永成与周永宁共同设计; 实验过程由杨永成、罗冲、郭娴及陈静共同完成; 数据分析、本文撰写由杨永成完成; 周永宁、王学红及芦永福在本文撰写和发表过程中给予了指导和帮助。

通讯作者: 周永宁, 730000, 甘肃省兰州市东岗西路, 兰州大学第一医院消化科, yongningzhou@sina.com

电话: 0971-6162746

收稿日期: 2008-11-24 修回日期: 2008-12-14

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-05-28

### Detection of microsatellite instability in gastric cancer and dysplasia tissue in Lanzhou province of China

Yong-Cheng Yang, Yong-Ning Zhou, Chong Luo, Xian Guo, Jing Chen, Xue-Hong Wang, Yong-Fu Lu

Yong-Cheng Yang, Xue-Hong Wang, Yong-Fu Lu, Department of Gastroenterology, the Hospital Affiliated to Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Yong-Ning Zhou, Chong Luo, Xian Guo, Jing Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Yong-Ning Zhou, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. yongningzhou@sina.com

Received: 2008-11-24 Revised: 2008-12-14

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-05-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between microsatellite instability (MSI) and the gastric cancer and its effect on carcinogenesis in Lanzhou province of China.

**METHODS:** Silver staining single strand conformation polymorphis-polymerase chain reaction (PCR-SSCP) was used to screen MSI markers at 5 loci (Bat25, Bat26, D2S123, D5S346 and D17S250) in the DNA which were all extracted from gastric cancer ( $n = 43$ ) and dysplasia ( $n = 21$ ) tissues with Phenol-Chloroform method, in the same way as corresponding normal gastric

tissues. MSI was analyzed in the gastric cancer and dysplasia.

**RESULTS:** MSI was detected in 28/43 cases of gastric cancer (65.1%) including 8 MSI-H (28.6%), and 20 MSI-L (71.4%). Six out of 21 cases were detected in dysplasia (28.6%), including 2 MSI-H (33.3%) and 4 MSI-L (66.7%).

**CONCLUSION:** The incidence of MSI in HEXI gastric cancer is very higher, probably contributive to the multistep gastric carcinogenesis. MSI may be a relatively better marker of gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; Microsatellite instability; Silver staining single strand conformation polymorphis-polymerase chain reaction

Yang YC, Zhou YN, Luo C, Guo X, Chen J, Wang XH, Lu YF. Detection of microsatellite instability in gastric cancer and dysplasia tissue in Lanzhou province of China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1517-1521

### 摘要

**目的:** 研究兰州地区胃癌与微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 的关系, 从基因组不稳定的角度探讨河西地区胃癌高发可能的发病机制。

**方法:** 采用苯酚-氯仿法分别提取43例胃癌和21例胃异型增生及相应对照组织DNA。应用银染PCR-SSCP检测技术检测Bat25、Bat26、D2S123、D5S346及D17S250微卫星位点, 并对胃癌及癌前病变组织中MSI进行分析。

**结果:** 43例胃癌患者中MSI检出28例, 检出率为65.1%。其中MSI-H为8例, MSI-L 20例, 分别为28.6%和71.4%; 21例胃异型增生组织中MSI检出6例, 检出率为28.6%。其中MSI-H 2例占33.3%; MSI-L 4例占66.7%。

**结论:** 兰州地区胃癌患者中MSI检出率很高, MSI可能是该地区胃癌高发的另一种分子致癌机制, 并可以作为胃癌诊断的一个较为敏感的标志。

### ■背景资料

多年来专家学者对甘肃省河西胃癌高发的病因做了不少实验研究和大量调研, 并提出了多种可能的原因, 但胃癌高发的因素、分子机制仍欠明确。近年来消化系统肿瘤中微卫星不稳定性发生及其可能的机制已成为研究的热点。研究兰州地区胃癌与微卫星不稳定性的关系, 从基因组不稳定的角度探讨河西地区胃癌高发可能的发病机制, 对消化系统肿瘤的诊断和预后指导产生积极的推动作用有重要的意义。

### ■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科

## ■研发前沿

日本和西方国家的检出率与国内报道的不尽相同。造成MSI检出率各不相同的原因主要是由于肿瘤组织MSI的诊断目前尚无统一标准,不同研究者所选微卫星位点的种类和数目、样本数量、MSI阳性的判断标准不同。另外,MSI的阳性率还与遗传背景以及地理区域等有关。

## ■相关报道

现代分子生物学研究表明,胃癌的发生发展是一个多因素参与的多阶段多步骤过程。他涉及一系列分子遗传学改变,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活、端粒酶活性改变等。近年来研究表明,由DNA错配修复基因缺陷引起的微卫星不稳定性在胃癌的发生发展中扮演重要角色,是继发现癌基因激活和抑癌基因失活之后的又一癌变机制。

## 关键词: 胃癌; 微卫星不稳定性; 聚合酶链式反应-单链构象多态性分析

杨永成, 周永宁, 罗冲, 郭娴, 陈静, 王学红, 芦永福. 兰州胃癌及异型增生组织微卫星不稳定性检测. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1517-1521

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1517.asp>

## 0 引言

现代分子生物学研究表明,胃癌的发生发展是一个多因素参与的多阶段多步骤过程。他涉及一系列分子遗传学改变,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活、端粒酶活性改变等。近年来研究表明,由DNA错配修复基因缺陷引起的微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)在胃癌的发生发展中扮演重要角色,是继发现癌基因激活和抑癌基因失活之后的又一癌变机制。我们采用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术,选择1998年由美国国家癌症研究院(NIH)制定并推荐在所有肿瘤中应检测包括2个单核苷酸重复序列(Bat25和Bat26)以及3个二核苷酸重复序列(D2S123, D5S346和D17S250)的5个微卫星位点<sup>[1]</sup>,对兰州地区64例胃癌及癌前病变组织中MSI进行检测并加以分析研究,进一步探讨胃癌发病机制,为早期诊断、预后及预防和提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 64例胃癌及胃异型增生新鲜组织全部来源于兰州大学第一附属医院。入选患者及健康对照人均长期生活在兰州地区达20年或以上。其中43例胃癌来自2006-03/2006-11病理科胃癌术后活检标本,21例胃异型增生组织来自同期在消化科胃镜室行胃镜检查并取活检的部分组织,全部病例均经本院病理科确诊无误。胃癌对照组取自对应患者癌组织边缘5 cm以外并由病理医生在显微镜下观察无癌细胞的组织;异型增生对照组取自相应患者正常胃黏膜组织。肿瘤分型依据WHO新分类标准(1990)。PCR扩增引物由上海生工公司订购合成,PCR试剂盒购于北京天为时代公司。PCR扩增仪(美国产,PTC-220)、垂直电泳槽(北京产,DYCZ-24D)、凝胶照相分析仪(英国产,SRNGENE-RQ2.04)。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA提取:** 采用苯酚-氯仿法分别提取43例胃癌和21例胃异型增生及相应对照组织。PCR扩增25  $\mu$ L反应体系组分: 2 $\times$ Master Mix

12.5  $\mu$ L, DNA模板1  $\mu$ L, 引物1 1  $\mu$ L, 引物2 1  $\mu$ L, 双蒸水9.5  $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C预热3 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s; 48 $^{\circ}$ C-55 $^{\circ}$ C退; 30 s 72 $^{\circ}$ C延伸1 min; 循环35次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。琼脂糖凝胶电泳,以明确PCR是否成功。

**1.2.2 SSCP:** 取上述PCR产物10  $\mu$ L加入10  $\mu$ L变性上样缓冲液(980 mL/L去离子甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.1 g/L溴酚蓝, 0.1 g/L二甲苯青), 30  $\mu$ L石蜡油,煮沸10 min,取出立即包埋于碎冰中2 min以上,再将水相全部上样于80 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶板(含50 g/L甘油,丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺之比为29:1)加样孔中。电泳条件: 室温即在20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C,电压为80 V,时间约3 h左右。银染,照相。肿瘤组织和对应正常组织DNA在同一条件下进行PCR扩增,电泳,银染。

**1.2.3 MSI阳性判断标准:** 病例组与对照组相比,电泳后出现异常条带或条带迁移为MSI阳性。高频MSI(MSI-H),即在所检测的位点中30%-40%以上不稳定;低频MSI(MSI-L),即在所检测的位点中30%-40%以下不稳定;稳定性肿瘤(MSS)为无微卫星不稳定性。

**统计学处理** 应用SPSS10.0统计软件。检出率分析采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 认为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 胃癌组织中MSI检出** 检测的5个微卫星位点(表1),MSI阳性PAG见图1。43例胃癌中表现为MSI共检出28例,检出率为65.12%。其中MSI-H为8例,检出率为18.60%,占胃癌MSI检出的28.6%;MSI-L 27例,检出率为46.51%,占胃癌MSI检出的71.4%。在胃癌中表现为MSS的为15例,检出率为34.88%(表2)。

**2.2 胃异型增生组织中MSI检出** 21例胃异型增生组织中MSI检出6例,检出率为28.6%。其中MSI-H 2例,检出率为9.5%;MSI-L 4例,为19.1%。MSS为15例,占为异型增生组织的71.4%。

**2.3 MSI与胃癌部位、分期和病理分型** 肿瘤部位: MSI-L较MSI-H更多的位于胃窦部,二者间的差别无统计学意义( $P>0.05$ )。分化程度: MSI-L与MSI-H相比,似乎MSI-L较MSI-H更趋于低分化腺癌。淋巴结转移: 尽管MSI-L胃癌患者较MSI-H患者淋巴结转移例数较多,但二者统计学无显著性差异( $P>0.05$ ,表2)。

**2.4 胃癌与胃异型增生组织DNA中MSI检出** 43例胃癌中MSI-H检出为8例(18.6%),MSI-L为20例(46.5%);异型增生中分别为2例(9.5%)和

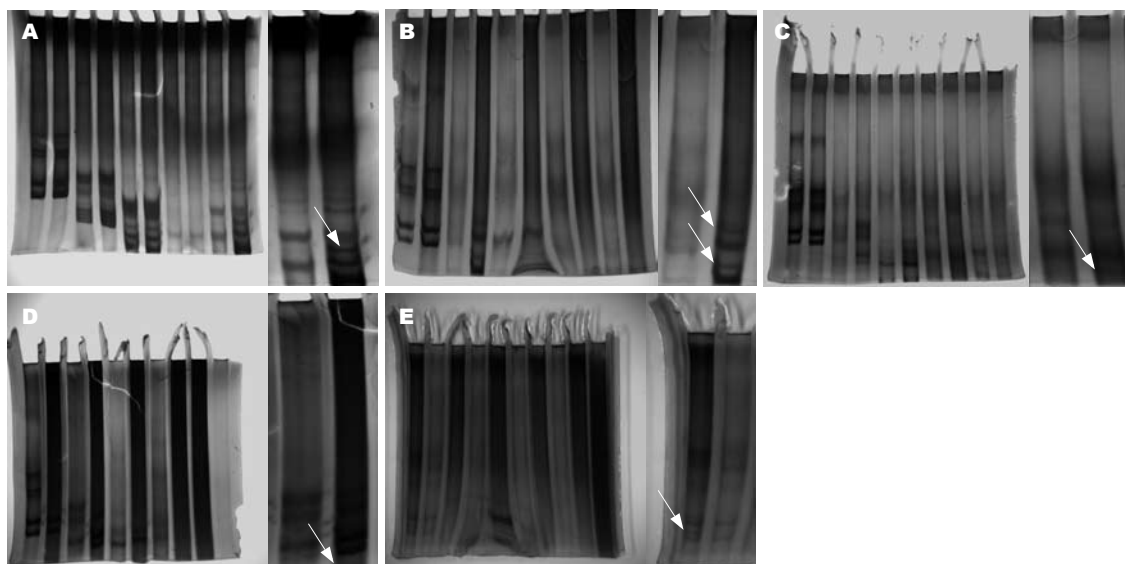


图 1 5个微卫星位点MSI阳性PAG电泳图. A: Bat25位点; B: Bat26位点; C: D5S346位点; D: D17S250位点; E: D2S123位点; 左侧为原图, 右侧为放大图.

#### ■创新盘点

本研究采用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析技术, 对兰州地区胃癌及癌前病变组织中MSI进行检测并加以分析研究, 进一步探讨了胃癌发病机制.

表 1 实验选用微卫星引物序列

微卫星位点	引物序列	扩增片段大小(bp)
Bat-25	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'	-90
	5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	
Bat-26	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'	80-100
	5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'	
D5S346	5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCG-3'	96-122
	5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	
D17S250	5'-GGAAGAATCAAATAGACAA-3'	-150
	5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'	
D2S123	5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'	197-227
	5'-GGACTTTCACCTATGGGAC-3'	

4例(19.1%), 经显著性检验, MSI-H和MSI-L在胃癌和异型增生中差异无显著性( $P>0.05$ ). MSI在胃癌和胃异型增生中检出分别为28例(65.1%)和6例(28.6%), 经检验, 二者间差异有显著性( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

微卫星(MS)是散布在人类基因组中小于10个核苷酸的简单重复序列, 又称短串连重复(short tandem repeat, STR), 一般为2-6碱基重复, 如(CA) $n$ 、(GT) $n$ 、(CAG) $n$ 等, 尤以(CA) $n$ 重复序列最为常见, 其中 $n$ 为10-60, 其长度由重复单位的拷贝数决定, 是一类呈高度多态性的遗传标志. 目前普遍认为, MS是基因重组的热点, 是基因重排和变异的来源. MS通过改变DNA结构或通过

是指由于DNA复制错误引起的简单重复序列的增加或丢失. 研究表明, 胃癌的发生涉及2条不同的基因病理途径: 其一为经典的肿瘤抑制病理途径; 另一为MSI途径. 前者包括MSI2L和MSS的多数胃癌, APC/ MCC、DCC和 $p53$ 基因等抑癌基因的LOH和突变在其发生和发展中起重要作用, 而后者则包括少数MSI-H胃癌, 由于错配修复基因异常, 导致了TGF $\beta$ R II、BAX、hMSH6等基因单核苷酸水平突变率的增加和广泛的MSI<sup>[2-3]</sup>.

本次检测中胃癌患者MSI检出率高达65.1%, 高于国内报道的30%-41.5%<sup>[4-6]</sup>和国外报道的16%-59%<sup>[7-8]</sup>. 国外报道MSI阳性检出率个别达到76.7%<sup>[9]</sup>. 在异型增生组织中MSI检出率为28.6%, 与国内同等研究条件下的报道基本一致<sup>[4-6]</sup>. 造成MSI检出率各不相同的原因主要是

#### ■应用要点

研究胃癌和癌前病变组织MSI的存在情况, 可以从基因组不稳定的角度探讨胃癌可能的发生机制. 甘肃地区胃癌患者MSI阳性检出率很高, 提示MSI参与了胃癌多步骤多阶段过程, 可能是甘肃地区胃癌高发的分子机制之一, 并可作为胃癌遗传不稳定性的一个较为敏感的检测指标.

### ■名词解释

1 微卫星(MS): 即散布在人类基因组中小于10个核苷酸的简单重复序列, 又称短串连重复(short tandem repeat, STR), 一般为2-6碱基重复, 如(CA)<sub>n</sub>、(GT)<sub>n</sub>、(CAG)<sub>n</sub>等, 尤以(CA)<sub>n</sub>重复序列最为常见, 其中n为10-60, 其长度由重复单位的拷贝数决定, 是一类呈高度多态性的遗传标志。

2 微卫星不稳定性(MSI): 是指由于DNA复制错误引起的简单重复序列的增加或丢失。肿瘤组织MSI的诊断目前尚无统一标准。

表 2 胃癌患者一般临床资料及微卫星检测结果 *n*(%)

临床资料	<i>n</i>	MSI-H	MSI-L	MSI	MSS
<b>肿瘤部位</b>					
贲门	13	3(23.1)	5(38.5)	8(61.5)	5(38.5)
胃底	2	0(0.0)	1(50.0)	1(50.0)	1(50.0)
胃体	11	3(27.3)	2(18.2)	5(45.5)	6(54.5)
胃窦	14	2(14.3)	9(64.3)	11(78.6)	3(21.4)
多部位	3	0(0.0)	3(100.0)	3(100.0)	0(0.0)
<b>分化</b>					
低分化	22	3(13.6)	13(59.1)	16(72.7)	6(27.3)
中、高分化	21	5(23.8)	7(33.3)	12(57.1)	9(42.9)
<b>淋巴结转移</b>					
无	14	3(21.4)	5(35.7)	8(57.1)	6(42.9)
有	20	3(15.0)	12(60.0)	15(75.0)	5(25.0)
转移不明	9	2(22.2)	4(44.5)	6(66.7)	3(33.3)
合计	43	8(18.6)	20(46.5)	28(65.1) <sup>a</sup>	15(34.9)

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 对比值(MSS)。

由于肿瘤组织MSI的诊断目前尚无统一标准, 不同研究者所选微卫星位点的种类和数目、样本数量、MSI阳性的判断标准不同。另外, MSI的阳性率还与遗传背景以及地理区域等有关<sup>[10]</sup>。

MSI阳性胃癌与临床病理的关系目前尚未明确。国内外均有学者<sup>[11-13]</sup>报道, 认为MSI-H与MSI-L的胃癌具有不同的临床病理特征。MSI-H胃癌多发生在胃窦部, 淋巴转移少, 预后较好。而Wirtz *et al*<sup>[14]</sup>研究表明, MSI与性别、年龄、肿瘤浸润深度、细胞分化程度、淋巴结转移、Lauren分型以及预后无关。本研究中, 虽然在数据上看似胃癌组中MSI-L患者较早倾向于淋巴结转移, 预后较MSI-H和MSS患者差; 在分化程度上MSI-L患者较MSI-H患者更多倾向于低分化; 但经过统计检验表明, MSI-H和MSI-L与胃癌患者细胞分化程度、淋巴结转移差异无显著性。同样, 在本研究中未得出MSI-H胃癌多发生在胃窦部, 淋巴转移少, 预后较好的结论。我们认为主要原因有二: 其一与本研究的样本较小有关; 其二MSI发生频率可能与地理背景有关, 即我们所取材的甘肃地区MSI发生频率可能与文献报道的其他地区存在一定的差异, 表明甘肃地区多数胃癌表现为MSI-L和MSS型, 少数则为MSI-H。胃黏膜肠上皮化生和异型增生被认为是胃癌的癌前病变, 部分胃癌的发生可能是癌前病变过程中一系列基因变异累积的结果。从肠上皮化生到胃癌的发展过程中也发现了基因不稳定的证据, 文献报道肠上皮化生组织MSI

发生率为30%-44.15%<sup>[4-6]</sup>。由于本组资料中缺少肠上皮化生病例, 所得到的结果有限, 尚需更多样本的研究加以证实。国外有人研究MSI与胃癌治疗及预后的关系, 认为MSI阳性率高的患者对顺铂化疗更为敏感, 而*p53*突变率与MSI阳性率对顺铂治疗效果差异无显著性<sup>[15]</sup>。

MSI在胃癌癌前病变组织中均有相当比例的存在, 提示在癌前病变阶段已出现基因的不稳定现象, 这是胃癌发生前的分子异常事件, 可能会成为胃癌多步骤发生过程中的起点。Piao *et al*<sup>[16]</sup>研究发现, 在散发性胃癌中重要的抑癌基因*RIZ*的MSI阳性率很高。Kashiwagi *et al*<sup>[17]</sup>对6例MSI的高分化型胃癌或胃腺瘤标本作回顾性研究, 取其1-7年前的标本, 结果发现该6例标本在慢性胃炎阶段就已经表现为MSI。作者同时报道1例肠上皮化生伴MSI的患者, 经过3年随访, 在与肠上皮化生相同的部位发现高分化腺癌。这些结果均提示MSI的出现在胃癌发生过程中发挥了重要作用, 是胃癌发生因素中的重要环节。因此, 胃黏膜癌前病变组织MSI的分析将有助于胃癌发生危险性的预测, 对伴有MSI的患者进行定期随访, 可能有助于发现早期胃癌。研究胃癌和癌前病变组织MSI的存在情况, 可以从基因组不稳定的角度探讨胃癌可能的发生机制。兰州地区胃癌患者MSI阳性检出率很高。提示MSI参与了胃癌多步骤多阶段过程, 可能是甘肃地区胃癌高发的分子机制之一, 并可作为胃癌遗传不稳定性的一个较为敏感的检测指标。

### 4 参考文献

- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257
- 周晓东, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 王东旭. 胃癌微卫星不稳定性及其临床意义. *中华医学杂志* 1997; 77: 850-851
- 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性与移码突变的关系. *中华消化杂志* 1999; 19: 385-387
- 刘平, 张小勇, 邵耘, 赵志泉. 胃黏膜异型增生组织中微卫星不稳定性检测及其意义的探讨. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 512-515
- 时俊, 林庚金, 钱立平, 关明. 胃癌及肠化生组织微卫星不稳定性研究. *中华消化杂志* 2001; 21: 680-683
- 王永信, 柯扬, 宁涛. 中国人胃癌组织微卫星DNA的不稳定性研究. *中华医学遗传学杂志* 1998; 15: 155-157
- Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura

- Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 5087-5089
- 8 Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-543
- 9 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996; 77: 1620-1627
- 10 房殿春. 胃癌发生的分子基础及防治. 中国实用内科杂志 2005; 25: 1058-1061
- 11 房殿春, 罗原辉, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳及其相关突变的研究. 中华医学杂志 1999; 79: 920-922
- 12 Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 403-411
- 13 Lawes DA, SenGupta S, Boulous PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 201-212
- 14 Wirtz HC, Müller W, Noguchi T, Scheven M, Rüschoff J, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1749-1754
- 15 Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR, Shibata D. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res* 1994; 54: 4750-4755
- 16 Piao Z, Fang W, Malkhosyan S, Kim H, Horii A, Perucho M, Huang S. Frequent frameshift mutations of RIZ in sporadic gastrointestinal and endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res* 2000; 60: 4701-4704
- 17 Kashiwagi K, Watanabe M, Ezaki T, Kanai T, Ishii H, Mukai M, Hibi T. Clinical usefulness of microsatellite instability for the prediction of gastric adenoma or adenocarcinoma in patients with chronic gastritis. *Br J Cancer* 2000; 82: 1814-1818

#### ■同行评价

本实验方法先进, 数据科学准确, 处理得当, 逻辑层次清晰, 从基因组不稳定的角度探讨了兰州地区胃癌高发可能的发病机制。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

# 中国部分汉族人群中IL-6基因启动子-572G/C多态性与HBV感染易感性的关系

戴悦, 刘晓琳, 柴庆波, 盖郁慧, 李岩, 刘宝国

## ■背景资料

目前HBV感染已被认为是由病毒本身(如病毒的基因型甚至亚型)以及宿主自身遗传因素之间的复杂的相互作用引起的。虽然病毒基因组变异及其他常规风险因素,如:年龄、性别、其他种类的肝炎病毒共感染等与HBV感染密切相关,但宿主的遗传因素在其中所起的作用受到越来越多的重视。近年来,国内有关宿主免疫相关基因的遗传多态性与HBV感染之间的关联研究已经有所开展,并取得了一些较为明确的研究结果。

戴悦, 柴庆波, 盖郁慧, 北京大学第一医院输血科 北京市 100034  
刘晓琳, 李岩, 山东省千佛山医院肿瘤免疫科 山东省济南市 250014

刘宝国, 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 北京市 100142

戴悦, 2001年北京大学医学部本科毕业, 主要从事乙型肝炎病毒学研究。

北京大学第一医院青年科研基金资助项目, No. 11161

作者贡献分布: 刘宝国负责实验的设计及文章的撰写; 戴悦和刘晓琳负责实验的主要操作完成; 柴庆波和盖郁慧负责部分标本DNA的提取; 李岩负责实验的部分指导及数据分析。

通讯作者: 刘宝国, 100142, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室. lbg29@sohu.com  
电话: 010-88196762 传真: 010-88196735

收稿日期: 2009-02-09 修回日期: 2009-04-09

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-28

## Relationship between the -572G/C polymorphism in IL-6 gene promoter and hepatitis virus B infection in Chinese Han population

Yue Dai, Xiao-Lin Liu, Qing-Bo Chai, Yu-Hui Gai, Yan Li, Bao-Guo Liu

Yue Dai, Qing-Bo Chai, Yan Li, Department of Blood Transfusion, the First Hospital Affiliated to Peking University, Beijing 100034, China

Xiao-Lin Liu, Yan Li, Department of Tumor and Immunity, Qianfushan Hospital, Jinan 250014, Shandong Province, China  
Bao-Guo Liu, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Supported by: the Youth Foundation of the First Hospital Affiliated to Peking University, No.11161

Correspondence to: Bao-Guo Liu, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, 52 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. lbg29@sohu.com  
Received: 2009-02-09 Revised: 2009-04-09

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the association of IL-6 gene promoter polymorphism with the infection of hepatitis B virus (HBV) in Chinese population.

**METHODS:** The genome DNA was obtained

from blood samples and three IL-6 promoter polymorphisms (G-174C, G-572C and G-597A) were evaluated using PCR-RFLP in 160 HBV-infected patients and 212 healthy controls. Frequencies of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the control group were compared with those of the HBV infection. Furthermore, subgroups of chronic carriers were compared among them. For cases and controls, the distribution of gender, age, smoking, drinking and Hardy-Weinberg equilibrium equation of the IL-6 genotype was determined using Chi-square Test; and the diversity of age using Mann-Whitney U-test. The unconditional Logistic regression model was used to analyze the statistical association of genotypes in two groups adjusted for confused factors.

**RESULTS:** No polymorphism at position -174 and -597 was detected in all participants, but significant difference was found in the polymorphism at position -572 between the cases and controls (G/C vs G/G, OR = 2.65,  $P < 0.05$ ; C/C vs G/G, OR = 3.31,  $P < 0.05$ ). Subgroups analysis, revealed the odds ratio value in the less than thirty years old group (G/G vs G/C or C/C, OR = 16.92,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The data reveal that the polymorphism at position -572 of the IL-6 gene promoter may be associated with the susceptibility to HBV infection; meanwhile, the age is a coordinative risk factor.

**Key Words:** Hepatitis virus B; IL-6 gene; Promoter; Polymorphism; Susceptibility

Dai Y, Liu XL, Chai QB, Gai YH, Li Y, Liu BG. Relationship between the -572G/C polymorphism in IL-6 gene promoter and hepatitis virus B infection in Chinese Han population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1522-1526

## 摘要

**目的:** 探讨中国人群中IL-6基因启动子中单核苷酸多态性与HBV感染的遗传易感性关联。

**方法:** 提取160例HBV感染者及212例健康献

## ■同行评议者

魏经国, 教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

血者外周血基因组DNA, 用PCR-RFLP方法检测两组人群中G-174C、G-572C和G-597A三个多态性位点的基因型。性别、吸烟、饮酒以及Hardy-Weinberg等采用Chi-square Test检测, 多态性与HBV感染者风险关联及亚组关联的统计学分析采用非条件Logistic回归并同时校正混杂因素。

**结果:** PCR-RFLP检测结果显示: IL-6基因启动子中G-174C和G-597A两个位点在中国人群中不存在多态性, 而G-572C处的多态性在人群中普遍存在, 其多态性位点等位基因频率分布符合Hardy-Weinberg平衡定律。统计分析表明该位点的多态性在两组人群中明显的差异(G/C vs G/G,  $OR = 2.65, P < 0.05$ ; C/C vs G/G,  $OR = 3.31, P < 0.05$ ); 亚组分析中表明<30岁的年龄组中差异显著(G/G vs G/C或C/C,  $OR = 16.92, P < 0.05$ )。

**结论:** 在中国汉族人群中, IL-6基因启动子中-572处的多态性对于乙型肝炎的发生有着显著的易患关系, 同时年龄对于这种易感关联有着协同作用。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; IL-6基因; 启动子; 多态性; 易感

戴悦, 刘晓琳, 柴庆波, 盖郁慧, 李岩, 刘宝国. 中国部分汉族人群中IL-6基因启动子-572G/C多态性与HBV感染易感性的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1522-1526  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1522.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis virus B, HBV)感染是世界性的严重公共卫生问题。全球约3.5-4.0亿人群感染HBV, 占世界总人口的5%。我国HBsAg阳性者约有1.2亿, 占总人口10%左右<sup>[1]</sup>, 每年新增3000万HBV感染者, 而这一数字目前正呈上升趋势。据统计, 全球每年约有50-120万人死于HBV感染相关性疾病, 占疾病死亡原因的第9位<sup>[2]</sup>。几十年来, 国内外科学工作者们对HBV感染的易感因素进行了广泛的流行病学调查, 目前HBV感染已被认为是由病毒本身(如病毒的基因型甚至亚型)以及宿主自身遗传因素之间的复杂的相互作用引起的<sup>[3-4]</sup>。虽然病毒基因组变异及其他常规风险因素, 如: 年龄、性别、其他种类的肝炎病毒共感染等与HBV感染密切相关, 但宿主的遗传因素在其中所起的作用受到越来越多的重视。

近年来, 国内有关宿主免疫相关基因的遗

传多态性与HBV感染之间的关联研究已经有所开展<sup>[5-10]</sup>, 并取得了一些较为明确的研究结果。本研究选择IL-6基因启动子区的3个位点: -174、-572、-597作为研究对象, 利用PCR-RFLP技术检测在中国HBV感染者及与之相匹配的正常人群中的多态性, 以期进一步了解和发现与HBV感染相关联的免疫遗传易感因素。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 用严格的流行病学病例对照研究方法。病例组选自2003-2006年在北京大学血液标本库(第一附属医院输血科)HBV感染者的DNA样本, 其中男88例, 女72例, 平均年龄 $38.92 \pm 14.88$ 岁, 共160例, 均经酶联免疫法(ELISA)确诊, 所有HBV感染者均排除甲、丙、戊型肝炎病毒感染, 诊断均符合2000年西安会议制定的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准, 并排除合并HIV及其他肝炎病毒感染、排除合并肝硬化、自身免疫性肝病、肝癌等<sup>[11]</sup>。对照组为北京大学血液标本库健康人血液DNA样本, 其中男108例, 女104例, 平均年龄 $40.26 \pm 13.21$ 岁, 共212例。同时, 收集每一例受检者一般资料及临床资料, 每一位受检对象均事先书面签署的知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA抽提:** 采用酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀法分别提取HBV感染者、健康人外周血DNA共372例, 采用玻璃奶沉淀法纯化DNA<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 多态性位点的选择及引物设:** 从文献[13] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>数据库中报道的IL-6基因启动子区多态性位点中选择了-174、-572、-597三个位点(表1)。根据检索到的IL-6基因启动子区位点相对应的基因序列, 利用Primer5.0软件, 分别设计每个位点的PCR扩增引物。引物由上海申友生物技术有限公司合成, 引物序列见表1。

**1.2.3 PCR反应体系及反应条件程序:** 扩增体系及程序如下: ddH<sub>2</sub>O 40.5  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR缓冲液(含1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>)5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, Taq酶0.5  $\mu$ L(5 U/ $\mu$ L)Promega Company, USA), 上、下游引物各1  $\mu$ L(20  $\mu$ mol/L), DNA模板1  $\mu$ L(500 ng)。扩增采用程序: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min后, 94 $^{\circ}$ C变性40 s $\rightarrow$ 退火40 s(温度参照表1),  $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 共30个循环, 然后在72 $^{\circ}$ C条件下延伸10 min。PCR产物采用Millipore公司的Multiscreen-PCR纯化板进行纯化(Millipore Company, USA)。

## ■ 研发前沿

IL-6基因启动子区-572位点多态性可以考虑为HBV感染的易感危险因素, 但该位点的多态性在HBV感染患者中的不同血清水平表达水平, 以及如何参与干预HBV病毒复制或者清除以及影响HBV感染的发生和发展的机制, 仍需进一步的研究阐明。

## ■ 相关报道

目前的研究发现 NF- $\kappa$ B、Fos/Jun 及糖皮质激素受体等转录因子与 IL-6 基因启动子区相应序列结合后,可在转录水平高度调控 IL-6 基因的表达。

表 1 IL-6 启动子区多态性位点引物及酶切条件

多肽位点	PCR 引物序列	退火温度(°C)	扩增片段(bp)	内切酶	酶切片段(bp)
-174 G→C	5'-ATGCCAAAGTGCTGAGTC-3' 5'-AATCTTTGTTGGAGGGTGAG-3'	59.6	212	<i>Nla</i> III	125+87
-572 G→C	5'-TGAAGCAGGTGAAGAAAG-3' 5'-CAAAGAGTAAAGCTGAAGTC-3'	59.8	394	<i>Bsr</i> B I	124+270
-597 G→A	5'-TGAAGCAGGTGAAGAAAG-3' 5'-CAAAGAGTAAAGCTGAAGTC-3'	60.5	394	<i>Fok</i> I	110+284

表 2 研究对象一般资料的比较

变量	病例组(%)	对照组(%)	P值
平均年龄(岁)	38.92 ± 14.88	40.26 ± 13.21	0.135 <sup>1</sup>
性别			
男	88(55.00)	108(50.94)	0.438 <sup>2</sup>
女	72(45.00)	104(49.06)	
吸烟			
否	122(76.25)	152(71.70)	0.324 <sup>2</sup>
是	38(23.75)	60(28.30)	
饮酒			
否	118(73.75)	159(75.00)	0.784 <sup>2</sup>
是	42(26.25)	53(25.00)	

<sup>1</sup>: Mann-Whitney U 检验; <sup>2</sup>:  $\chi^2$  检验。

1.2.4 RFLP 方法判断三个多态性位点的个体基因型: 所有个体 PCR 产物经纯化后, 分别采用限制性内切酶 *Nla* III、*Bsr* B I、*Fok* I (New England Biolabs Beverly, Ma, USA) 对: -174、-572、-597 三个位点进行酶切。每个反应体系 (20  $\mu$ L 反应体系含有 DNA 约 1  $\mu$ g) 加内切酶 3 U, 加相应的 10 $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, 最终加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。均在 37°C 下水浴 2 h, 然后进行琼脂糖 (Agarose-1000; Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 电泳, 根据电泳条带数判断每一个体不同位点的基因型。

**统计学处理** 以 Mann-Whitney U-t 检验比较病例组与对照组之间年龄分布的差异, 以  $\chi^2$  检验验证基因型频率是否与 Hardy-Weinberg 平衡定律。多态性与 HBV 感染风险之间的相关性以比值比 (OR 值) 及其 95% 置信区间 (confidence intervals, CI) 表示, OR 值及其 95% CI 以非条件 Logistic 回归模型计算, 均经年龄、性别、吸烟、饮酒等混杂因素校正。所有的统计检验均为双侧概率检验,  $P < 0.05$  表示具有统计学意义, 统计学分析使用 SPSS 11.5 软件 (SPSS 11.5 for Windows, Chicago, IL)。

表 3 IL-6 基因启动子区-572 位点多态性与 HBV 感染相关性

变量	病例组	对照组	P值	OR(95% CI)
G/G	7	23	—	1.00
G/C	87	116	0.034	2.65(1.08-6.53)
C/C	66	73	0.011	3.31(1.32-8.33)

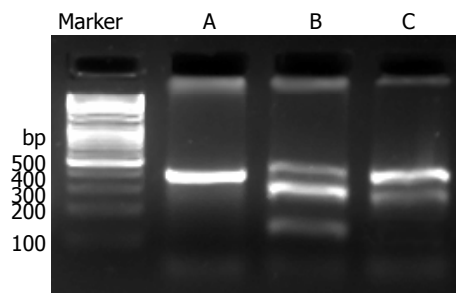


图 1 IL-6 启动子区-572 位点三种基因型酶切电泳图。A: C/C; B: G/C; C: G/G。

## 2 结果

2.1 一般资料 用 Mann-Whitney U 方法比较病例组与对照组之间年龄分布有差异 ( $P = 0.135$ ), 结果显示差异没有显著性; 在病例与对照组的研究中, 性别、吸烟、饮酒等均无统计学差异 ( $P > 0.05$ , 表 1), 两组人群之间呈现良好的匹配性 (表 2)。

2.2 IL-6 多态性的检测结果 病例组和对照组人群中三个多态性位点经 PCR-RFLP 检测后结果显示: -174 位点在我们检测的总 372 例样本中没有多态性存在, -597 位点只出现 4 例 (1.08%), -572 位点多态性出现频率较高 (图 1), 故我们对 -572 位点进行了进一步与 HBV 感染易感性的风险关联分析。

2.3 -572 位点多态性基因型频率在不同人群中的统计分析结果 160 例 HBV 病毒感染者与 212 名健康人的 IL-6 启动子区-572 位点多态性明确后, 进行三种基因型频率统计, 经检验  $P > 0.05$ , 等

表 4 IL-6基因启动子区-572位点多态性与HBV感染相关性及分层分析

变量	病例(n)		对照(n)		P值	OR(95% CI)
	G/G	G/C和C/C	G/G	G/C和C/C		
年龄(岁)						
≤30	1	53	13	49	0.011	16.92(1.91-149.94)
31-44	3	55	5	70	0.688	1.36(0.30-6.07)
≥45	3	45	6	69	0.725	1.33(0.27-6.67)
性别						
男	7	81	10	98	0.695	0.81(0.28-2.34)
女	1	71	13	91	0.895	3.03(0.75-7.19)

采用Logistic回归模型, 以基因型G/G作为参照组, 用另一个不包含的变量来进行校正。

位基因的频率分布符合Hardy-Weinberg平衡定律。-572位点多态性在正常人群与HBV病毒感染者两组间, G/C→G/G基因型频率的比较差异有显著性( $P = 0.034$ ,  $OR = 2.65$ , 95%CI 1.08-6.53), C/C→G/G基因型频率的比较差异同样有显著性( $P = 0.011$ ,  $OR = 3.31$ , 95%CI 1.32-8.33)(表3)。

2.4 -572位点多态性位点与HBV病毒感染的分层关联性分析 在-572/C位点多态性位点与HBV病毒感染的关联分析中, 我们将年龄、性别、进行了分层分析, 考虑多态性C/C基因型存在频率较低, 我们将杂和基因型G/C与纯合基因型C/C合并为一组进行统计分析。在年龄的分层比较中结果显示低年龄组中( $\leq 30$ ), 呈现了一个较强的易感性( $P = 0.011$ ,  $OR = 16.92$ , 95%CI 1.91-149.94), 而高年龄组的分层分析中差异没有显著性; 在性别的分层比较中结果显示男女各组之间差异没有显著性(表4)。

### 3 讨论

人IL-6基因位于染色体7p21上, 全长5 kb, 含4个内含子、5个外显子, 他编码由184个氨基酸构成的IL-6蛋白。IL-6目前被认为是炎症起始阶段的一个重要的相关因子, 他通过诱导多种细胞合成和分泌多种急性期蛋白, 在病毒感染时促进B淋巴细胞增殖、分化及产生免疫球蛋白, 同时促进T淋巴细胞增殖、分化等, 在病毒感染的炎症反应中扮演着十分重要的角色。目前的研究发现NF- $\kappa$ B、Fos/Jun及糖皮质激素受体等转录因子与IL-6基因启动子区相应序列结合后, 可在转录水平高度调控IL-6基因的表达<sup>[14-17]</sup>。因此IL-6基因启动子区的多态性可能会导致其个体间基因转录与表达的差异, 进而影响到个体对病毒感染疾病的易感性。

在我们的研究中发现, IL-6启动子区三个多

态性位点-174位点在检测的总372例样本中没有多态性存在, -597位点只出现4例(1.08%), -572位点多态性出现频率较高, 该3个位点的频率结果与其他国家的研究报告不一致, 体现了多态性种族差异性所在<sup>[13,18-19]</sup>。IL-6启动子区-572位点多态性3种基因型频率统计结果显示, -572位点多态性在正常人群与HBV病毒感染者间, G/C→G/G基因型频率的比较差异有显著性( $OR = 2.65$ , 95%CI 1.08-6.53); C/C→G/G基因型频率的比较差异同样有显著性( $OR = 3.31$ , 95%CI 1.32-8.33), 因此结果高度提示了该位点与HBV感染的易感风险关联。另外在分层分析的研究中, -572位点多态性在性别分组中没有明显的易感关联性( $P > 0.05$ ), 而在年龄分层的统计结果显示在低年龄组中( $\leq 30$ ), -572位点多态性对于HBV感染呈现了一个较强的易感性( $OR = 16.92$ , 95%CI 1.91-149.94), 对于高年龄组的分层分析中差异没有显著性( $P > 0.05$ )。

总之, IL-6基因启动子区-572位点多态性可以考虑为HBV感染的易感危险因素, 但该位点的多态性在HBV感染患者中的不同血清水平表达水平, 以及如何参与干预HBV病毒复制或者清除以及影响HBV感染的发生和发展的机制, 仍需进一步的研究阐明。

### 4 参考文献

- Ou DP, Yang LY, Huang GW, Tao YM, Ding X, Chang ZG. Clinical analysis of the risk factors for recurrence of HCC and its relationship with HBV. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2061-2066
- Tran TT, Martin P. Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 255-266
- Chu RH, Ma LX, Wang G, Shao LH. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4753-4757
- Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W.

### ■同行评价

本文就IL-6基因启动子-572G/C多态性与HBV感染易感性进行了探讨, 取材可信, 分组得当, 结论有新意。

- Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5721-5724
- 5 戴悦, 宁涛, 李坤, 慕素霞, 蒋明伟, 柴庆波, 盖郁慧, 汪欣. LMP2/LMP7基因多态性与人群中乙型肝炎病毒感染相关性研究. *北京大学学报医学版* 2005; 37: 508-512
- 6 李坤, 戴悦, 阴秀丽, 慕素霞, 宁涛, 曹邦伟, 徐昌青. 中国华北地区人群TAP1基因多态性与乙肝关联性的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 66-70
- 7 Xu C, Qi S, Gao L, Cui H, Liu M, Yang H, Li K, Cao B. Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and hepatitis B virus infection risk in the Chinese population. *J Clin Immunol* 2007; 27: 534-541
- 8 Qi S, Cao B, Jiang M, Xu C, Dai Y, Li K, Wang K, Ke Y, Ning T. Association of the -183 polymorphism in the IFN-gamma gene promoter with hepatitis B virus infection in the Chinese population. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 276-281
- 9 Cao B, Yang H, Ding H, Qi S, Gao L, Cui H, Dai Y, Xu C. Association analysis of hepatitis virus B infection with haplotypes of the TBX21 gene promoter region in the Chinese population. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 333-338
- 10 Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2928-2931
- 11 Ke CZ, Chen Y, Gong ZJ, Meng ZJ, Liu L, Ren ZJ, Zhou ZH. Dynamic changes of HBV DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis patients after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4061-4063
- 12 曹邦伟, 戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 汪欣. LMP2/LMP7基因编码区多态性及单倍体型与胃癌易感无相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3471-3476
- 13 Christiansen L, Bathum L, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Christensen K. Modest implication of interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 391-395
- 14 Riedemann NC, Guo RF, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, Speyer CL, Sarma JV, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 2004; 18: 370-372
- 15 Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Muller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E433-E437
- 16 Suwa T, Hogg JC, Klut ME, Hards J, van Eeden SF. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 970-976
- 17 Asensi V, Valle E, Meana A, Fierer J, Celada A, Alvarez V, Paz J, Coto E, Carton JA, Maradona JA, Dieguez A, Sarasúa J, Ocaña MG, Arribas JM. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun* 2004; 72: 3823-3828
- 18 Bennermo M, Held C, Green F, Strandberg LE, Ericsson CG, Hansson LO, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. Prognostic value of plasma interleukin-6 concentrations and the -174 G > C and -572 G > C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Atherosclerosis* 2004; 174: 157-163
- 19 Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnerio P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 255-259

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码.如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同角的数字并排,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 2009-05-28)

# 胃幽门螺杆菌检测技术进展

闫伟, 曹建彪

闫伟, 山西医科大学第二临床医学院 山西省太原市 030001  
曹建彪, 中国人民解放军北京军区总医院消化内科 北京市 100700

作者贡献分布: 本文由闫伟综述, 曹建彪审校。

通讯作者: 曹建彪, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院消化内科. dodo\_yan@163.com

电话: 010-66721168

收稿日期: 2009-03-29 修回日期: 2009-05-08

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-05-28

## Progress in detection of gastric *Helicobacter pylori* infection

Wei Yan, Jian-Biao Cao

Wei Yan, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Jian-Biao Cao, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing Command, Beijing 100700, China

Correspondence to: Jian-Biao Cao, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing Command, Beijing 100700, China. dodo\_yan@163.com

Received: 2009-03-29 Revised: 2009-05-08

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-05-28

## Abstract

Precise tests or methods are the key points to improve diagnosis of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection and to evaluate clinical therapeutic effect. According to the sampling location, these methods can be classified as: 1) those sampling from stomach, including morphological examination, bacterial culture, urease-dependent assays; and 2) other approaches, including serum test, gene analysis, *H pylori* stool antigen (*H pylori*-SA) detection, urine or saliva *H pylori* antibody detection, etc. This article reviews these methods systematically.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Diagnostic method; Detection

Yan W, Cao JB. Progress in detection of gastric *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1527-1533

## 摘要

精确的检测方法是诊断胃*H pylori*感染和评

价临床疗效的关键。按检测取材部位的不同可分为从胃内取材以及其他途径取材,前者包括微生物学方法、形态学检查、尿素酶依赖性试验,而后者包括血清免疫学、基因分子生物学检测、粪便*H pylori*抗原检测以及尿液、唾液*H pylori*抗体检测等。本文将这些方法分类介绍。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 诊断方法; 检测

闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1527-1533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1527.asp>

## 0 引言

1983年澳大利亚学者Warren和Marshall报道从人胃内成功分离出“未鉴定的弯曲状杆菌”(*Campylobacter pylori*)<sup>[1]</sup>引起医学界的广泛兴趣,并从各方面展开了深入的研究。人们在研究这种细菌的生物学特性时,曾几次易其名,直至1989年Goodwin *et al*<sup>[2]</sup>建立了螺杆菌属,才将*Campylobacter pylori*正式命名为*Helicobacter pylori*,简称*H pylori*。国内译为“幽门螺杆菌”。

针对*H pylori*的形态已有详细描述<sup>[3]</sup>。简言之,光镜下,他是一种革兰氏阴性、S形或弧形弯曲的细菌。电镜下,他是一种单极多鞭毛、末端钝圆、菌体呈螺旋形弯曲的细菌,有鞭毛、适应性的酶和蛋白,这使他能在胃腔中高酸性环境中定植和生存,*H pylori*产生的毒素和有毒作用的酶能破坏胃黏膜屏障,他还能使机体产生炎症和免疫反应,影响胃酸的分泌,最终会导致一系列疾病的形成。关于*H pylori*的致病性早在Marshall最初分离出*H pylori*时就曾预言<sup>[1]</sup>,如果Warren发现的细菌真的与胃窦炎密切相关,这种细菌可能会在消化性溃疡和胃癌发病中起一定作用。1985年Marshall报道了他本人吞服*H pylori*的实验,结果亦证实了*H pylori*为致病菌<sup>[4]</sup>。1994年国际癌症研究中心(international agency for research on cancer, IARC)将*H pylori*列为I类致癌物<sup>[5]</sup>。目前对*H pylori*的研究已进

## ■背景资料

流行病学调查显示,*H pylori*感染在世界各地均较为常见,具有很高的发病率。我国*H pylori*感染率40%-90%,平均59%,面对如此严峻的形势,要控制*H pylori*感染的流行趋势,必须要采取精确、客观的诊断方法,本文以简明扼要的语言对目前诊断*H pylori*感染的方法进行分类研究。

## ■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

## ■相关报道

国外一项关于 *H pylori* 感染率调查的分析显示 *H pylori* 感染率为 67%, 并且随着年龄的增大而增加, 女性发病率高于男性。我国及其他发展中国家属于 *H pylori* 感染的高发区。2001-2004 年由中华医学会全国 *H pylori* 分会进行的一项涉及全国 20 个省市的自然人群 *H pylori* 流行病学调查显示, 我国 *H pylori* 感染率 40%-90%, 平均 59%。

入分子生物学水平, 从 *H pylori* 的基因角度研究 *H pylori* 的定植, 毒力因子, 造成宿主的炎症与免疫反应, 影响宿主的胃酸分泌, 与宿主的胃炎、消化性溃疡、胃食管反流病、胃 MALT 淋巴瘤(gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue)以及胃肠道以外有关疾病的发生有一定的关系<sup>[6-7]</sup>。此外 *H pylori* 和非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)在胃黏膜损伤中的关系、致胃癌的发病机制以及与功能性消化不良的关系等, 众多研究结果不一致, 尚有待进一步探索。

流行病学调查显示, *H pylori* 感染在世界各地均较为常见, 具有很高的发病率。国外一项关于 *H pylori* 感染率调查的分析显示 *H pylori* 感染率为 67%, 并且随着年龄的增大而增加, 女性发病率高于男性<sup>[8]</sup>。我国及其他发展中国家属于 *H pylori* 感染的高发区。2001-2004 年由中华医学会全国 *H pylori* 分会进行的一项涉及全国 20 个省市的自然人群 *H pylori* 流行病学调查显示, 我国 *H pylori* 感染率 40%-90%, 平均 59%<sup>[9]</sup>。人是目前肯定的 *H pylori* 传染源, 虽然 *H pylori* 可以排出体外, 但传染的载体尚不清楚。

*H pylori* 的诊断技术, 按照检测创伤性的不同可分为侵入和非侵入检查 2 类。从胃部取材进行 *H pylori* 检测最直接、可靠, 包括微生物学方法、形态学检查、尿素酶依赖性试验, 此外亦尝试通过其他途径取样本进行 *H pylori* 感染的鉴定, 如: 血清免疫学、基因分子生物学检测、粪便 *H pylori* 抗原检测以及尿液、唾液 *H pylori* 抗体检测等。

## 1 微生物学方法

诊断 *H pylori* 感染, 最准确的方法是病原学检查, *H pylori* 培养成菌落后, 可用现有的各种鉴定方法进行鉴定, 其特异性可达 100%, 故常作为 *H pylori* 检测的“金标准”<sup>[10]</sup>。目前用于 *H pylori* 分离的培养基可分为 2 大类: 非选择性培养基及选择性培养基。前者常以脑心浸液琼脂、胰蛋白胨大豆琼脂及哥伦比亚琼脂为基础, 添加 5%-8% 马血清、胎牛血清或兔血清等。后者常用 Skirrow 培养基和 Dent 培养基。他们是在非选择性培养基中加入了抗菌物质, 故而优于前者, 不仅分离菌落较大, 且不易生长杂菌, 有利于提高标本中 *H pylori* 的检出率。随着对 *H pylori* 研究的深入, 各国学者发现在培养基中加入淀粉、氯化血红素、活性炭、环状糊精等添加剂对 *H pylori* 有明显的刺激生长

作用。认为这些物质可吸附培养基里的毒性物质, 促进该菌的生长。由于 *H pylori* 的培养要求具有一定的厌氧培养条件和技术, 容易污染, 给分离鉴定带来一定的困难, 作为常规诊断手段不易推广, 而且细菌培养需要一定的时间, 不利于快速诊断。但 *H pylori* 的培养分离可为临床提供有意义的资料, 如对常规 *H pylori* 根除失败需行药敏试验者选择有效抗生素<sup>[11]</sup>。值得注意的是在该项检查中有可能出现假阴性的情况, 如标本在室温中放置 3 h 以上, 培养基不新鲜或太干, 或培养基中湿度不够, 以及当 *H pylori* 变成圆球形、死亡、菌量过少或培养环境达不到 *H pylori* 生长的要求, 则常规方法难以检出。

## 2 形态学检查

2.1 胃黏膜涂片镜检 属简单的形态学检测方法, 将活检胃黏膜标本的黏膜面在干净玻片上涂抹成 0.5-1 cm 直径大小的涂片, 自然干燥, Gram 染色油镜下观察涂片的细菌形态和数量, 观察有无典型的弯曲形或螺旋形细菌, 可迅速确定有无 *H pylori* 感染和胃内的菌群及炎症细胞渗出情况。Piccolomini *et al*<sup>[12]</sup>报道了用 Leifson 鞭毛染色法诊断 *H pylori* 感染, 用 Leifson 鞣酸-品红染色法来做胃活检标本印片细胞学检查, 以显 *H pylori* 的鞭毛, 并与组织学检查、快速尿素酶试验和细菌培养等法进行比较。Leifson 染色法 15 min 可完成, 其特异性和敏感性与其他查方法无显著差异 ( $P>0.05$ ), 并且印片细胞学标本还可进一步作组织学检查或 *H pylori* 培养。因此, Leifson 染色法具有快速、敏感、可作回顾性分析等优点, 是一种非常有益的侵入性试验方法。由于涂片是将 *H pylori* 主要定植部位的黏液进行观察, 阳性率很高, 且对治疗后残留少量的 *H pylori* (非形态变异者) 即使 UAT(-) 也可作出诊断, 因此是经济、准确和较快速的诊断方法, 适合行胃镜检查而未开展 RUT 的单位进行。

2.2 组织病理切片染色 该法是把患者胃镜检查活检组织切片, 染色后可观察到组织中的 *H pylori* 菌体。因 *H pylori* 对胃窦黏膜有相对的定植特异性(定植密度较高), 因此多从胃窦取材, 但该菌在胃内其他部位的分布频度差异不显著(肠上皮化生区除外), 因此对于胃镜下取材的部位和数目, 除胃窦外欧美多主张加取胃体标本<sup>[13]</sup>。悉尼系统规定这 2 个部位各取 2 块组织, 日本医科大学等单位则主张胃窦、角、体 3 点取材。国内王继德 *et al*<sup>[14]</sup>的研究则主张, 在初诊患者胃窦单点

取材已经足以诊断96.2%的阳性者,如单纯诊断*H pylori*感染,为避免对患者造成更大的创伤,不应推荐多部位多数量取材。此外,应用抑酸剂特别是泵抑制剂治疗后,可能由于胃内生态环境发生了改变,未根除的*H pylori*可从胃窦向胃体部迁移(migration),此时进行治疗效果的评价时,需同时从胃体部取材检查,而在初诊患者如果需要了解组织学病变的范围(如萎缩性胃炎),多点取材也是需要的<sup>[13]</sup>。

近年来应用于*H pylori*检测染色法的如下:最早由Warshal发明的Warthin-Starry银染色,以及革兰氏染色法、Giemsa染色法、苏木精-伊红染色法、丫啶橙染色法等。目前以Warrhin-Starry银染色效果最佳,细菌清晰易辨,但费时且需一定技术;改良Giemsa和甲苯胺兰染色较简便,效果也较好,临床中常用;其他方法还有碳酸复红染色、Gimenz染色等;HE染色尽管不具特异性,当菌量较多时,也可凭借*H pylori*的形态及其在胃黏膜的分布特征对所有病例做出诊断,即可供组织学诊断之用。组织学诊断*H pylori*的优点是可以同时进行胃黏膜的病理学诊断且特异性和敏感性均较高,分别为89%-100%和90%-99%<sup>[15]</sup>。

### 3 尿素酶依赖性试验

3.1 RUT *H pylori*能够产生大量的尿素酶,分解胃液中的微量尿素引起酸碱度的变化,产生CO<sub>2</sub>,使局部的pH值升高,中和胃酸,便于细菌定植致病,根据这一发现,Marshall *et al*设计了RUT,用于胃镜检查中诊断*H pylori*感染,他属于侵入性检测方法之一。在检查时,可分别在不同部位取材(包括幽门前胃窦大弯、胃角、中部胃体大弯等)进行快速试验,其结果特异性可达100%,阳性组在胃角可达100%,幽门前胃窦、胃大弯可达87%,胃体可达84.4%,胃角和幽门前胃窦部尿素酶阳性反应出现时间较胃体时间短<sup>[16]</sup>。但也有研究表明,标本中必须含有10<sup>4</sup>以上的*H pylori*才能显示阳性,而标本的大小、反应时间的长短、环境温度的高低等因素均可影响试验结果。Arvind *et al*<sup>[17]</sup>于1988年报道了1 min尿素酶试验:即用无离子水配制100%的尿素溶液,分装在小管内,每管为1 mL加入1%的酚红2滴, pH6.8, 1 min看结果,未见假阴性,敏感性为91%。由于反应时间短,避免了产生尿素酶的污染菌繁殖所致的假阳性,但Montes *et al*<sup>[18]</sup>的研究则认为采用RUT检测*H pylori*时不能过分追求缩短检测时

间,否则会引起假阳性结果的大量增加。该法检测*H pylori*中应该注意的是,在胃内有活动性出血时,因出血造成胃内pH值的变化,可影响尿素酶试验的敏感性和特异性<sup>[19]</sup>。目前RUT已有许多方面的改进,如应用pH敏感化学感受检测器后敏感性和特异性分别达92%和95%<sup>[20]</sup>。

3.2 尿素呼气试验 1986年由美国Garham和Klein博士首先报道,原理是*H pylori*在体内产生尿素酶,因此若给感染*H pylori*的患者口服同位素标记的尿素溶液,则尿素分解后产生的同位素CO<sub>2</sub>从肺呼出,可收集呼气标本,用液体闪烁计数器或用气体同位素质谱仪检测同位素CO<sub>2</sub>的量。根据标志物不同分为<sup>13</sup>C呼吸试验及<sup>14</sup>C呼吸试验。此项检测目前被认为是除培养之外诊断*H pylori*感染的“金标准”,临床应用广泛,不需做内镜取标本,技术要求低,缺点是费用高,<sup>13</sup>C-UBT优点在于:(1)采用的高精度气体同位素比值质谱仪分析精度可达十万分之一,准确性高;(2)反应是“全胃”的“实时”状态,敏感性和特异性均超过95%,在中国和欧洲的*H pylori*共识意见中,该方法被首选推荐为确诊*H pylori*现症感染及判断*H pylori*根除的非侵入性方法;(3)操作简便快速,自动化程度高,30 min即可得出结果;(4)<sup>13</sup>C为稳定性同位素,适合于各年龄的受试者;(5)呼气样品采用特制气体收集瓶收集,可通过邮寄该瓶对无此设备的其他地区患者进行*H pylori*检测。因此<sup>13</sup>C-UBT在1996年通过美国食品药品监督管理局(FDA)评审后,便很快广泛应用于临床对*H pylori*感染的诊断。缺点在于该检查受到诸如药物、上消化道出血、胃内其他杂菌(如人海尔曼螺杆菌等)的影响而可能出现假阳性和假阴性的结果,且检查需要大型质谱仪和试剂较昂贵,因此很大程度限制了在基层医院的开展;<sup>14</sup>C尿素呼气试验价格低廉,但试验具有放射性,且半衰期很长,尽管放射性较低,做一次呼气试验接受的放射剂量只相当于一次胸部X线拍片的1/60,但大规模应用可对环境造成污染,此外该方法对孕妇、儿童及活动性胃出血者慎用。我国陈洁平 *et al*<sup>[21]</sup>首创用胶囊微量法(microdose capsule based <sup>14</sup>C-UBT)通过与金标准(细菌培养和/或病理组织学检查结果)对比结果可靠,其敏感性可达97.06%,特异性为95.12%,阳性预测值为97.06%,阴性预测值为97.12%。

3.3 <sup>15</sup>N-尿素排出试验 该方法是由我国吴继琮 *et al*<sup>[22]</sup>首创并应用于临床的。其原理基本与标记

#### ■创新盘点

本文创新之处在于*H pylori*的检测方法按取材部位的不同进行分类,可分为从胃内取材包括:微生物学方法、形态学检查、尿素酶依赖性试验,以及其他途径取样本进行*H pylori*感染的检测,如:血清免疫学、基因分子生物学检测、粪便*H pylori*抗原检测以及尿液、唾液*H pylori*抗体检测等。

## ■应用要点

本文作者认为 *H pylori*-SA 因其独特的优点是目下较为理想的非侵入性 *H pylori* 现症感染诊断方法, 该法操作简便, 省时, 具有很高的准确性, 而其费用却明显低于  $^{13}\text{C}$ -呼气试验, 此外尿素呼气试验在有胃部分切除史的患者中准确性有限, 而 *H pylori*-SA 试验则不受影响; 尿素呼气试验需被检者配合, 年幼儿童可能会有困难, 而 *H pylori*-SA 试验仅需收集粪便标本, 故在 *H pylori* 感染的流行病学调查、儿童检测消化不良, 或内镜检查前筛查, 治疗后复诊等诸多方面具有较好的应用价值。

碳的  $\text{CO}_2$  呼气试验相同, 即测试者口服  $^{15}\text{N}$ -尿素, 在胃中经尿素酶作用分解成标记的  $^{15}\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ , 经消化系吸收进入血液循环, 而  $^{15}\text{NH}_3$  标记的氮经机体氮代谢变为氨或尿素后由肾脏排除, 利用色谱联用仪检测。该方法也是一种无创性检查, 无放射性污染, 具有较高的敏感性与特异性, 但仪器昂贵, 尚未得到普及推广。

## 4 其他途径检测 *H pylori* 感染

### 4.1 血清免疫学

4.1.1 *H pylori* 抗原/抗体的检测: *H pylori* 菌体表面存在多种抗原组分如尿素酶、脂多糖、黏附素等, 这些抗原均可刺激宿主产生免疫反应, 产生 IgG、IgA、IgM 抗体, 血清学主要检测的是可长期存在于血清中的 IgG。ELISA 法是目前最常用的定性或定量检测血清中 *H pylori* 抗体 IgG 的方法。其他方法包括: (1) 疫色层法-库力斯伯法 (Flexpack TM *H pylori*), 该法是根据反向免疫色层法原理, 快速、定性测定血清 *H pylori*-IgG 抗体, 无需专门设备或仪器, 与组织学检查对照, 其敏感性为 94.68%, 特异性为 89.04%, 符合度为 92.22%<sup>[23]</sup>。(2) 血清学可溶性 *H pylori* 抗原检测, 当 *H pylori* 感染人体后, *H pylori* 可释放可溶性抗原 (S-*H pylori*), 并出现于循环外周血中。因此, 检测 S-*H pylori* 可用于 *H pylori* 的诊断。该方法先采用超速离心和凝胶过滤等技术纯化 *H pylori* 外膜蛋白, 获得抗膜蛋白抗体, 然后对受试者血清行双抗体夹心法测定血清中 S-*H pylori*, 其突出的优点是血清不用稀释, 操作简便, 成本低廉。(3) 斑点金免疫渗透试验 (DIGFA) 与 Western 印迹法也较常见, Western 印迹法可作为血清学方法的补充试验, 对 ELISA 结果有疑问的儿童病例更为适用。此外 *H pylori* 阴性者血中也可存在交叉反应性抗体 (如空肠弯曲菌感染), 且 *H pylori* 根除后血中抗体在一段时间内仍维持在阳性水平, 故血抗 *H pylori*-IgG 测定的结果不能准确反映出受检者当时 *H pylori* 感染的情况。因此血清学抗体的检测主要用于易感人群的筛查以及流行病学调查。

4.1.2 N-乙酰神经氨酸结合凝集素 (NLBH) 抗体的检测: Evans *et al*<sup>[24]</sup> 从 *H pylori* 中提纯 NLBH, 经证实无脲酶活性。以此为抗原, 行 ELISA 检测 NLBH 抗体, 结果得特异性 88.3%, 敏感性 75%, 消化性溃疡患者 81.5% 可检出 NLBH 抗体。故 NLBH 抗体的检测有可能作为溃疡活动性的指标。

## 4.2 基因分子生物学

4.2.1 单一-PCR: Hoshina *et al*<sup>[25]</sup> 首先将聚合酶链反应 (PCR) 技术用于 *H pylori* 的诊断。PCR 技术明显提高了 *H pylori* 诊断的敏感性 (可检出相当于 100 个细菌细胞) 和特异性, 且对原材料的要求低, 除新鲜活检标本外, 可检测唾液、胃液, 石蜡包埋和已做过快速尿素酶试验的标本也可应用, 并可对粪便和环境中的 *H pylori* DNA 进行检测。部分 *H pylori* 基因的核酸序列已经明确, 以此为基础设计 PCR 引物可进行 *H pylori* 的基因检测, 常用的引物来自尿素酶基因 (*ureA*)、16srRNA 基因、23srRNA 基因、磷酸葡萄糖氨基转移酶 (*ureC*) 基因、细胞毒素相关基因 (*CagA*) 等, 其中前两种应用最为广泛, 目前 PCR 仪、引物皆已商品化, 能进行大规模推广, 应用于检验及流行病学调查。但这也存在着一个问题, 即已被抗生素杀死而仍存留胃中的 *H pylori* DNA, 也会被扩增出现阳性结果。故 PCR 不宜用来判断治疗的短期效果。

4.2.2 套式-PCR (Nested-PCR): 采用 Nested-PCR 进行 2 次扩增, 既提高了检测的灵敏度, 又可避免粪便标本 *H pylori* 检测的假阴性<sup>[26]</sup>。Gramley *et al*<sup>[27]</sup> 选取 *H pylori* 16SrRNA 基因的 2 对引物对粪便标本进行两次扩增, 检测到少于 10 fg (相当于 7 个细菌)/mL 的 *H pylori* DNA, 敏感性和特异性分别达 73% 和 100%。

4.2.3 逆转录-PCR (RT-PCR): 以 *H pylori* 的 RNA 为模板, 在逆转录酶的作用下, 合成 DNA 进行 PCR 扩增。其作用主要是用于科研检测 RNA 水平的活性。

4.2.4 寡核苷酸探针杂交: 根据 *H pylori* 基因特异序列, 合成 10-20 bp 寡核苷酸, 对一端行同位素、生物素或地高辛标记。在常规制备的石蜡切片上通过免疫 DNA 杂交、同位素标记的放射自显影或生物素及地高辛标记的显色系统, 确定有无与探针互补的特异序列的存在, 以进行 *H pylori* 的流行病学调查和鉴定。但该法烦琐费时临床应用较少<sup>[28]</sup>。

4.3 粪便 *H pylori* 抗原检测 (*H pylori*-SA) *H pylori* 粪便抗原检测试验 (*H pylori*-SA), 是一种非侵入性诊断方法。由于 *H pylori* 定居于胃上皮细胞表面, 而胃上皮细胞更新很快, 在其更新的过程中, 定植于上皮细胞表面的 *H pylori* 随细胞脱落, 经过肠道随粪便排出体外, 故理论上可以用抗 *H pylori* 抗体的酶联免疫方法检测到 *H pylori*-SA。美国胃肠病周会议摘要首先报道了 *H pylori*-SA 检测方

法,敏感性和特异性均在90%以上<sup>[29]</sup>,此外另有研究报道,*H pylori*粪便抗原检测试验的敏感度为90.0%-98.2%,特异度为75.0%-100%<sup>[30-31]</sup>。

*H pylori*粪便抗原检测试验采用酶联免疫分析双抗体夹心法,能够特异性诊断人体内*H pylori*感染。首先用*H pylori*抗原免疫家兔,获得兔抗*H pylori*抗血清,再由纯化的抗血清取得抗*H pylori*多克隆抗体,利用氧化法将辣根或山葵过氧化物酶标记于兔抗*H pylori*多克隆抗体上,最后把抗体进行包被封闭,即可用于检测。粪便标本可在2℃-8℃贮存3 d或无限期贮存于-20℃。通过贮存可1次检测在数天或数周内收集的多个标本,从而使费用降低,并可供今后进一步分析。

*H pylori*-SA是较理想的非侵入性*H pylori*诊断方法,操作简便,省时,不需昂贵仪器,在*H pylori*感染的流行病学调查、儿童检测消化不良,或内镜检查前筛查,治疗后复诊等诸多方面具有较好的应用价值,尤其适用于婴幼儿*H pylori*感染的检测,并可作为远期根治疗效的评价指标<sup>[32]</sup>。但值得注意的是由于本方法检测的是粪便中*H pylori*抗原,当患者进行*H pylori*根除治疗后,即便患者的*H pylori*已经被根除,但在治疗结束4 wk时约有6%的患者粪便中仍然有可能被检测出*H pylori*抗原,从而导致假阳性的结果,如果在采用本法进行疗效判断时,让患者在治疗结束后6-8 wk进行检测,则可以明显降低试验的假阳性率<sup>[33]</sup>。此外,这一试验还可能具有一些独特的优点,如*H pylori*-SA检测法具有很高的准确性,而其费用却明显低于<sup>13</sup>C-呼气试验,此外尿素呼气试验在有胃部分切除史的患者中准确性有限,而*H pylori*-SA试验则不受影响;尿素呼气试验需被检者配合,年幼儿童可能会有困难,而*H pylori*-SA试验仅需收集粪便标本。

**4.4 尿液抗*H pylori*抗体检测** 1993年Alemohammad *et al*<sup>[34]</sup>首次报道306例尿液抗*H pylori*抗体检测的敏感性和特异性分别为95.9%和90%,证实他的有用性。Leodtler *et al*<sup>[35]</sup>为评价尿抗体ELISA法和相近患者尿试验诊断感染的作用,在4个欧洲国家5个中心收集了449例(女240例、男209例,平均年龄54岁未做过抗*H pylori*感染治疗的消化不良患者的尿液标本,用IgG ELISA(Pyloriset-EIA-GI II)、全血试验(Py-loriset-Screen)和<sup>13</sup>C]尿素呼气试验进行比较,结果URINELISA和RAPIRUN的敏感性分别为90%、82%,特异性分别为68%、83%,其准确性与血清学试验一

致。URINELISA法诊断儿童*H pylori*感染具有快速、费用低、可靠性强、容易操作的特点,而且对儿童群体大规模流行病学筛查有价值<sup>[36]</sup>。

**4.5 唾液抗*H pylori*抗体检测** 长期以来多数学者认为胃部是*H pylori*的主要储存地,胃黏膜、上皮、胃液、胃的反流物及胃炎患者甚至婴幼儿的呕吐物、粪便中均检测出了*H pylori*的存在。1983年Krajden *et al*<sup>[37]</sup>首次从胃炎患者的牙菌斑中分离培养出*H pylori*,并推测口腔可能是*H pylori*在人体的另一个聚集地。从此,口腔内*H pylori*的研究也逐渐成为热点问题。1993年,Ferguson *et al*<sup>[38]</sup>首次从9例胃炎患者的唾液培养出1例具有生存能力的*H pylori*,次年Patel *et al*亦报道了唾液中的抗*H pylori* IgG与血清抗*H pylori* IgG一致性达91%,有良好正相关性,可正确判断患者感染*H pylori*情况<sup>[39]</sup>。此外,值得一提的是,关于口腔*H pylori*的来源,有人认为是通过胃食管反流使*H pylori*逆行到达口腔,也有人认为*H pylori*是先到达口腔定居,在适当的时候进入胃黏膜<sup>[40]</sup>,对此尚有待进一步的探讨。

## 5 结论

*H pylori*的检测有很多种方法,各有优缺点。临床应用上,一般主张血清学、粪便*H pylori*抗原、尿液以及唾液*H pylori*抗体检测可作为筛查以及流行病学调查手段,尿素酶试验作为快速诊断,活检组织检查和细菌培养作为确诊方法,由于耐药菌株的增加,培养与药敏显得尤为重要,粪便*H pylori*抗原检测和<sup>13</sup>C呼气试验用于确定经治疗后*H pylori*是否根除。为了提高阳性率和准确性,最好能同时使用几种检查方法,取长补短。随着医学研究的不断深入,*H pylori*的检测方法必将不断取得突破性进展。

## 6 参考文献

- 1 Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-1275
- 2 Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transer of campylobacter pylori and campylobacter mustelae to Helicobacter gen.nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405
- 3 Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of Helicobacter pylori. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 5-19
- 4 Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. *Med J Aust* 1985; 142: 436-439
- 5 IARC monographs on the evaluation of

## ■名词解释

胶囊微量法: 将<sup>14</sup>C-尿素从一般用量10 μCi、5 μCi减少至1 μCi, 不仅减少了患者同位素负荷, 且价廉、简便, 消除了口腔尿素酶干扰, 还减少了环境污染的可能性。

## ■同行评价

本文内容全面,参考文献引用合理,具有很好的可读性。

- 6 Grande M, Cadeddu F, Villa M, Attinà GM, Muzi MG, Nigro C, Rulli F, Farinon AM. Helicobacter pylori and gastroesophageal reflux disease. *World J Surg Oncol* 2008; 6: 74
- 7 Chlumská A, Boudová L, Benes Z, Zámecník M. Histopathologic changes in gastroesophageal reflux disease. A study of 126 bioptic and autoptic cases. *Cesk Patol* 2007; 43: 142-147
- 8 Marie MA. Seroprevalence of Helicobacter pylori Infection in Large Series of Patients in an Urban Area of Saudi Arabia. *Korean J Gastroenterol* 2008; 52: 226-229
- 9 高文, 胡伏莲. 中华医学会第4次全国幽门螺杆菌学术会议报道. 中华医学信息导报 2005; 20: 9
- 10 Jaup BH, Stenquist B, Brandberg A. Helicobacter pylori culture from a positive, liquid-based urease test for routine clinical use: a cost-effective approach. *Helicobacter* 2000; 5: 22-23
- 11 中华医学会消化病学分会. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告. 胃肠病学 2008; 13: 42-46
- 12 Piccolomini R, Di Bonaventura G, Neri M, Di Girolamo A, Catamo G, Pizzigallo E. Usefulness of Leifson staining method in diagnosis of Helicobacter pylori infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 199-201
- 13 Morris A, Ali MR, Brown P, Lane M, Patton K. Campylobacter pylori infection in biopsy specimens of gastric antrum: laboratory diagnosis and estimation of sampling error. *J Clin Pathol* 1989; 42: 727-732
- 14 王继德, 陈烨, 徐克强, 张亚历, 孙勇, 朱建新, 周殿元. 幽门螺杆菌感染几种诊断方法的准确性评价. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 248-249
- 15 Madan E, Kemp J, Westblom TU, Subik M, Sexton S, Cook J. Evaluation of staining methods for identifying Campylobacter pylori. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 450-453
- 16 Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Lapertosa G, Ceppa P, Vigneri S, Mele MR, Mansi C, Tracci D, Bisso G, Celle G. 24-hour gastric pH and extent of duodenal gastric metaplasia in Helicobacter pylori-positive patients. *Gastroenterology* 1997; 113: 741-745
- 17 Arvind AS, Cook RS, Tabaqchali S, Farthing MJ. One-minute endoscopy room test for Campylobacter pylori. *Lancet* 1988; 1: 704
- 18 Montes H, Salmen S, Dolfo W, Sotolongo A, Petrosino P, Donis J, Berrueta L. Evaluation of a liquid urease test (LUT) for detection of Helicobacter pylori. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2003; 33: 73-76
- 19 Lee JM, Breslin NP, Fallon C, O'Morain CA. Rapid urease tests lack sensitivity in Helicobacter pylori diagnosis when peptic ulcer disease presents with bleeding. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1166-1170
- 20 Sato T, Fujino MA, Kojima Y, Ohtsuka H, Ohtaka M, Kubo K, Nakamura T, Morozumi A, Nakamura M, Hosaka H. Endoscopic urease sensor system for detecting Helicobacter pylori on gastric mucosa. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 32-38
- 21 陈洁平, 徐采朴, 程绍钧, 徐启旺, 柳凤轩, 王振华, 房殿春, 高晋华. 胶囊微量法<sup>14</sup>C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染. 第三军医大学学报 1997; 19: 317-320
- 22 Wu JC, Liu GL, Zhang ZH, Mou YL, Chen QA, Wu JC, Yang SL. 15NH<sub>4</sub><sup>+</sup> excretion test: a new method for detection of Helicobacter pylori infection. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 181-184
- 23 邓会芬, 何绍滔, 叶玉清. 快速免疫层析法—库力斯伯法测定血清幽门螺杆菌抗体(附167例检测结果). 新医学 1998; 29: 518-519
- 24 Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ Jr, Graham DY, Lee CH. Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of Helicobacter pylori. *J Bacteriol* 1993; 175: 674-683
- 25 Hoshina S, Kahn SM, Jiang W, Green PH, Neu HC, Chin N, Morotomi M, LoGerfo P, Weinstein IB. Direct detection and amplification of Helicobacter pylori ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 473-479
- 26 Bamford KB, Lutton DA, O'Loughlin B, Coulter WA, Collins JS. Nested primers improve sensitivity in the detection of Helicobacter pylori by the polymerase chain reaction. *J Infect* 1998; 36: 105-110
- 27 Gramley WA, Asghar A, Frierson HF Jr, Powell SM. Detection of Helicobacter pylori DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2236-2240
- 28 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌感染诊断方法的评价与诊断标准. 中华全科医师杂志 2004; 3: 351-353
- 29 Trevisani L, Sartori S, Galvani F, Rossi MR, Ruina M, Chiamenti C, Caselli M. Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting Helicobacter pylori in feces: a prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1830-1833
- 30 Tanaka A, Watanabe K, Tokunaga K, Hoshiya S, Imase K, Sugano H, Shingaki M, Kai A, Itoh T, Ishida H, Takahashi S. Evaluation of Helicobacter pylori stool antigen test before and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 732-738
- 31 Tanaka A, Takahashi S. [Helicobacter pylori stool antigen test] *Nippon Rinsho* 2004; 62: 464-469
- 32 Metz DC. Stool testing for Helicobacter pylori infection: yet another noninvasive alternative. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 546-548
- 33 Vaira D, Vakil N, Menegatti M, van't Hoff B, Ricci C, Gatta L, Gasbarrini G, Quina M, Pajares Garcia JM, van Der Ende A, van Der Hulst R, Anti M, Duarte C, Gisbert JP, Miglioli M, Tytgat G. The stool antigen test for detection of Helicobacter pylori after eradication therapy. *Ann Intern Med* 2002; 136: 280-287
- 34 Alemohammad MM, Foley TJ, Cohen H. Detection of immunoglobulin G antibodies to Helicobacter pylori in urine by an enzyme immunoassay method. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2174-2177
- 35 Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, Schütze K, Hirschl A, Mégraud F, Malfertheiner P. European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of Helicobacter pylori antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 927-931
- 36 Okuda M, Nakazawa T, Booka M, Miyashiro E, Yosikawa N. Evaluation of a urine antibody test for Helicobacter pylori in Japanese children. *J Pediatr* 2004; 144: 196-199
- 37 Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, Babida C, Karmali M, Penner JL. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for Campylobacter pylori. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1397-1398
- 38 Ferguson DA Jr, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi

- DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2802-2804
- 39 Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Molineaux N, Levy J, Maxwell JD, Northfield TC. Salivary antibodies to *Helicobacter pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. *Lancet* 1994; 344: 511-512
- 40 Oshowo A, Gillam D, Botha A, Tunio M, Holton J, Boulous P, Hobsley M. *Helicobacter pylori*: the mouth, stomach, and gut axis. *Ann Periodontol* 1998; 3: 276-280

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 2007 年内科类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心衰失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

# 瘦素抵抗与胰岛素抵抗

张莉, 柳涛, 郑培永, 季光

## ■背景资料

代谢性疾病的发病率逐年升高,但其机制尚未明确,从而给疾病的防治带来了很大困难。瘦素与胰岛素是调节能量代谢的主要激素,胰岛素抵抗和瘦素抵抗在多个层次、多个环节引发代谢紊乱,成为代谢性疾病的共同病理基础。

张莉, 柳涛, 郑培永, 季光, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032  
国家自然科学基金资助项目, No. 30772802, No. 30872360  
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET 07-0563  
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305  
作者贡献分布: 本综述由张莉、柳涛及郑培永完成, 季光审校。  
通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科。  
jiliver@vip.sina.com  
电话: 021-51322045 传真: 021-64286261  
收稿日期: 2009-03-01 修回日期: 2009-03-30  
接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-28

## Leptin resistance and insulin resistance

Li Zhang, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Guang Ji

Li Zhang, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Guang Ji, Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772802, No. 30872360; the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET-07585; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305

Correspondence to: Guang Ji, Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2009-03-01 Revised: 2009-03-30

Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-28

## Abstract

Leptin resistance and insulin resistance are the common pathology of various metabolic diseases, and make great contribution to the metabolic syndrome. Many researches have proved that the two processes affected each other, whereas the exploration of the resistance mechanism was often independently carried out. Here, we'd like to make a review focusing on the relationship between leptin resistance and insulin resistance, and their interactions at multiple levels.

Key Words: Leptin resistance; Insulin resistance; Signaling; Molecule

Zhang L, Liu T, Zheng PY, Ji G. Leptin resistance and insulin resistance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1534-1539

## 摘要

胰岛素抵抗和瘦素抵抗是多种代谢性疾病共同的病理基础,是引起机体能量代谢紊乱的重要因素。多项研究发现两者存在交互影响,但对胰岛素抵抗和瘦素抵抗的探索多是独立进行。本文拟从两者在多个水平、多个环节的相互作用作一综述。

关键词: 瘦素抵抗; 胰岛素抵抗; 信号; 分子

张莉, 柳涛, 郑培永, 季光. 瘦素抵抗与胰岛素抵抗. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1534-1539

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1534.asp>

## 0 引言

瘦素与胰岛素都是调节能量代谢的主要激素,在调节食欲和能量代谢方面都具有重要的地位。两者都存在于血液循环中,其浓度与体脂容量相当,与能量平衡密切相关。近年来,大量研究分别探索了胰岛素和瘦素在机体能量代谢方面的变化,并提出了胰岛素抵抗和瘦素抵抗的概念,即高循环瘦素或胰岛素不能达到其应有的生物学效应,从而引起机体代谢紊乱。本文就胰岛素与瘦素的相关性以及胰岛素抵抗和瘦素抵抗之间可能的作用机制作一综述。

## 1 瘦素与胰岛素在分泌水平上的相互影响

1.1 胰岛素对瘦素分泌的影响 瘦素是贮存在低密度的分泌囊泡中,在调节因子等的作用下以胞吐的形式释放<sup>[1-2]</sup>。人体和动物实验模型都已证实了胰岛素是调节瘦素基因表达非常重要的因素,胰岛素可直接促进鼠类的白色脂肪组织合成分泌瘦素,对人类脂肪组织的研究也认为胰岛素可促进瘦素分泌。生理范围的血清胰岛素即可快速调节血清瘦素,维持长时间(>24 h)的大剂量胰岛素(>200 pmol/L)可促进瘦素的分泌。Lee *et al*<sup>[3]</sup>用脉冲追踪实验证实注射胰岛素 30 min即可刺激瘦素的分泌,其机制主要是通过减少瘦素的贮存而增加瘦素释放。Bartella *et al*<sup>[4]</sup>观察MDA-MB-231乳腺癌细胞发现胰岛素可以

## ■同行评议者

洪天配,教授,北京大学第三医院内分泌科

激活瘦素基因启动子而上调瘦素mRNA和蛋白的表达。

**1.2 瘦素对胰岛素分泌的影响** 瘦素对胰岛素的分泌既有直接又有间接的抑制作用。实验显示, 瘦素可引起胰岛 $\beta$ 细胞内一些蛋白的酪氨酸磷酸化, 促进即刻早期反应基因*c-fos*的表达, 并呈剂量相关性, 表明瘦素参与了胰岛 $\beta$ 细胞增殖的复杂机制<sup>[5]</sup>。瘦素可抑制胰岛素分泌, 既可通过抑制葡萄糖诱导的第二相胰岛素的分泌抑制胰岛素的释放, 又可通过其信号转导抑制胰岛素原mRNA表达<sup>[6]</sup>。Chen *et al*<sup>[7]</sup>将大鼠瘦素cDNA整合进入腺病毒, 将其给予体瘦的Wistar大鼠, 使大鼠血清瘦素浓度增加至约8  $\mu\text{g/L}$ , 此时机体脂肪量大大减少, 血清胰岛素浓度下降。Emilsson *et al*<sup>[8]</sup>给胰腺灌注瘦素发现葡萄糖介导的胰岛素的分泌受到抑制。

瘦素一方面抑制胰岛素分泌, 另一方面则增加胰岛素靶组织对胰岛素敏感性。而Dulloo *et al*<sup>[9]</sup>的实验表明, 瘦素并不影响骨骼肌细胞及脂肪细胞对葡萄糖的摄取。此外, 在肝脏中瘦素直接影响肝脏的糖代谢, 对糖原分解的作用类同胰岛素, 对糖异生的作用与胰生糖素类同<sup>[10]</sup>。

由此可见, 体内可能存在脂肪-胰岛内分泌轴。通过这个轴, 脂肪重量增加使瘦素的分泌增加, 瘦素抑制胰岛素的分泌, 减少脂肪合成和脂肪贮存; 而胰岛素则刺激瘦素的分泌。这样, 以胰岛素和瘦素为中介, 在脂肪组织和胰岛 $\beta$ 细胞之间建立了一个双向反调节环, 实现脂肪稳态与能量稳态的相互关联、平衡。一旦调节紊乱, 将引发机体的代谢障碍。

## 2 瘦素和胰岛素信号转导

循环胰岛素和瘦素都是通过与其特异性的受体结合, 将信号逐步上传给相应的效应分子, 但这些信号途径不是孤立的, 一些信号分子可以同时受到2种激素的调节, 并作用于靶器官发挥效应。

**2.1 胰岛素信号转导** 胰岛素是蛋白质类含氮激素, 由胰岛 $\beta$ 细胞合成、分泌后, 随血液循环运输到靶组织, 与靶细胞膜上特异的受体结合, 引发细胞内信号蛋白的级联反应, 从而将其对物质代谢(主要是对葡萄糖的摄取和代谢)的调节作用传导到细胞内。

胰岛素首先与胰岛素受体(insulin receptor, InsR)上的 $\alpha$ 亚基结合, 激活 $\beta$ 亚基, 使InsR构象发生改变, 进一步磷酸化胰岛素受体底物(insulin receptor substance, IRS)的酪氨酸残基, 激活底物

蛋白, 活化的底物蛋白与多种下游信号蛋白发生作用, 引发细胞内级联反应<sup>[11]</sup>。

胰岛素信号中最重要的是磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidyl inositol 3 kinase, PI3-K)介导转导途径<sup>[12]</sup>, PI3-K上的p85亚基与IRS, 主要是IRS-1上特异的酪氨酸残基结合, 接近InsR并被锚定在细胞膜。活化的PI3-K一方面催化第二信使PI-3, 4, 5磷酸盐(PIP3)的形成, 另一方面, 与磷酸肌醇依赖的蛋白激酶-1(PDK-1)和/或蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的某一亚型结合, 激活PKB(也称为Akt)和某一非典型PKC亚型。

浆膜上PKB和PDK-1的同域化, 使得PDK-1可以促进PKBSer308发生磷酸化, 加速GLUT4向膜的转运, 调节细胞对葡萄糖的摄取, 另一方面, 通过抑制烯醇式丙酮酸羧激酶而抑制糖异生, 并可同时磷酸化某些转录因子, 最终产生多种生物学效应, 如调节葡萄糖转运、糖原合成、蛋白合成, 抗脂肪分解和抑制细胞凋亡等。

**2.2 瘦素信号转导** 瘦素是ob基因产物, 主要是由白色脂肪组织分泌入血, 瘦素在体内行使功能时必须由其受体(OB-R)介导。瘦素的基因序列是高度保守的, 但其受体序列在不同物种之间有着很大的差异<sup>[13]</sup>。到目前为止, 发现了a, b, c, d, e, f 6种亚型的瘦素受体。其中长片段OB-Rb, 具有传导信号的功能, 其他5种短片段亚型的他们的生物功能目前还不是很清楚, 被认为可能在瘦素的清除方面起作用, 或者仅仅作为一种循环性的瘦素结合蛋白存在<sup>[14]</sup>。

瘦素的信号转导主要依赖Janus激酶(janus kinase, JAK)/信号转导转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路。瘦素与OB-Rb结合, OB-Rb本身不具备酪氨酸激酶活性, 但可通过偶联和激活JAK家族而实现信号转导。JAK在瘦素激活STAT通路中发挥着中枢作用, 活化的JAK激酶使受体胞内的某些酪氨酸(Tyr)残基磷酸化, 受体通过磷酸化的Tyr与STAT分子的SH2结构域相互作用, 使STAT分子的酪氨酸残基磷酸化。被JAK磷酸化的STAT分子可通过磷酸化的Tyr和SH2结构域形成二聚体, 并从受体复合物中解离。此二聚体可穿过核膜转位到细胞核内, 与靶基因上游的反向重复序列TTCCNGGAA结合, 启动特定基因的表达<sup>[15]</sup>。Håkansson-Ovesjö *et al*<sup>[16]</sup>研究发现, 在正常小鼠中, STAT3的mRNA和蛋白质在小鼠弓状核的腹侧神经元中有较高水平的表达。但在ob/ob小鼠中, 其mRNA的表达水平有明显的降低(减

### ■ 研发前沿

胰岛素抵抗的作用是目前研究中的热点, 而瘦素被证实为重要的脂肪因子并与胰岛素抵抗相互影响、相互作用, 但对两者共同的作用环节的研究尚需要进一步的展开。

### ■相关报道

目前,大量研究发现脂肪肝、II型糖尿病、肥胖等代谢性疾病中胰岛素抵抗和瘦素抵抗共同存在,并对其发生机制做了初步探讨。

少31%)。进一步说明,瘦素与STAT3协同起作用来调节体内特定的生命活动。

**2.3 交叉信号转导** 细胞信号转导的级联反应要求多个分子参与,这些分子在信号传递过程中可以同时激活多个效应分子,信号存在交叉转导。瘦素和胰岛素作为机体重要的2种激素,可以从不同途径活化同一个信号分子或信号通路。

胰岛素和瘦素都可以活化Ras蛋白通路。胰岛素与InsR结合,激活IRS蛋白,将信号传至适配蛋白生长因子受体结合蛋白2(Grb2),Grb2进而与GDP/GTP交换因子(mSOS)相互作用,进一步激活Ras。InsR也可直接酪氨酸磷酸化信号蛋白Shc,Shc再与Grb2相结合,经mSOS激活Ras;瘦素与其受体结合后,活化的JAK也可激活Ras蛋白。

活化的Ras蛋白可作用于多种靶蛋白,其中最重要的一种是Raf激酶。Raf-1是由原癌基因raf-1所编码的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,Raf-1一旦被Ras活化,就可磷酸化激活MAPKK,继而使丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)磷酸化激活。MAPK转位到核内,将转录因子,如c-Myc, ELK, c-Jun, c-Fos等磷酸化,进而进入核内调节与生长有关的基因转录<sup>[17]</sup>。

此外,瘦素还可以模拟胰岛素通过PI-3K途径对葡萄糖转运和糖原合成的作用,瘦素激活的JAK2引致IRS-2酪氨酸磷酸化从而进一步激活PI-3K,提示JAK2和IRS-2将瘦素的信号转导通路与胰岛素的信号转导通路偶合起来。

### 3 胰岛素抵抗和瘦素抵抗的调节分子

胰岛素和瘦素信号转导存在交叉,一些分子可同时被瘦素和胰岛素共同激活,而又进一步调节瘦素和胰岛素效应。这些分子在胰岛素抵抗或是瘦素抵抗过程中发挥重要作用,成为2条信号通路的共同调节分子。

**3.1 胰岛素受体底物** 胰岛素受体底物(IRS)蛋白是胰岛素信号转导的关键分子。目前已发现6种IRS蛋白,他们作为衔接蛋白调控SH2蛋白募集和下游信号通路。目前一般认为瘦素可以引起两种IRS的磷酸化,IRS1和IRS2,进而激活PI3K。

Tang *et al*<sup>[18]</sup>在分离培养鼠BV-2小胶质细胞中加入瘦素,24 h后检测到大量IL-6的产生,进一步检测发现IRS-1磷酸化增加,用RNA干扰IRS-1(siRNA),可以抑制瘦素诱导的IL-6产生。表明在瘦素诱导的IL-6产生过程中IRS-1发挥重要作用。Hennige *et al*<sup>[19]</sup>用Ala318位突变(ser318替代)

的IRS1转染L6细胞后,分析IRS的酪氨酸磷酸化,结果表明瘦素预处理后可以明显降低胰岛素诱导的IRS1磷酸化,提示瘦素对胰岛素信号通路的抑制作用可能通过IRS1来实现。

最近Wauerman *et al*<sup>[20]</sup>通过特异性细胞因子敲除后杂交方法,观察N38下丘脑细胞系,发现IRS4可能也参与了下丘脑瘦素信号通路。IRS4局限在下丘脑表达,但在小鼠的肌肉、肝脏、心脏以及肾脏也发现IRS4 mRNA的。IRS4缺失小鼠表现为轻微的生殖缺陷、糖代谢紊乱和生长发育迟缓,表明IRS4可能通过STAT3信号之外的另一条瘦素通路发挥效应。

**3.2 蛋白酪氨酸磷酸酶B** 蛋白酪氨酸磷酸酶B(protein tyrosine phosphatase B, PTP1B)是胰岛素和瘦素共同的负性调节因子。PTP1B基因敲除小鼠表现为对瘦素和胰岛素的高度敏感,高脂饮食也不会出现肥胖。Picardi *et al*<sup>[21]</sup>对大鼠第三脑室注射PTP1B的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)可以明显改善高脂饮食诱导的胰岛素和瘦素抵抗状态。

**3.2.1 PTP1B与胰岛素抵抗:** PTP1B几乎表达于所有组织细胞内,参与大量生长因子的信号途径,他能在其他酪氨酸磷酸酶参与下,与InsR、IRS等信号蛋白作用,阻断胰岛素信号级联反应的下传,因此在胰岛素信号中起着负调控作用。InsR和IRS的去磷酸化导致了胰岛素信号转导通路中下游的PKB、PKC和细胞外信号调节激酶的磷酸化受到影响<sup>[22-23]</sup>。PKC磷酸化的降低导致GLUT4的活性降低,最终影响血液中葡萄糖向细胞内的转运,导致血糖升高。PKB影响肝糖原、脂肪酸和蛋白质的合成,从而对代谢过程产生作用<sup>[24]</sup>。PTP1B活性的升高可以降低磷酸化细胞外信号调节激酶的磷酸化水平,使其在细胞内的表达水平降低,影响基因的转录、表达和翻译,调节细胞的生长和凋亡<sup>[23]</sup>。

PTP1B都可在胰岛素信号级联中的多个位点发挥负调控作用。过度表达的PTP1B能增加InsR、IRS-1、IRS-2的脱磷酸化,下调受体后信号。相反,抑制受体PTP1B结合或PTP1B的定点突变以及给予抑制性抗体或PTP1B的ASO等的实验方法均可增强胰岛素信号。

Gum *et al*<sup>[25]</sup>用PTP1B的ASO处理ob/ob小鼠,发现小鼠血糖及胰岛素水平下降,同时胰岛素敏感性增强。检测发现小鼠肝脏PTP1B表达下降60%。Qiu *et al*<sup>[26]</sup>通过腺病毒将PTP1B导入HepG2细胞中,发现胰岛素受体和IRS1的酪氨

酸磷酸化水平明显下降, 可见PTP1B的过表达抑制了InsR及IRS的磷酸化, 减弱了胰岛素信号转导. 在糖尿病的动物模型的肝脏和骨骼肌中降低PTP1B的水平可增强依赖胰岛素的代谢信号转导, 并提高胰岛素受体对胰岛素的应答<sup>[25]</sup>. Zabolotny *et al*<sup>[27]</sup>使转基因鼠过表达人PTP1B, 发现其骨骼肌中胰岛素刺激引起的InsR酪氨酸磷酸化水平降低35%, PI3K活性降低40%-60%, 葡萄糖转运所需的PKC活性也有所减弱.

此外, 通过高胰岛素-正常血糖钳夹技术发现, 过表达PTP1B的小鼠全身葡萄糖清除和肌肉的葡萄糖摄取减少了40%-50%. Xue *et al*<sup>[28]</sup>发现, 在InsR和IRS-1都缺陷的双杂合小鼠的肌肉和肝脏胰岛素诱导的InsR和IRS-1蛋白、PKB、糖原合成酶激酶3 $\beta$ 和p70的S6激酶的磷酸化均受损, 而同时有PTP1B缺失的双杂合的小鼠却有明显的改善, 进一步证明了PTP1B的负性作用.

**3.2.2 PTP1B与瘦素抵抗:** PTP1B在大鼠下丘脑瘦素应答神经元聚集区表达, 实验表明, PTP1B可通过对JAK2的去磷酸化作用引起瘦素抵抗<sup>[29]</sup>. Kaszubska *et al*<sup>[30]</sup>使PTP1B在下丘脑细胞系GT1.7中过量表达, 可见瘦素刺激后JAK2和STAT3的磷酸化水平较对照组明显降低, 并呈剂量依赖性. 特异性抑制PTP1B后, STAT3的DNA结合活性显著升高. 缺乏PTP1B的ob/ob鼠和PTP1B基因敲除小鼠体重不增加, 脂肪组织减少及静息代谢率提高, 瘦素敏感性增强<sup>[31-32]</sup>.

脑部特异性PTP1B敲除小鼠体质量和脂肪组织量下降, 对瘦素敏感性增强, 糖代谢改善, 能量消耗增加. 而其他特异性PTP1B敲除对小鼠无明显影响, 提示PTP1B主要是通过在大脑的作用来调节体质量及脂肪量<sup>[33]</sup>. Morrison *et al*<sup>[34]</sup>研究发现, 随鼠龄增加, 瘦素抵抗逐渐明显, 下丘脑PTP1B表达也增加, 给予PTP1B抑制剂, 瘦素抑制摄食的作用增强, 提示下丘脑PTP1B表达增加与随着年龄增长而出现的瘦素抵抗有关.

**3.3 细胞因子信号转导抑制因子-3** 细胞因子信号转导抑制因子-3(suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3)作为细胞信号抑制因子家族的主要成员, 不仅能负反馈调节胰岛素信号通路, 在胰岛素抵抗中发挥重要作用, 而且可由瘦素诱导产生并进而抑制瘦素信号转导, 因而是介导瘦素抵抗的重要因子之一; 同时引起的胰岛素抵抗使机体对胰岛素的生物效应降低, 是引起糖尿病发生的主要原因.

**3.3.1 SOCS-3调节胰岛素抵抗:** SOCS-3可以在多

个水平调节胰岛素效应. Emanuelli *et al*<sup>[35]</sup>在InsR转染的COS-7细胞中, 胰岛素使SOCS-3表达增加了1.4倍, 推测胰岛素可以诱导SOCS-3的表达. Steppan *et al*<sup>[36]</sup>在3T3-L1细胞发现SOCS-3参与了抵抗素诱导的胰岛素抵抗, 抵抗素使SOCS-3表达增加, 并促进他与InsR结合, 从而抑制该细胞中胰岛素信号转导. SOCS-3还调节信号蛋白降解从而诱导胰岛素抵抗, Rui *et al*<sup>[37]</sup>发现胰岛素对SOCS-3磷酸化诱导是依赖于SH2结构域、通过JAK途径实现的Tyr204磷酸化, 推测SOCS-3“接头”作用, 从而干扰胰岛素信号转导. Senn *et al*<sup>[38]</sup>证实SOCS-3可通过其SOCS盒降解IRS-1和IRS-2, 从而抑制胰岛素信号.

此外一些细胞因子, 如IL-6、TNF- $\alpha$ 等, 也能刺激SOCS-3表达而引起胰岛素抵抗. Peralta *et al*<sup>[39]</sup>发现在伴有胰岛素抵抗的老年SD大鼠下丘脑中, SOCS-3 mRNA表达水平增加, 实施饮食控制后得到了控制, 表明SOCS-3至少部分参与了老年性胰岛素抵抗.

**3.3.2 SOCS-3引起瘦素抵抗:** SOCS-3升高是瘦素抵抗的标志. 研究表明<sup>[40]</sup>, SOCS-3抑制瘦素信号通路主要是结合在瘦素受体Tyr985位点, 抑制STAT3信号通路. 在瘦素治疗的大鼠中, SOCS-3蛋白水平在瘦素治疗后2-3 h达到高峰并持续20 h<sup>[41]</sup>. SOCS-3是潜在的瘦素抵抗因子, 突变分析显示, Tyr985对STAT3信号转导并非必需, 但SOCS-3却需要与这个位点结合来抑制瘦素信号转导, 超过生理水平的SOCS-3可直接与JAK2结合而抑制瘦素的信号转导.

除了影响瘦素受体水平, SOCS-3还可以干预受体后信号. Wang *et al*<sup>[42]</sup>发现瘦素刺激后细胞的脂肪酸分解代谢关键酶如脂酰辅酶A氧化酶和肉碱棕榈酸酰基转移酶1 mRNA水平明显升高, 而SOCS-3过度表达的细胞则无此现象.

## 4 结论

目前, 对胰岛素和瘦素抵抗机制的还缺乏统一的认识, 在各自的研究领域中偶然发现的一些共同调节因子, 但对这2个重要的病理改变的始动环节以及先后顺序的探讨还没有深入. 胰岛素抵抗和瘦素抵抗与多种重要疾病如肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化病等代谢性疾病的发生发展有着密切联系. 今后以两者交叉信号分子为重要的分子靶标, 用反义寡核苷酸技术、小分子有机物、信号促进或阻断技术对两者的相关性研究将成为一个重点.

## ■应用要点

代谢性疾病的发病机制问题是目前医学研究中的重点和难点, 本文主要针对现阶段机制研究中的一些成果做出小结, 试图把握当前的研究动态, 为以后的研究做基础.

# ■同行评价

本文系统、全面阐述了该领域的研究进展,内容丰富,可读性好。

随着社会的发展,代谢性疾病称为困扰许多人健康的重要因素,但药物干预效果并不让人满意,其重要的原因就是対病变机制认识的局限性。対胰岛素抵抗和瘦素抵抗的深入认识和进一步探讨将对代谢性疾病的预防和治疗提供新的视角和思路。

## 5 参考文献

- 1 Roh C, Thoddis G, Farmer SR, Kandror KV. Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E893-E899
- 2 Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, P  th G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 2000; 49: 532-538
- 3 Lee MJ, Fried SK. Multilevel regulation of leptin storage, turnover, and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. *J Lipid Res* 2006; 47: 1984-1993
- 4 Bartella V, Cascio S, Fiorio E, Auriemma A, Russo A, Surmacz E. Insulin-dependent leptin expression in breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4919-4927
- 5 Islam MS, Morton NM, Hansson A, Emilsson V. Rat insulinoma-derived pancreatic beta-cells express a functional leptin receptor that mediates a proliferative response. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 851-855
- 6 Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 670-676
- 7 Chen NG, Swick AG, Romsos DR. Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 1174-1179
- 8 Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 1997; 46: 313-316
- 9 Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J. Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Lett* 2002; 515: 109-113
- 10 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- 11 陈燕, 汪恕萍. 胰岛素作用的信号转导与胰岛素抵抗. 安徽卫生职业技术学院学报 2002; 1: 42-44
- 12 谢平, 宁惠萍. 胰岛素信号蛋白与胰岛素抵抗. 国外医学·病理、生理科学与临床分册 2001; 21: 48-50
- 13 Ramos MP, Rueda BR, Leavis PC, Gonzalez RR. Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. *Endocrinology* 2005; 146: 694-701
- 14 Yoon SJ, Cha KY, Lee KA. Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 232: 27-35
- 15 Yanagisawa M, Nakashima K, Arakawa H, Ikenaka K, Yoshida K, Kishimoto T, Hisatsune T, Taga T. Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells by interleukin-11 via activation of a common cytokine signal transducer, gp130, and a transcription factor, STAT3. *J Neurochem* 2000; 74: 1498-1504
- 16 Håkansson-Ovesj   ML, Collin M, Meister B. Down-regulated STAT3 messenger ribonucleic acid and STAT3 protein in the hypothalamic arcuate nucleus of the obese leptin-deficient (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 2000; 141: 3946-3955
- 17 Bennett WL, Keeton AB, Ji S, Xu J, Messina JL. Insulin regulation of growth hormone receptor gene expression: involvement of both the PI-3 kinase and MEK/ERK signaling pathways. *Endocrine* 2007; 32: 219-226
- 18 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-kappaB, and p300 pathway in microglia. *J Immunol* 2007; 179: 1292-1302
- 19 Hennige AM, Stefan N, Kapp K, Lehmann R, Weigert C, Beck A, Moeschel K, Mushack J, Schleicher E, H  ring HU. Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1. *FASEB J* 2006; 20: 1206-1208
- 20 Wauman J, De Smet AS, Catteeuw D, Belsham D, Tavernier J. Insulin receptor substrate 4 couples the leptin receptor to multiple signaling pathways. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 965-977
- 21 Picardi PK, Calegari VC, Prada Pde O, Moraes JC, Araújo E, Marcondes MC, Ueno M, Carnevali JB, Velloso LA, Saad MJ. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 2008; 149: 3870-3880
- 22 Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, Neel BG. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* 2004; 13: 341-355
- 23 Kennedy BP, Ramachandran C. Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 877-883
- 24 Seale AP, de Jesus LA, Kim SY, Choi YH, Lim HB, Hwang CS, Kim YS. Development of an automated protein-tyrosine phosphatase 1B inhibition assay and the screening of putative insulin-enhancing vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 221-225
- 25 Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampitt JE, Zinker BA, Trevillyan JM, Ulrich RG, Jirousek MR, Rondinone CM. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 2003; 52: 21-28
- 26 Qiu W, Avramoglu RK, Dubé N, Chong TM, Naples M, Au C, Sidiropoulos KG, Lewis GF, Cohn JS, Tremblay ML, Adeli K. Hepatic PTP-1B expression regulates the assembly and secretion

- of apolipoprotein B-containing lipoproteins: evidence from protein tyrosine phosphatase-1B overexpression, knockout, and RNAi studies. *Diabetes* 2004; 53: 3057-3066
- 27 Zabolotny JM, Haj FG, Kim YB, Kim HJ, Shulman GI, Kim JK, Neel BG, Kahn BB. Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J Biol Chem* 2004; 279: 24844-24851
  - 28 Xue B, Kim YB, Lee A, Toschi E, Bonner-Weir S, Kahn CR, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 23829-23840
  - 29 Lund IK, Hansen JA, Andersen HS, Møller NP, Billestrup N. Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 339-351
  - 30 Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 195: 109-118
  - 31 Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2002; 2: 497-503
  - 32 Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2002; 2: 489-495
  - 33 Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 2006; 12: 917-924
  - 34 Morrison CD, White CL, Wang Z, Lee SY, Lawrence DS, Cefalu WT, Zhang ZY, Gettys TW. Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age. *Endocrinology* 2007; 148: 433-440
  - 35 Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 15985-15991
  - 36 Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1569-1575
  - 37 Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002; 277: 42394-42398
  - 38 Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 13740-13746
  - 39 Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, Arribas C. Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 425-428
  - 40 Dunn SL, Björnholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG Jr. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 925-938
  - 41 Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. *Regul Pept* 2000; 92: 9-15
  - 42 Wang ZW, Pan WT, Lee Y, Kakuma T, Zhou YT, Unger RH. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J* 2001; 15: 108-114

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2007 年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第1位. 2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28种期刊的第10位. 即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73. (编辑: 程剑侠 2009-05-28)

# 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展

高金生, 杨书良

## ■背景资料

肠黏膜屏障是由上皮屏障、免疫屏障、微生物屏障、化学屏障和黏液层与不移动水层等所构成, 当肠黏膜屏障损伤时, 肠道中的微生物和毒素便可突破肠黏膜屏障, 进入门静脉和淋巴系统引起细菌移位, 甚至发展为SIRS和MODS。

高金生, 杨书良, 河北工程大学医学院病理教研组 河北省邯郸市 056029

河北省科学技术研究与发展基金资助项目, No. 05276101D-21

作者贡献分布: 本文综述由高金生完成, 杨书良审核。

通讯作者: 杨书良, 教授, 056029, 河北省邯郸市, 河北工程大学医学院病理教研组, hdysl2007@126.com

电话: 0310-3115935

收稿日期: 2009-03-14 修回日期: 2009-04-24

接受日期: 2009-04-27 在线出版日期: 2009-05-28

## Advance in causes and mechanisms of intestinal injury

Jin-Sheng Gao, Shu-Liang Yang

Jin-Sheng Gao, Shu-Liang Yang, Department of Pathology, Medical College of Hebei Engineering University, Handan 056029, Hebei Province, China

Supported by: the Science and Technology Research and Development Foundation of Hebei Province, No. 05276101D-21

Correspondence to: Professor Shu-Liang Yang, Department of Pathology, Medical College of Hebei Engineering University, Handan 056029, Hebei Province, China. hdysl2007@126.com

Received: 2009-03-14 Revised: 2009-04-24

Accepted: 2009-04-27 Published online: 2009-05-28

## Abstract

New evidence suggests that intestinal barrier injury contributes to many diseases' occurrence, development and outcome in clinics. Therefore, the causes and mechanisms of intestinal mucosal barrier damage are attracting more and more attention from clinicians. Many causes may induce damages of the intestinal mucosal membrane barrier, including ischemia, anoxia, ischemia/reperfusion, inflammatory mediator infiltration, bacterial endotoxin release, imbalance of intestinal flora, immune abnormality, nutritional disturbance, total parenteral nutrition, severe trauma, general and gastrointestinal infection and so on. This article gives a review on the above causes and mechanisms.

Key Words: Intestinal barrier; Hypoxia; Inflammatory mediator; Endotoxin

Gao JS, Yang SL. Advance in causes and mechanisms of intestinal injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1540-1544

## 摘要

最新研究发现, 临床上许多疾病的发生、发展与转归都与肠黏膜屏障损伤有关, 因而肠黏膜屏障损伤的原因与机制越来越引起临床医师的重视。引起肠黏膜屏障损伤的常见原因与机制有缺血缺氧、缺血-再灌注、炎症介质、细菌内毒素、肠道菌群失调、免疫异常、营养障碍及全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)、严重创伤、全身及胃肠道严重感染等, 本文就此作一综述。

关键词: 肠黏膜屏障; 缺氧; 炎症介质; 内毒素

高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1540-1544

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1540.asp>

## 0 引言

肠黏膜不仅是营养物质消化、吸收的重要场所, 同时也是致病微生物和毒素侵入的主要门户。生理情况下, 机体可通过肠黏膜上皮屏障、免疫屏障、微生物屏障、化学屏障和黏液层与不移动水层等, 来有效地阻止致病微生物和毒素越过肠黏膜屏障侵入肠道以外的组织、器官, 以保证机体处于健康状态<sup>[1-5]</sup>。当肠黏膜屏障损伤时, 肠道中的微生物和毒素便可突破肠黏膜屏障, 进入门静脉和淋巴系统引起细菌移位<sup>[6]</sup>, 甚至发展为全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭综合征(multiple organs deficiency syndrome, MODS)<sup>[7-8]</sup>。

## 1 引起肠黏膜损伤的原因与机制

1.1 缺血缺氧 小肠绒毛的微动脉、微静脉和毛细血管在肠绒毛的顶端呈弓形的发夹状, 加之他们之间还存在着氧的短路交换和距母支较远等特点, 常导致绒毛顶部的氧分压大大低于动脉血中的氧分压, 故其顶部供血供氧较差, 在缺血缺氧时更易引起损伤。生理情况下, 流经胃肠道的血量占全身循环血量的30%左右, 而流经胃肠黏

## ■同行评议者

程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系; 王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

膜和肠绒毛的血流量又分别占胃肠道的80%和60%。应激状态时, 机体为了保证心、脑等重要器官的血液供应, 会反射地引起皮肤、内脏细小动脉收缩、痉挛, 全身血量重新分布, 胃肠道的血流量明显减少。若全身血量减少10%, 胃肠道血流量可减少40%。研究表明, 在各种应激状态下, 胃肠道最早发生缺血, 又最后得到恢复, 易较早受损或衰竭<sup>[9]</sup>。引起缺血缺氧的原因很多, 如失血、失液、休克、严重烧伤、窒息、呼吸衰竭等。在缺血缺氧时肠黏膜上皮细胞有氧代谢障碍, ATP生成减少, 细胞膜上的钾-钠泵功能降低, 不能有效地把细胞内的钠转运到细胞外, 造成细胞内钠、水潴留, 引起细胞水肿、坏死及细胞连接断裂。坏死的上皮细胞从绒毛顶端脱落, 甚至黏膜全层脱落形成肠黏膜糜烂或溃疡, 导致肠黏膜屏障损伤<sup>[10]</sup>。另外, 缺血缺氧还会导致肠黏膜上皮细胞无氧酵解增强, 酸性代谢产物增多引起局部酸中毒。酸中毒不但直接引起肠黏膜上皮细胞损伤, 而且还可增加细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 间接引起上皮细胞损伤加重。

**1.2 缺血-再灌注** 组织细胞缺血缺氧后, 最基本的治疗方法是尽早恢复血供, 改善缺血缺氧。但是, 通过临床观察和动物实验发现, 恢复血液再灌注后, 虽然局部组织缺血有所改善, 但原来缺血缺氧部位的细胞遭受的损伤不但不减轻反而逐渐加重, 这种损伤称为缺血-再灌注损伤<sup>[11-14]</sup>。目前认为发生机制是组织恢复供血供氧后, 在原来缺血缺氧部位形成许多具有“毒性”的活性氧代谢产物(reactivated oxygen species, ROS)有关, ROS包括超氧阴离子( $\cdot\text{O}_2^-$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )等。ROS可损伤细胞的大分子物质, 如核酸、脂质等, 这些物质的分子结构改变, 最终会导致细胞的功能障碍甚至死亡。ROS的主要生成途径有: (1)黄嘌呤途径: 生理情况下, 黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)和黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XD)主要存在于毛细血管的内皮细胞中。XD约占XD+XO总活力的90%, XO约占10%。二者既可独立存在又可互相转化。XO和XD均可催化次黄嘌呤向黄嘌呤或黄嘌呤向尿酸转化, 不同的是XD在催化黄嘌呤转化成尿酸时, 需要辅酶I( $\text{NAD}\cdot$ )作为电子受体, 产生稳定的ROS-还原型辅酶I(ROS-NADH), 而XO在催化黄嘌呤转化成尿酸时, 需要分子氧作为电子受体, 产生高活性的 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 再在金属离子(如 $\text{Fe}^{2+}$ )的参与下形成 $\cdot\text{OH}$ 。缺血缺氧时, 细胞能量代谢障

碍, ATP生成减少, 膜泵功能降低, 进入细胞内的 $\text{Ca}^{2+}$ 增多, 激活 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性蛋白水解酶, 使XD变构, 大量转变为XO; ATP可降解为ADP、AMP和次黄嘌呤, 次黄嘌呤明显增多; ATP减少, 次黄嘌呤转化为黄嘌呤受阻, 次黄嘌呤大量堆积。再灌注时大量氧进入细胞内, XO催化次黄嘌呤转化为黄嘌呤, 黄嘌呤转化为尿酸。在以上反应中以XO催化为主, 均以分子氧作为电子受体, 从而产生大量的ROS<sup>[15]</sup>。(2)中性粒细胞“呼吸爆发”: 成熟的中性粒细胞主要存在于外周血中, 约占成人外周血白细胞总数的50%-70%。同时, 骨髓中还贮备有 $2.5 \times 10^{12}$ 个成熟的中性粒细胞。在应激状态下, 机体可立即动员这部分中性粒细胞大量进入血液循环<sup>[16]</sup>。中性粒细胞吞噬细菌后和胞质内的溶酶体融合并随之活化, 在短时间内大量消耗氧的情况下(正常耗氧量的2-20倍)激活细胞膜上的NADPH氧化酶和NADH氧化酶, 催化NADPH、NADH与分子氧生成 $\text{NADP}\cdot$ 和 $\text{NAD}\cdot$ 并生成大量的 $\cdot\text{O}_2^-$ , 大多数 $\cdot\text{O}_2^-$ 经自发性歧化作用转变为 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 进一步还原成高度活性的 $\cdot\text{OH}$ 。另外,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 在中性粒细胞内髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的催化下和氯离子( $\text{Cl}^-$ )形成次氯酸( $\text{HClO}$ )。 $\text{HClO}$ 是一种强氧化剂, 氧化能力是 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的100倍。应激状态时, 中性粒细胞大量入血并被激活, 在缺血-再灌注提供大量分子氧的情况下, 引发中性粒细胞“呼吸爆发”产生大量的ROS, ROS在杀灭细菌的同时, 对肠黏膜上皮细胞也有严重的损伤作用。(3)儿茶酚胺: 儿茶酚胺是由交感-肾上腺髓质所分泌, 包括肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺。应激状态下, 交感-肾上腺髓质系统分泌大量儿茶酚胺, 儿茶酚胺的氧化可产生大量氧自由基。总之, 缺血-再灌注时, 产生的大量ROS可对肠黏膜屏障造成比缺血缺氧更严重的损伤。

**1.3 炎症介质** 炎症介质是指炎症过程中, 参与炎反应的一系列化学物质。炎症介质的前身存在于血浆中或细胞内。在应激状态下, 他们可以被激活并相互作用不断循环促进, 形成“瀑布样”反应, 在引起一系列炎症病理变化的同时, 也可引起肠黏膜屏障的损伤<sup>[17-18]</sup>。引起肠黏膜屏障损伤的炎症介质有: 血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)、一氧化氮(NO)等。TNF- $\alpha$ 主要由激活的巨噬细胞产生, TNF- $\beta$ 由激活的T淋巴细胞产生, 在机体受到损伤性因素作用时, 他们可很快产生并在短时间内达到高

## ■研发前沿

探寻引起肠黏膜屏障功能障碍的原因及机制, 保护肠黏膜屏障功能, 不仅是临床治疗肠道感染的目标之一, 也是微生物学、免疫学、病理生理学等基础学科研究的热点。

## ■相关报道

目前普遍认为, 缺血缺氧、缺血-再灌注、炎症介质、细菌内毒素、肠道菌群失调、免疫异常、营养障碍及TPN、严重创伤、全身及胃肠道严重感染等导致肠黏膜屏障损伤, 致使肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位并激活固有层免疫细胞, 导致大量炎症细胞因子及介质的产生, 所产生的炎症分子进一步损伤肠黏膜屏障功能。

### ■创新盘点

本文对肠黏膜屏障损伤的原因与机制进行了详细的论述,特别是对缺血-再灌注损伤时 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{HClO}$ 的形成机制进行了深刻的探讨。

峰. TNF可促使中性粒细胞聚集,并被激活释放大量的ROS、弹性蛋白酶(elastase, ET)、杀菌性通透性增加蛋白(bactericidal permeability increasing protein, BPIP)、防御素等,对血管内皮细胞和肠黏膜上皮细胞造成损伤;一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)可催化L-精氨酸转化成瓜氨酸,释放NO. NOS可分为原生型(cNOS)和诱导型(iNOS)二类, TNF可刺激iNOS使其活性增加, NO大量生成,并通过其毒性代谢产物过氧亚硝基阴离子损伤肠黏膜<sup>[19]</sup>; TNF还能通过交感-肾上腺髓质系统使儿茶酚胺分泌增加,儿茶酚胺可促进多种血管活性物质释放,如白三烯(LT)、前列腺素(PG)、血栓素 $\text{A}_2$ ( $\text{TXA}_2$ )、PAF等,加剧微循环障碍,加重肠黏膜屏障损伤; TNF还能引起发热、食欲减退、低血压等,间接引起肠黏膜屏障损伤. PAF在肠黏膜屏障损伤中已发挥着重要作用,他可引起血小板聚集、脱颗粒释放 $\text{TXA}_2$ ; PAF也可引起中性粒细胞脱颗粒和呼吸爆发,释放大量溶组织酶、细胞因子和ROS. 应激状态下,血浆中的补体系统可通过经典途径、替代途径和凝集素途径被激活,补体的活化产物( $\text{C}_{3a}$ 、 $\text{C}_{3b}$ 、 $\text{C}_{5a}$ 等)可刺激巨噬细胞和中性粒细胞,通过释放细胞因子或其他活化物质引起肠黏膜屏障损伤。

**1.4 内毒素** 内毒素是革兰阴性菌细胞壁外膜上的一种脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和微量蛋白质的复合物, LPS是他的主要抗原性及致病性部分. LPS是细菌死亡或解体后才释放出来的一种具有广泛生物活性的细菌结构成分<sup>[20]</sup>. 内毒素成分中,类脂A和2-酮基-3-脱氧辛酸(2-Keto-3-deoxyoctonic acid, KDO)是内毒素的毒性部分,类脂A位于LPS分子结构的最外层,是由氨基葡萄糖、磷酸和脂肪酸所组成,以脂化的葡萄糖胺二糖为单位,通过焦磷酸酯键组成一种独特的糖脂化合物,他是内毒素多种生物活性或毒性反应的主要基团. 该基团没有种属特异性,各属细菌的类脂A结构相似,其毒性反应相同. 通常情况下, LPS以完整的形式存在于细菌的细胞壁上,当他从细胞壁上游离下来后,成为可溶性的游离LPS,这时他的生物活性明显增加,其活性是原来的50-100倍. 肠黏膜功能正常时,只有极少量内毒素吸收进入门静脉,但很快被肝脏的Kupffer细胞清除,不但不会引起损伤,还会增强机体的特异性和非特异性免疫力. 但在重症肝炎、肠道菌群失调、严重创伤、休克、机体免疫力下降等情况下,肠道内的致病菌,特别是

革兰阴性菌就会大量生长、繁殖并释放大量的内毒素,不但可直接引起肠黏膜屏障损伤,也可引起肠源性内毒素移位<sup>[21]</sup>. 大量内毒素进入血液循环,可激活巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞及补体系统,先后诱导TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12等细胞因子、黏附分子及NO等炎症介质和溶菌酶的释放及ROS的生成,严重者可导致中毒性休克、弥漫性血管内凝血(disseminated intravascular, DIC)、MODS等,甚至引起机体死亡。

**1.5 肠道菌群失调** 生理情况下,人体肠道中寄生着大量的益生菌,小肠内的益生菌浓度约为 $10^6$ - $10^{10}$  cfu/L,随着肠道的下行,益生菌的浓度越来越高. 空肠主要为革兰阳性需氧菌,回肠主要为革兰阴性厌氧菌. 结肠细菌的浓度可增加到 $10^{14}$ - $10^{15}$  cfu/L. 在这些益生菌中主要是类杆菌、真杆菌、双歧杆菌和厌氧球菌等. 他们对维护肠道菌群平衡起着非常关键的作用,他们的正常生长可有效地抑制其他致病菌在肠黏膜表面黏附、定植、生长、繁殖<sup>[22-25]</sup>. 但他们大多数是抗菌药物的敏感菌,在抗菌药物大量使用过程中常被杀灭,使其数量急剧减少甚至消失,而使其他的耐药菌过度生长,引起肠道菌群失调. 如氨苄西林可导致儿童肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌等益生菌减少,而金黄色葡萄球菌大量生长、繁殖并释放大量毒素引起肠黏膜损伤. 放射性物质和放射线的应用对人体的微生态平衡也有明显的影响,特别是对肠道的正常菌群影响较大. 如人体接受一定剂量的放射线照射后,其机体的防卫机制遭到破坏、细胞免疫和体液免疫能力明显降低,肠道中正常菌群数量减少,而致病菌数量增多,使肠黏膜屏障功能受损. 肠道疾患或手术也可破坏肠道正常的生理解剖结构,从而损害正常菌群的栖居环境引起菌群失调. 如小肠污染综合征、盲袢综合征、憩室、回肠侧通、胃和肠切除等,都会导致肠道菌群失调,造成肠黏膜屏障功能损伤. 正常菌群失调后,由致病力较强的细菌、真菌等替代在肠黏膜表面生长称二重感染也称菌群交替症,二重感染除可发生在肠道引起肠炎外,还可引起细菌移位,导致肠外组织器官发生炎症,甚至发展为败血症<sup>[26]</sup>. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)也可引起肠黏膜屏障受损. IBD是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)<sup>[27-29]</sup>.

### ■应用要点

充分认识肠黏膜屏障损伤的原因与机制对临床医生防治肠源性感染、SIRS和MODS具有重要的临床意义。

**1.6 免疫缺陷病** 免疫缺陷病根据发生原因和机制的不同,可分为先天性免疫缺陷病(congenital immunodeficiency disease, CIDD)和后天获得性免疫缺陷病(acquired immunodeficiency disease, AIDD). CIDD主要由免疫系统遗传基因异常或先天性免疫系统发育障碍所致,而AIDD是由后天因素引起. CIDD患者可表现原发性B淋巴细胞缺陷、T淋巴细胞缺陷、单核-巨噬细胞功能缺陷、补体缺陷等. B淋巴细胞缺陷患者淋巴结内淋巴滤泡减少或缺失、淋巴细胞无生发中心、外周血中B淋巴细胞数目减少,而T淋巴细胞数目正常,血清中免疫球蛋白(Ig)水平降低或缺失,由于Ig减少,患者对化脓菌、肠道细菌、病毒及某些寄生虫的易感性增加. T淋巴细胞缺陷会影响到T淋巴细胞的发育、分化、成熟. 这样不但会引起T淋巴细胞功能异常,还会间接导致体液免疫缺陷和单核-巨噬细胞功能缺陷. 补体缺陷包括固有成分、补体调节蛋白和补体受体的缺陷,补体缺陷常直接影响吞噬细胞的吞噬功能、免疫复合物的清除和炎症反应等. 吞噬细胞缺陷包括吞噬细胞的数量减少和功能异常,如吞噬细胞移动和/或黏附功能异常、吞噬细胞杀伤功能异常等. 临床表现肠道化脓菌或真菌的反复感染并造成肠黏膜屏障损伤. AIDD是继发于其他疾病或由其他因素所致的免疫缺陷. 如糖皮质激素是作用最强的天然免疫调节剂,长期应用可抑制多种免疫细胞的功能,使免疫机能下降引发肠道感染损伤肠黏膜屏障;抗癌药物环磷酰胺的代谢产物能与DNA发生烷化,对处于分裂阶段的T淋巴细胞和B淋巴细胞产生抑制,使肠黏膜免疫功能受损;人类免疫缺陷病毒(HIV)感染引起的获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞明显减少,当外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞数目降至50/μL时,患者免疫机能严重缺陷,特异性免疫消失,肠黏膜的细胞免疫和体液免疫将严重受损,易引起肠黏膜屏障受损;严重创伤、休克时肠道的免疫功能也会严重受损,如失血性休克时,IEL和LPL中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞明显减少;严重创伤后吞噬细胞吞噬杀伤能力下降,不但不能吞噬、杀灭病原微生物,反而成为病原微生物的载体,引起炎症的扩散,甚至发生肠道细菌移位.

**1.7 营养因素** 肠黏膜上皮细胞70%的营养供应来自肠腔内营养物质的直接吸收<sup>[30]</sup>. 如谷氨酰

胺(Glutamine, Gln)能直接为小肠黏膜上皮细胞提供营养;长链脂肪酸为小肠黏膜上皮细胞提供能量;短链脂肪酸在结肠内分解为乙酸、丙酸盐、丁酸盐后为结肠提供能量;肠内营养素可引起多种胃肠道激素释放、刺激胃肠蠕动;食物蛋白还能激活肠黏膜免疫系统,通过细胞免疫和体液免疫维持肠道免疫平衡;肠内营养物质对维持肠道内正常菌群屏障也有非常重要的作用. 如果肠道内长期缺乏营养物质,如TPN时,肠黏膜由于缺少食物和消化系激素刺激,黏膜上皮更新修复能力下降. 营养物质缺乏,特别是Gln的缺乏会使肠黏膜上皮细胞蛋白质合成发生障碍,引起肠黏膜萎缩变薄,肠绒毛变矮而稀疏,上皮细胞之间的连接也变疏松,肠黏膜上皮屏障受损,其主要原因是Gln对胃肠黏膜上皮成分己糖胺及葡萄糖胺的生化合成有促进作用;Gln缺乏时肠黏膜杯状细胞黏液分泌减少,使肠黏膜表面的黏液层变薄、黏液屏障受损;Gln缺乏还会引起肠黏膜免疫系统的细胞增生、分化、激活发生异常,表现为GALT萎缩,PP中T淋巴细胞和B淋巴细胞数量减少,固有层中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞、浆细胞、APC等数量减少、活性降低,肠黏膜免疫屏障功能的下降<sup>[31]</sup>;Gln还能增加肠道热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的表达来减轻其他有害因素对肠黏膜的损伤<sup>[32]</sup>;Gln是肠黏膜上皮细胞合成抗氧化剂谷胱甘肽重要的前身物质,缺乏时谷胱甘肽合成减少,肠黏膜上皮细胞抗ROS能力降低易引起损伤;Gln能减轻LPS和TNF对肠黏膜上皮细胞凋亡的影响,Gln缺乏时会引起肠上皮细胞凋亡加速. 另外,在创伤、休克、感染、放化疗等病理情况下,机体对营养物质的消耗明显增多,特别是对Gln的消耗增多更明显. 由于机体的组织、细胞对Gln的利用远远超过生成,如果没有外源性补充也可引起Gln相对不足而导致肠黏膜屏障受损.

## 2 结论

引起肠黏膜屏障损伤的原因种类繁多而且相当复杂,引起肠黏膜屏障损伤的机制有些还不十分清楚,如缺血-再灌注损伤、肠道正常菌群失调、免疫缺陷引起的损伤等都需要进一步研究、探讨. 随着研究的逐步深入,肠黏膜屏障损伤的原因与机制会逐渐清楚,为临床预防和治疗细菌移位、SIRS和MODS奠定基础.

### ■名词解释

中性粒细胞“呼吸爆发”:指中性粒细胞吞噬病原微生物后,在短时间内大量消耗氧的情况下,产生对组织细胞具有损伤作用的 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、HOCl的现象.

## ■同行评价

本文内容丰富, 参考文献引用合理, 对该领域的研究具有指导意义.

## 3 参考文献

- 1 Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- 2 马涛, 尤胜义. 淋巴细胞凋亡, 免疫抑制和脓毒症. 国外医学·外科学分册 2005; 32: 35-38
- 3 杨书良, 李兰梅, 陈育民. 肠黏膜屏障的构成与功能研究进展. 临床荟萃 2008; 23: 1809-1811
- 4 Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520
- 5 Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34
- 6 Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery* 2002; 131: 241-244
- 7 黎介寿. 肠衰竭—概念: 营养支持与肠黏膜屏障维护. 肠外与肠内营养 2004; 11: 65-67
- 8 Walser EM, Nealon WH, Marroquin S, Raza S, Hernandez JA, Vasek J. Sterile fluid collections in acute pancreatitis: catheter drainage versus simple aspiration. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006; 29: 102-107
- 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 Surg Res* 2000; 89: 26-30
- 10 杨武, 肖桦, 黄勇坤. 肠屏障功能障碍发生机制与诊断治疗. 实用儿科临床杂志 2007; 22: 1514-1515
- 11 李洋, 刘作金, 龚建平. 肝缺血—再灌注损伤对大鼠肠黏膜屏障功能及肠道菌群易位的影响. 中华器官移植杂志 2007; 28: 152
- 12 Teke Z, Sacar M, Yenisey C, Atalay AO, Kavak T, Erdem E. Activated protein C attenuates intestinal mucosal injury after mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2008; 149: 219-230
- 13 韩丽莎, 王芳, 胡海, 张坤. 肝缺血—再灌注损伤致多脏器损伤的实验研究. 内蒙古医学杂志 2007; 39: 156-158
- 14 王宏. 缺血—再灌注损伤对大鼠肠黏膜及运动功能的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 43-48
- 15 Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000; 14: 522-527
- 16 何维. 医学免疫学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 149
- 17 张嘉, 刘瑞林, 刘牧林. 肠道屏障功能损伤机制的研究进展. 蚌埠医学院学报 2005; 30: 277-279
- 18 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3131-3135
- 19 Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, Mashimo H, Collins SM. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G865-G874
- 20 王嘉川. 内毒素血症在重症肝炎发病中的作用. 寄生虫与感染性疾病 2006; 4: 40-41
- 21 高金生, 时志民, 韩转叶, 李校天, 杨书良. 肝硬化肠黏膜屏障损伤患者血浆D-乳酸、二胺氧化酶及内毒素的变化. 临床荟萃 2009; 24: 219-221
- 22 Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004; 9: 180-197
- 23 Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 333-346
- 24 Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633
- 25 Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 426-430
- 26 李兰娟. 感染与微生物学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 295-300
- 27 Lewis K, Caldwell J, Phan V, Prescott D, Nazli A, Wang A, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM, McKay DM. Decreased epithelial barrier function evoked by exposure to metabolic stress and nonpathogenic *E. coli* is enhanced by TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G669-G678
- 28 白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3187-3191
- 29 何新颖, 唐志鹏, 张亚丽. 肠上皮屏障与炎症性肠病研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3316-3320
- 30 喻文立. 谷氨酰胺的肠保护功能研究进展. 中国医药 2007; 2: 316
- 31 De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-1135
- 32 Singleton KD, Wischmeyer PE. Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock* 2006; 25: 295-299

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/>在线提交未成功, 请通过[submission@wjgnet.com](mailto: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/tgxx.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 2009-05-28)

# 肉桂油对小鼠胃白念珠菌感染的治疗作用

马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联

马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联, 河北医科大学第二医院 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 马耀辉与邓洁华对此文所作贡献均等; 此课题由马耀辉、王刚生、四荣联、邓洁华及张晓光设计; 研究过程由马耀辉、邓洁华、张晓光及王爱学操作完成; 数据分析由马耀辉、邓洁华及张晓光完成; 本论文写作由马耀辉、邓洁华及张晓光完成。

通讯作者: 马耀辉, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院皮肤科. myhui@hb2h.com

电话: 0311-66002738

收稿日期: 2009-03-17 修回日期: 2009-04-29

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-28

## Therapeutic effect of cinnamon oil on gastric *candida albicans* infection in mice

Yao-Hui Ma, Jie-Hua Deng, Gang-Sheng Wang, Xiao-Guang Zhang, Ai-Xue Wang, Rong-Lian Si

Yao-Hui Ma, Jie-Hua Deng, Gang-Sheng Wang, Xiao-Guang Zhang, Ai-Xue Wang, Rong-Lian Si, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Yao-Hui Ma, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. myhui@hb2h.com

Received: 2009-03-17 Revised: 2009-04-29

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate feasibility of treating gastric *candida albicans* infection with cinnamon oil.

**METHODS:** One hundred and twenty mouse models of *candida albicans* infection were established and randomly divided into four groups ( $n = 30$ ). Three cinnamon oil treatment groups were given 1.25 g/L, 1.88 g/L, 2.5 g/L cinnamon oil solution 1 mL by gastric intubation daily, while the control group was given 50 g/L glucose solution 1 mL by gastric intubation daily. Ten days later, fungal microscopy and histopathological examination were performed on stomach tissue of mice.

**RESULTS:** Positive rates of fungal microscopy and histopathological examination in cinnamon oil treatment groups were significantly lower than control group ( $\chi^2 = 14.14, 6.97, 7.04; 30.08, 25.36, 28.09$ , all  $P < 0.01$ ). No significant differ-

ence was observed among three cinnamon oil treatment groups ( $\chi^2 = 2.04, 0.28, P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Three concentrations of cinnamon oil can kill gastric *candida albicans* and cinnamon oil can be used for the treatment of gastric *candida albicans* infection.

**Key Words:** Cinnamon oil; Mouse; Stomach; *Candida albicans*

Ma YH, Deng JH, Wang GS, Zhang XG, Wang AX, Si RL. Therapeutic effect of cinnamon oil on gastric *candida albicans* infection in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1545-1547

## 摘要

**目的:** 探讨肉桂油治疗胃白念珠菌感染的可行性。

**方法:** 制作胃白念珠菌感染小鼠120只, 随机分为4组, 每组30只。肉桂油治疗组分3组, 每天给予1 mL 1.25、1.88、2.5 g/L肉桂油溶液灌胃, 对照组每天给予50 g/L葡萄糖溶液1 mL灌胃, 10 d后取小鼠胃组织行真菌镜检及组织病理检查, 发现白念珠菌菌丝为阳性。

**结果:** 3个浓度的肉桂油治疗组的真菌镜检及组织病理检查阳性率均显著低于对照组 ( $\chi^2 = 14.14, 6.97, 7.04; 30.08, 25.36, 28.09$ , 均  $P < 0.01$ ), 肉桂油治疗组之间比较无差异 ( $\chi^2 = 2.04, 0.28, P > 0.05$ )。

**结论:** 三种浓度肉桂油均可杀死小鼠胃内的白念珠菌, 肉桂油可用来治疗胃白念珠菌感染。

**关键词:** 肉桂油; 小鼠; 胃; 白念珠菌

马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联. 肉桂油对小鼠胃白念珠菌感染的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(15): 1545-1547

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1545.asp>

## 0 引言

念珠菌是人体常见寄生菌, 最常见的致病菌株

## ■背景资料

临床上高效安全的抗真菌药物数目较少, 因此念珠菌感染常呈致死病因, 经研究许多中药体外有良好的抗真菌作用。

## ■同行评议者

赵平, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

## ■相关报道

张文平 *et al* 通过肉桂醛体外诱导白色念珠菌耐药的实验发现肉桂醛有良好的抗白念珠菌活性, 并对氟康唑耐药的白念珠菌有效。

为白念珠菌<sup>[1]</sup>。白念珠菌为条件致病菌, 常寄生于正常人皮肤、口腔、肠道、阴道等处, 以消化系带菌率最高, 约占正常人的30%-50%<sup>[2]</sup>。胃溃疡合并白念珠菌感染者占16%<sup>[3]</sup>。抗真菌药物中两性霉素B、5-氟胞嘧啶不良反应大, 氟康唑耐药现象日趋严重, 使临床念珠菌感染的治疗面临极大的挑战<sup>[4]</sup>。但许多中药对念珠菌都有极好的抑菌和杀菌作用<sup>[5]</sup>, 本实验用不同浓度肉桂油治疗小鼠胃白念珠菌感染, 为肉桂油应用于临床白念珠菌治疗提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 普通级昆明小鼠120只, 体质量约25 g, 雌雄各半, 购买于河北医科大学实验动物中心。白念珠菌来自河北医科大学第二医院皮肤性病科真菌室。肉桂油由河北医科大学生物医学工程中心提供。

## 1.2 方法

1.2.1 肉桂油溶液配制: 取肉桂油与吐温-80均匀混合后溶于50 g/L葡萄糖溶液中, 使最终浓度为1.25、1.88、2.5 g/L。

1.2.2 分组及处理: 实验小鼠给予腹腔内注射40 g/L环磷酸腺苷溶液0.02 mL/g体质量, 同时用3 g/L冰醋酸溶液0.5 mL灌胃, 2 h后给予浓度 $5.5 \times 10^{12}$  白念珠菌菌悬液0.5 mL灌胃, 制作胃白念珠菌感染小鼠模型, 造模后小鼠随机分为4组(每组30只), 肉桂油治疗组分3组(1.25、1.88、2.5 g/L, 1 mL灌胃), 连续10 d; 对照组给予50 g/L葡萄糖溶液(含吐温-80, 1%)1 mL灌胃, 连续10 d。

1.2.3 实验小鼠胃外观、真菌镜检及胃取材: 第10天取4组存活小鼠分别为26、24、27、22只, 断颈处死, 取约大米粒大小胃组织置于含1滴100 g/L KHO溶液的载玻片上, 放入60℃电热恒温水浴箱中溶解10 min, 取出盖上盖玻片轻压并用吸水纸吸干。置于普通光学显微镜下寻找孢子及菌丝。同时分别剪取约0.5 cm×0.5 cm胃壁, 无菌生理盐水冲洗后, 置于40 g/L甲醛溶液中固定。

1.2.4 组织染色: 所有胃组织取材行HE染色。胃组织真菌镜检或HE染色中发现白念珠菌菌丝为阳性, 分别记录4组真菌镜检、组织HE染色阳性数。

**统计学处理** 用SPSS13.0统计学软件进行 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

肉桂油治疗组真菌镜检阳性率显著低于对照组( $\chi^2 = 14.14, 6.97, 7.04$ , 均 $P < 0.01$ )。肉桂油治疗组

表 1 4组真菌镜检及组织病理HE染色阳性率比较  $n(\%)$ 

分组	n	真菌镜检		HE染色	
		阳性	阴性	阴性	阳性
治疗组(g/L)					
2.5	26	3(11.5) <sup>b</sup>	23(88.5)	23(88.5)	3(11.5) <sup>b</sup>
1.88	24	6(25.0) <sup>b</sup>	18(75.0)	20(83.3)	4(16.7) <sup>b</sup>
1.25	27	7(25.9) <sup>b</sup>	20(74.1)	23(85.2)	4(14.8) <sup>b</sup>
对照组	22	14(63.6)	8(36.4)	2(9.1)	20(90.9)
合计		30(30.3)	69(69.7)	68(68.7)	31(31.3)

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

之间真菌镜检阳性率无差异( $\chi^2 = 2.04, P > 0.05$ )。肉桂油治疗组组织病理HE染色阳性率显著低于对照组( $\chi^2 = 30.08, 25.36, 28.09$ , 均 $P < 0.01$ )。肉桂油治疗组之间组织病理HE染色阳性率无差异( $\chi^2 = 0.28, P > 0.05$ , 表1)。

## 3 讨论

白念珠菌在院内真菌感染中占首位, 有效的抗真菌药物较少。目前抗真菌药物如两性霉素B、5-氟胞嘧啶、制霉菌素及唑类抗真菌药物治疗白念珠菌有效, 然而, 两性霉素B、5-氟胞嘧啶不良反应较多, 氟康唑和伊曲康唑毒性低, 但长期使用易产生耐药性。龙丰 *et al* 通过对248株白念珠菌和新型隐球菌对4种抗真菌药的敏感性研究发现白念珠菌对氟康唑的耐药率为9.37%<sup>[6]</sup>。夏海 *et al* 对148株念珠菌的药敏分析发现念珠菌对咪康唑、益康唑、酮康唑耐药率较高<sup>[7]</sup>。

肉桂油是一种成分复杂的芳香精油, 主要成分是肉桂醛, 含量在80%以上, 经多项体外实验证实肉桂油有较强的抗真菌作用, 包括曲霉菌、皮肤癣菌等<sup>[8-11]</sup>。宫毓静 *et al* 用肉桂的乙醇提取物通过半固体药基混合法抑菌试验发现肉桂油有很强的抗白念珠菌活性<sup>[12]</sup>。张文平 *et al* 通过实验测定其对白念珠菌的最低抑菌浓度为0.014 mg/L, 最低杀菌浓度为0.056 mg/L<sup>[13]</sup>, 除抗真菌外肉桂油兼有健胃及抗溃疡的作用<sup>[14]</sup>。

本实验将肉桂油配制成2.5、1.88、1.25 g/L 3种浓度, 给胃白念珠菌感染模型小鼠<sup>[15]</sup>灌胃治疗10 d, 发现3种浓度肉桂油均表现出良好的抗胃白念珠菌效果( $P < 0.01$ )。证实肉桂油作为胃白念珠菌感染的治疗药物是可行的。

## 4 参考文献

- 1 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and

## ■名词解释

肉桂油: 为中药肉桂中的挥发油, 主要成分为桂皮醛、乙酸桂皮酯、乙酸苯丙酯等。现代药理研究证明, 肉桂油有扩张血管、抗血小板聚集、解热镇痛、抗惊厥、促进胃肠运动、缓解胃肠痉挛性疼痛、抑菌、抗真菌等作用。

- clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85
- 2 张学军, 刘维达, 何春涤. 现代皮肤病学基础. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 946
- 3 Scott BB, Jenkins D. Gastro-oesophageal candidiasis. *Gut* 1982; 23: 137-139
- 4 Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 113-119
- 5 马廉兰, 张文平, 曾祥凤, 张瑞芸, 程小浪. 116种中草药对白念珠菌的抑菌实验. 赣南医学院学报 1998; 18: 189-192
- 6 龙丰, 张永信, 李民, 章强强, 王家俊. 248株念珠菌和新型隐球菌对四种抗真菌药的敏感性. 中国抗生素杂志 2002; 27: 305-308
- 7 夏海, 饶丽华. 148株念珠菌的分离鉴定及药敏分析. 实用医技杂志 2005; 12: 3246-3247
- 8 王刚生, 姜少灏, 邓洁华. 肉桂油抗曲霉菌活性实验. 河北医科大学学报 2007; 28: 447-448
- 9 张文娟. 肉桂醛抗条件致病性真菌作用的研究. 临床皮肤科杂志 1995; 24: 219-220
- 10 谢小梅, 张文平, 傅颖媛, 许杨. 肉桂醛与柠檬醛抗曲霉菌作用机制的研究. 中草药 2004; 35: 430-432
- 11 张文平, 刘志春, 刘建新, 傅颖媛. 微量法测定肉桂醛、柠檬醛体外抗深部真菌活性. 赣南医学院学报 2004; 24: 364-366
- 12 宫毓静, 安汝国, 虞慧, 王理达, 郑俊华, 果德安. 164种中药乙醇提取物抗真菌作用研究. 中草药 2002; 33: 42-47
- 13 张文平, 王小丽, 黄真, 谢水祥. 肉桂醛体外诱导白色念珠菌耐药的实验. 中国临床康复 2006; 10: 148-150
- 14 曾正渝, 兰作平. 肉桂的研究现状及应用进展. 现代医药卫生 2007; 23: 59-60
- 15 马耀辉, 王刚生, 邓洁华, 张晓光, 王爱学, 四荣联. 小鼠胃白念珠菌感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2009; 17: 303-306

## ■同行评价

本研究选题新颖, 实用性较强, 但需进一步深入研究.

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志数字用法标准

**本刊讯** 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

# 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价

安 钰, 白殿卿, 付 健, 孙晓宁

## ■背景资料

目前有关IBS模型甚多,但都是基于IBS发病的一种因素而制成的模型。本文将采用乙酸灌肠加束缚应激制造D-IBS动物模型并对其进行评价,有望为炎症后IBS发病机制的实验研究提供新的依据。

安钰,宁夏医科大学宁夏回族自治区银川市750004  
白殿卿,海南省人民医院实验动物中心 海南省海口市570311  
付健,海南医学院药物安全评价中心 海南省海口市571101  
孙晓宁,海南省人民医院消化内科 海南省海口市570311  
海南省自然科学基金资助项目, No. 30855  
作者贡献分布: 本课题实验操作、数据分析和论文撰写由安钰完成; 由白殿卿与付健指导实验; 由孙晓宁设计并负责全程指导。  
通讯作者: 孙晓宁, 主任医师, 570311, 海南省海口市秀英区秀华路19号, 海南省人民医院消化内科。xnsun-0108@163.com  
电话: 0898-68622426  
收稿日期: 2009-01-10 修回日期: 2009-03-25  
接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-28

## Establishment and evaluation of a rat IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress

Yu An, Dian-Qing Bai, Jian Fu, Xiao-Ning Sun

Yu An, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China  
Dian-Qing Bai, Laboratory Animal Center, Hainan People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China  
Jian Fu, the Center of Drug Safety Assessment, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China  
Xiao-Ning Sun, Department of Gastroenterology, Hainan People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 30855

Correspondence to: Xiao-Ning Sun, Department of Gastroenterology, Hainan People's Hospital, 19 Xiuhua Road, Xiuying District, Haikou 570311, Hainan Province, China. xnsun-0108@163.com  
Received: 2009-01-10 Revised: 2009-03-25  
Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To explore the method to establish a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and to provide experimental evidence for future research.

**METHODS:** Forty male Wistar rats were divided into four groups: IBS1 group, IBS2 group, positive group and normal control group. A rat model of IBS was established by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress and using Williams method. Visceral hypersensitivity was evaluated

by abdominal with-drawal reflex and abdominal electrical activity, while histological diversification was evaluated by histological examination.

**RESULTS:** Visceral hypersensitivity (abdominal with-drawal reflex and abdominal electrical activity) was significantly enhanced in two model groups than two control groups ( $F = 6.318, 3.978, 7.810$ , all  $P < 0.05$ ;  $F = 6.318, 3.978, 7.810$ , all  $P < 0.05$ ). There were no signs of obvious inflammation in the rats of each group.

**CONCLUSION:** A rat model of IBS induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress and Williams method is in accord with visceral hypersensitivity of IBS, feasible for experimental study.

**Key Words:** Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Rat model; Abdominal with-drawal reflex; Abdominal electrical activity

An Y, Bai DQ, Fu J, Sun XN. Establishment and evaluation of a rat IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1548-1551

## 摘要

**目的:** 探讨腹泻型肠易激综合征(D-IBS)动物模型的建立方法。

**方法:** ♂ Wistar大鼠40只, 随机分为IBS1组、IBS2组、灌肠对照组及正常对照组, 每组10只, 采用乙酸灌肠加束缚应激和Williams方法制造IBS动物模型, 用腹壁撤退反射(AWR)评分和腹外斜肌放电活动检测对其内脏敏感性, 同时行组织学检查对肠黏膜的组织学改变进行评价。

**结果:** 两模型组大鼠AWR评分和腹外斜肌收缩次数在不同扩张容量(1.0、1.5、2.0 mL)下均较对照组明显增加( $F = 6.318, 3.978, 7.810$ , 均 $P < 0.05$ ;  $F = 6.318, 3.978, 7.810$ , 均 $P < 0.05$ )。组织学分析显示各组大鼠均无明显的炎症性表现。

## ■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科; 潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

**结论:** 乙酸灌肠加束缚应激和Williams方法制成的IBS动物模型均符合IBS的内脏敏感性机制, 可用于IBS的实验研究。

**关键词:** 腹泻型肠易激综合征; 大鼠模型; 腹壁撤退反射; 腹外斜肌放电活动

安钰, 白殿卿, 付健, 孙晓宁. 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1548-1551  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1548.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)以腹痛或腹部不适、大便习惯(腹泻、便秘或腹泻与便秘交替)和(或)大便性状的改变等为主要临床表现, 多为慢性、间歇性发作, 经检查无特异的生物化学或形态组织学异常<sup>[1]</sup>. 可以说IBS是生理-心理-社会疾病的典型代表, 不是一种能够通过确切的病理生理或均一的临床表现而确定的疾病. 其病因涉及精神因素、遗传、感染、食物过敏、神经内分泌等因素, 其发病的机制主要与内脏感觉过敏、胃肠动力学异常、肠道感染和心理等因素有关<sup>[2-5]</sup>. 目前较成熟或研究中常用的IBS动物模型多是根据以上的一个因素或一种机制建立的. 本文将采用乙酸灌肠加束缚应激制造D-IBS动物模型并对其进行评价, 有望为炎症后IBS发病机制的实验研究提供新的依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年♂Wistar大鼠40只, 体质量 $200 \pm 5$  g, 购自湖南疾病预防控制中心, 实验动物生产许可证号: SYXK(湘)2003-0002. RM6280C型多道生理信号采集处理系统和针型插入型电极均由成都仪器厂提供. 8F导尿管(直径2 mm, 球囊最大容量3 mL, 最大直径2 cm)用作结直肠内球囊扩张导管(浙江康康医疗器械有限公司生产)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 整个实验操作过程均饲养于标准的II级动物房. 适应性饲养1 wk后随机分为4组: IBS<sub>1</sub>组: 乙酸灌肠+束缚应激组; IBS<sub>2</sub>组: 束缚应激组; 灌肠对照组: 生理盐水+束缚应激组; 正常对照组, 每组10只。

**1.2.2 大鼠模型制备:** IBS<sub>1</sub>组: 实验前24 h禁食不禁水, 乙醚麻醉后经肛门插入连接注射器的硅胶管(距肛门8 cm), 结肠内灌入40 mL/L的乙酸1 mL, 缓慢拔出硅胶管, 用手压迫肛门并将大鼠

尾巴抬高30 s, 后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠. 放回笼中自由活动进食水, 于第7天行束缚应激, 将大鼠置于一限制起肢体但不影响其呼吸的特制透明圆柱形筒内, 3 h后将大鼠放入饲养笼中<sup>[6]</sup>; 灌肠对照组: 用生理盐水1 mL代替乙酸灌肠, 其余方法相同; IBS<sub>2</sub>组: 按照Williams方法<sup>[7]</sup>略作修改, 束缚前禁食24 h不禁水, 乙醚麻醉后, 用宽胶带束缚前肩、前上肢及胸部, 限制前上肢搔抓头面部, 但不限制其活动, 束缚时间为1 h; 正常对照组: 不做任何处理。

**1.2.3 腹壁撤退反射评分:** 大鼠实验前24 h禁食不禁水, 在30 g/L戊巴比妥钠腹腔注射(1 mL/kg)麻醉下, 将涂石蜡油的带气囊的8F导尿管经肛门插入(使气囊末端插入肛门内7.0 cm/1.0 cm, 在肛门外1.0 cm处将其固定在大鼠尾根部)后, 将大鼠放入特制的透明塑料桶笼内(18 cm×5 cm×7 cm)中, 只能前后运动不能转身, 待大鼠适应环境30 min后开始实验. 每只大鼠给予球囊扩张3次, 容量分别为1.0、1.5、2.0 mL, 每次扩张持续5 min, 间隔30 s(以防肠道缺血)。

腹壁撤退反射(abdominal with-drawal reflex, AWR)评分标准<sup>[8]</sup>: 0分, 给予结直肠扩张刺激时大鼠情绪基本稳定; 1分, 给予刺激时变得不稳定, 偶尔扭动头部; 2分, 腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面; 3分, 腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面; 4分, 腹部肌肉强烈收缩, 腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面。

**1.2.4 腹壁肌电活动:** 记录腹壁肌电活动评估肠道敏感性<sup>[9]</sup>: 大鼠实验前24 h禁食不禁水, 大鼠在30 g/L戊巴比妥钠腹腔注射(1 mL/kg)麻醉下, 将涂石蜡油的带气囊的8F导尿管经肛门插入(使气囊末端插入肛门内7.0 cm/1.0 cm, 在肛门外1.0 cm处将其固定在大鼠尾根部)后, 大鼠固定在手术台上, 将银丝双极电极插入腹股沟韧带上方、剧中线1.5 cm一侧腹外斜肌上, 待大鼠适应30 min后, 每只大鼠给予球囊扩张3次, 容量分别为1.0、1.5、2.0 mL, 每次扩张持续5 min, 间隔30 s(以防肠道缺血), 记录5 min内腹外斜肌的收缩次数. 肌电活动增高超过基线水平100  $\mu$ V以上为一次有意义的腹部收缩活动。

**1.2.5 组织形态学检查:** 肌电活动测定结束后, 给予过量的麻醉药将大鼠处死, 分别取横结肠、降结肠及直肠组织各1块, 40 g/L甲醛溶液固定, 苏木素-伊红染色, 显微镜下观察肠黏膜病理组织学改变。

**统计学处理** 用SPSS13.0统计学软件进行统

## ■ 研发前沿

IBS是常见的功能性胃肠疾病, 目前发病机制尚未明确, 正确而合理的动物模型仍是目前的重点和热点。

## ■ 相关报道

国外学者Kim *et al* 对乙酸灌肠方法制造IBS大鼠模型进行了动态观察, 初步证实乙酸灌肠方法可用于IBS实验研究。

### ■创新盘点

乙酸灌肠加束缚应激方法制成的IBS模型大鼠内脏敏感性较对照组显著增高,且组织学检查与对照组无差异,说明该方法制成的大鼠模型符合IBS的特征,且他也避免了传统束缚应激方法的不足,可用于IBS的实验研究。

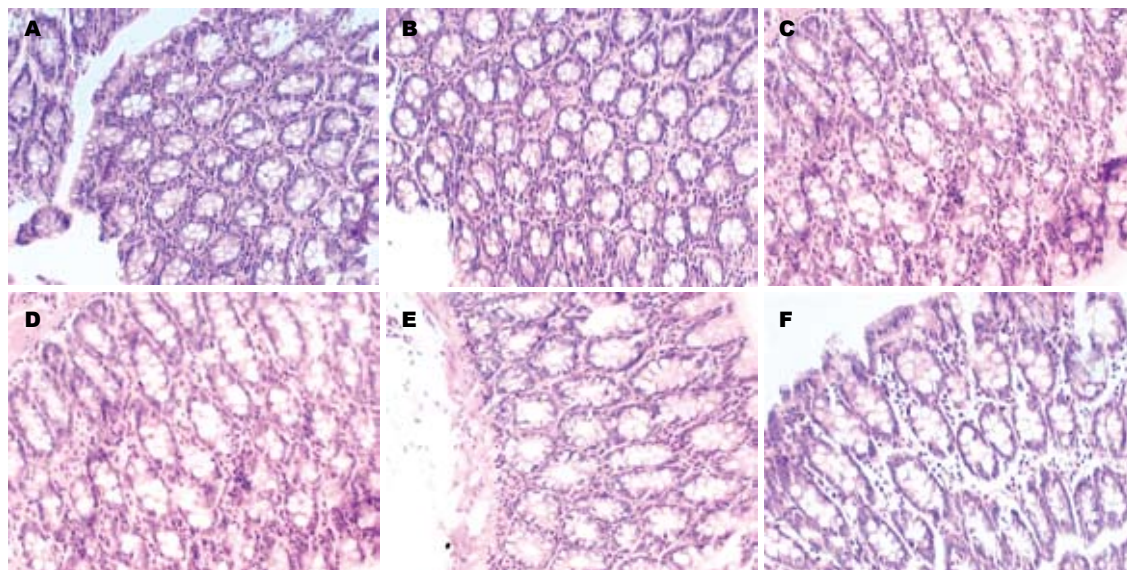


图1 各组大鼠肠黏膜病理组织学改变(HE × 100). A-C: 两对照组的横结肠、降结肠和直肠; D-F: 两模型组的横结肠、降结肠和直肠。

表1 各组大鼠在不同扩张容量下AWR评分和腹壁机电活动次数(每5 min)比较 (mean ± SD)

分组	AWR评分			腹壁机电活动		
	1 mL	1.5 mL	2.0 mL	1 mL	1.5 mL	2.0 mL
IBS <sub>1</sub> 组	1.5 ± 0.5 <sup>ab</sup>	2.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>ab</sup>	6.4 ± 0.8 <sup>b</sup>	11.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	16.4 ± 2.1 <sup>b</sup>
IBS <sub>2</sub> 组	1.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>ab</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	10.9 ± 1.7 <sup>ab</sup>	17.9 ± 3.1 <sup>b</sup>
灌肠对照组	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.7	3.0 ± 0.7	2.7 ± 0.7	8.0 ± 2.2	11.2 ± 1.8
正常对照组	1.0 ± 0.5	1.9 ± 0.6	2.7 ± 0.7	3.0 ± 0.9	8.7 ± 1.5	10.9 ± 1.5

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

计学分析. 计量数据以mean ± SD表示.  $P < 0.05$ 被认为具有显著性统计学差异。

## 2 结果

2.1 各组大鼠AWR评分及腹壁机电活动比较 在不同扩张容量下, 模型组大鼠AWR评分较对照组明显增加, 提示其内脏敏感性增加( $F_{1.0}$ 、 $F_{1.5}$ 和 $F_{2.0}$ 分别为6.318、3.978和7.810,  $P < 0.05$ ), 而两模型组之间无显著性差异(表1)。

2.2 各组大鼠腹壁机电活动水平比较 与AWR评分结果相似, 模型组大鼠腹外斜肌收缩次数较对照组明显增加, 进一步提示其内脏敏感性增加( $F_{1.0}$ 、 $F_{1.5}$ 和 $F_{2.0}$ 分别为29.744、7.816、26.499,  $P < 0.05$ ), 即所谓的痛觉过敏, 而两模型组之间无显著性差异(表1)。

2.3 各组大鼠肠黏膜病理组织学改变的比较 各组大鼠肠黏膜组织结构完整, 均无充血、水肿、溃疡, 显微镜下观察无炎症细胞浸润等组织学改变(图1)。

## 3 讨论

IBS动物模型可归纳为3种类型: 致中枢兴奋性增高IBS动物模型(束缚-制动应激、游泳致疲劳等), 外周致敏IBS动物模型(感染后肠功能紊乱), 两者联合作用IBS动物模型. 传统的第1类IBS动物模型的理论依据是应激可产生IBS样症状, 但研究多为急性应激与胃肠道功能的关系, 而IBS患者具有多次反复受躯体心理因素刺激而发病或复发的特点. Williams *et al*<sup>[7]</sup>早在1988年即在大鼠轻度乙醚麻醉状态下, 给予前肩、上肢和胸部等束缚以限制其活动后研究动力改变, 并证明了此应激可以改变大鼠小肠和直肠传输时间、增加排便次数, 并且是一种较轻微的、非溃疡形成的刺激, 因此作为较典型动物模型被后人广泛用于IBS的实验研究. 后在2005年, 吕红 *et al*<sup>[10]</sup>对传统的束缚应激(即Williams方法)动物模型进行了新的评价, 发现束缚应激后大鼠在不同容量级别下的腹壁肌肉收缩次数均较对照组明显增多, 同时无论对照组还是束缚应激

组大鼠的腹壁肌肉收缩次数均随气囊容量增加而增加, 出现了类似人类IBS的内脏高敏现象, 说明束缚应激模型除可用于动力研究外, 还可进行内脏敏感性的研究. 本文的研究结果与吕红 *et al*<sup>[10]</sup>的研究相似, 也发现束缚应激后大鼠的内脏敏感性较对照组增高, 且肠黏膜组织学检查无水肿、充血及炎症细胞浸润等组织学改变, 符合IBS的内脏高敏感性和无生化及病理组织学改变特征.

外周为靶点制造的模型研究较多的是病原体感染<sup>[2]</sup>和化学刺激物诱导制成的IBS动物模型<sup>[11]</sup>. 新近的研究发现<sup>[6]</sup>, 乙酸灌肠7 d后肠黏膜组织学和髓过氧化物酶活性恢复正常, 但大鼠对直肠扩张刺激的敏感性持续增高, 并且束缚应激可以引起大鼠排便的明显增多, 这些表现与IBS的特征吻合. 鉴于IBS病因的复杂性、病机的多重性, 因此, 建立多成分综合性动物模型更符合IBS的实际情况.

由此, 本文采用了乙酸灌肠加束缚应激制造了IBS的动物模型<sup>[6]</sup>. 研究发现, 实验发现乙酸灌肠7 d后结肠组织学检查正常, 但大鼠对结直肠球囊扩张刺激的敏感性增高(模型组的AWR评分及腹壁肌电活动均较对照组明显增加), 而灌肠对照组大鼠对结直肠球囊扩张刺激的敏感性与正常对照组无差异, 故排除了损伤因素所导致的内脏敏感性增高, 与徐俊荣 *et al*<sup>[12]</sup>研究结果相同. 且常规组织学检查与单纯束缚应激(即Williams法)组大鼠的肠黏膜组织学改变无差异, 均未发现水肿、充血及炎症细胞浸润等病理学改变, 故也排出了化学性刺激引起的内脏敏感性增高, 也更好的模拟了IBS的多因素发病机制, 反映了炎症和心理应激在IBS发病中的作用. 进

一步证实了这种方法造成的IBS动物模型是可靠的. 但需注意乙酸灌肠加束缚应激制成的IBS动物模型的致敏部位为结肠, 而Williams法制成的IBS动物模型的致敏部位为直肠.

#### 4 参考文献

- 1 莫剑忠, 袁耀宗, 邹多武. 消化系功能性和动力障碍性疾病. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 280-298
- 2 Mayer EA. Emerging disease model for functional gastrointestinal disorders. *Am J Med* 1999; 107: 12S-19S
- 3 侯晓华. 功能性胃肠疾病与内脏感觉过敏. 基础医学与临床 2003; 23: 6-7
- 4 刘新光. 感染与胃肠功能性疾病及动力障碍. 基础医学与临床 2003; 23: 9-11
- 5 赵晓志, 王邦茂, 杨玉龙, 蒋晓忠. 肠易激综合症患者在直肠冷/热刺激扩张实验中的感觉变化探讨. 基础医学与临床 2003; 23: 84-85
- 6 La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795
- 7 Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988; 94: 611-621
- 8 Ness TJ, Gebhart GF. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoreflexes in the rat. *Brain Res* 1988; 450: 153-169
- 9 林国威, 张睿, 林春. 慢性内脏痛觉敏感化模型的两行为学评价指标比较. 中国疼痛医学杂志 2007; 13: 153-156
- 10 吕红, 王伟岸, 钱家鸣. 传统束缚应激动物模型内脏感觉的新评价. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 111-113
- 11 Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, Weingarten HP. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology* 1996; 111: 1509-1515
- 12 徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明. 从肠肌间神经对抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2332-2338

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志被收录情况

**本刊讯** 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

## 正丁酸盐诱导的大鼠非炎症性结肠致敏模型

叶建明, 胡品津, 薛存宽, 何学斌, 蒋朋, 汪晓珍

### ■背景资料

IBS的内脏致敏模型的制作方法很多,常用方法是用幼鼠给予机械或炎症性刺激、部分束缚刺激,费时较长,且一些炎症刺激物质如芥子油、三硝基苯磺酸(TNBS)、肠道感染等,可能造成肠道黏膜损害,与IBS真实情况不完全相符。本课题组采用正丁酸盐灌肠制作的非炎症性内脏高敏感模型制作时间短,无结直肠黏膜损害,且各项指标符合要求,在研究IBS的内脏高敏感中有一定的意义。

叶建明, 中山市人民医院消化内科 广东省中山市 528403  
胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080  
薛存宽, 何学斌, 蒋朋, 华中科技大学同济医学院老年医学研究所 湖北省武汉市 430077  
汪晓珍, 中山市人民医院儿科 广东省中山市 528403  
广东省中医药局建设中医药强省科研基金资助项目, No. 2007290

作者贡献分布: 叶建明与胡品津对此文所作贡献均等; 此课题由叶建明与胡品津设计; 研究过程由叶建明、胡品津、薛存宽、何学斌、蒋朋及汪晓珍操作完成; 研究所用繻草波春由薛存宽提供; 数据分析由叶建明完成; 本论文写作由叶建明完成。

通讯作者: 叶建明, 副主任医师, 528402, 广东省中山市石岐区孙文中路2号, 中山市人民医院消化内科. yjm3839@sina.com

电话: 0760-8840528

收稿日期: 2009-02-15 修回日期: 2009-04-10

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

### A butyrate-induced model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats

Jian-Ming Ye, Pin-Jin Hu, Cun-Kuan Xue, Xue-Bin He, Peng Jiang, Xiao-Zhen Wang

Jian-Ming Ye, Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China

Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun-Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Cun-Kuan Xue, Xue-Bin He, Peng Jiang, Institution of Geriatric Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430020, Hubei Province, China

Xiao-Zhen Wang, Department of Pediatrics, Zhongshan people's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation of Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province on constructing advantageous province of Traditional Chinese Medicine, No. 2007290

Correspondence to: Jian-Ming Ye, Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China. yjm3839@sina.com

Received: 2009-02-15 Revised: 2009-04-10

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

### Abstract

**AIM:** To investigate Butyrate-enema's efficacy on visceral hypersensitivity in rats and to explore a new method of establishing a model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats.

**METHODS:** Rats of the model group received

enemas of 1 mL of butyrate solution (300 mmol/L) twice a day for 6 d. After 3 d or 6 d when the model of visceral hypersensitivity was built, scores of abdominal withdrawal reflex (AWR) in colorectal distention (CRD) were recorded. Hypersensitivity parameters were determined. Meanwhile, the pressure thresholds of initial sensation and most endurance thresholds were recorded. Macroscopic and histologic activities of MPO and counting of mast leukocyte and eosinophile granulocyte were performed on colonic mucosa tissue at the end of the experiment.

**RESULTS:** Macroscopic and histologic activities of MPO analyses, counting of mast leukocyte and eosinophile granulocyte were not significantly different between control group and experimental group. At day 6, there was a significant increase in scores of CRD in experimental group against control group for the most pressure ( $t = 9.25, P < 0.01$ ). There were a significant increase in average and highest pressure of colorectal motion in experimental group against control group ( $t = 36.71, 15.02$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Butyrate-enema may lead to colonic hypersensitivity while not bring damages to colonic mucosal structure. Colonic hypersensitivity has no correlation with mast cells.

**Key Words:** Butyrate; Irritable bowel syndrome; Visceral; Hypersensitivity; Wistar rats; Rectal distension

Ye JM, Hu PJ, Xue CK, He XB, Jiang P, Wang XZ. A butyrate-induced model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1552-1557

### 摘要

**目的:** 研究正丁酸盐结肠灌注对大鼠结肠敏感性的影响, 探讨结肠致敏模型制作的新方法。

**方法:** Wistar大鼠每天接受浓度为300 mmol/L 丁酸盐1 mL从肛门灌肠2次, 共6 d。分别在造模3、6 d后以半定量的方法观察大鼠对直肠

### ■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室; 蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

扩张(CRD)的反应, 进行结肠敏感性评估, 记录初始感觉压力和最大耐受压力. 实验后处死大鼠, 取距肛门10 cm的结直肠, 观察肠黏膜损伤指数, 病理检查观察组织病理改变.

**结果:** 模型组和盐水对照组均未见黏膜及黏膜下层组织结构破坏, 黏膜下嗜酸性粒细胞计数、肥大细胞计数无显著差异. 造模6 d模型组结肠运动最大压力较盐水对照组明显升高, 差异有显著意义( $t = 9.25, P < 0.01$ ). 模型组初始压力感觉及最大耐受压力较盐水对照组明显降低, 差异有显著意义( $t = 36.71, 15.02$ , 均  $P < 0.01$ ).

**结论:** 正丁酸盐灌肠可以使结肠敏感性增加, 不破坏结肠黏膜组织结构, 结肠黏膜致敏与肥大细胞无关.

**关键词:** 正丁酸盐; 肠易激综合征; 内脏; 高敏性; 大鼠; 直肠扩张

叶建明, 胡品津, 薛存宽, 何学斌, 蒋朋, 汪晓珍. 正丁酸盐诱导的大鼠非炎症性结肠致敏模型. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1552-1557  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1552.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的病因和发病机制并不完全清楚, 主要与肠道动力异常、内脏感觉异常、炎症、脑肠肽、遗传因素、食物因素以及近几年提出的肠道神经内分泌网络调控失常有关. 对于IBS的研究模型的制作有许多方法, 一些是通过刺激中枢(如新生期精神应激、创伤后应激紊乱), 一些通过刺激外周(如感染和炎症), 这些可对动物造成暂时或永久性损害<sup>[1]</sup>. 上述模型只是模仿了IBS的某些生理特征, 有较大的局限性. 以往IBS被认为是由于肠功能紊乱和痛感异常所引起, 但近年来许多研究显示IBS与内脏的高敏感性异常现象有关, 内脏敏感性增高是IBS的重要病理生理特征之一, 是胃肠运动紊乱、腹痛及症状多样化的原因<sup>[2]</sup>. 内脏高敏感性动物模型的建立有许多方法, 常用方法是用幼鼠给予机械或炎症性刺激、部分束缚刺激, 费时较长, 需8-21 d, 且一些炎症刺激物质如芥子油、三硝基苯磺酸(TNBS)、肠道感染等, 可能造成肠道黏膜损害, 与IBS真实情况不完全相符<sup>[3-4]</sup>. Bourdu *et al*<sup>[5]</sup>报道用正丁酸盐(butyrate)以不同浓度(8-1000 mmol/L)给成年大鼠灌肠, 发现造模仅3 d, 各项

指标符合要求, 除内脏敏感性增加外, 皮肤痛觉敏感性亦增加, 同时无肠黏膜损害. 我们以300 mmol/L丁酸盐进行如下实验, 观察丁酸盐对大鼠结肠内脏敏感性的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Spague-Dawley ♂ 大鼠16只, 平均体重250 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 丁酸钠( $C_4H_7O_2Na$ )厦门农牧发展有限公司产, 批号2003.1456, 多聚甲醛, Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

### 1.2 方法

**1.2.1 正丁酸盐溶液配制:** 正丁酸盐用pH为6.9的磷酸缓冲液配制成300 mmol/L溶液备用.

**1.2.2 分组及造模:** 将动物分为实验组及对照组, 各8只. 实验前让动物先适应环境1 wk, 1笼4只. 根据动物福利相关法律要求尽可能避免、减少动物不适. 丁酸盐(Butyrate)灌肠: 大鼠每天接受300 mmol/L丁酸盐从肛门灌肠2次, 每次1 mL, 共6 d. 灌肠管为直径2 mm的血管成形气囊代替Fogarty catheter管, 插入肛门深度为7 cm.

**1.2.3 模型评估:** 在造模3、6 d后进行. 用20 g/L的异氟烷(isoflurane)麻醉, 麻醉后放入40 cm×40 cm的盒内, 用长9 cm血管成形气囊, 插入距肛门7 cm处, 气囊可测压. 直肠扩张(colorectal distension, CRD)的压力为1.33、2.66、3.99、5.32、6.65、7.98 kPa, 以半定量的方法观察大鼠对CRD的反应. 评分标准为: 0分, 对CRD无反应; 1分, 简单的头部运动, 而后不动; 2分, 腹部肌肉收缩; 3分, 腹部肌肉收缩提起; 4分, 部分身体弓起, 胯部上提. 上述观测10 min. 记录初始感觉压力和最大耐受压力. 初始感觉压力即大鼠对结肠压力升高开始有行为反应时的压力. 最大耐受压力为大鼠在出现身体弓起, 胯部上提时的结肠压力.

**1.2.4 标本留取:** 实验结束后, 用30 g/L戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 剂量0.1 mL/100 g, 剪开颈总动脉插管灌注生理盐水, 剪开腹主动脉放血, 血放尽后予40 g/L多聚甲醛冲洗固定, 30 min后, 分别留取横结肠、直肠标本(2-3cm). 标本放入40 g/L多聚甲醛中固定, 梯度脱水、浸蜡, 制成蜡块备用.

**1.2.5 观察结直肠病理改变:** 处死大鼠后, 取距直肠15 cm肠段, 观察肠段损伤指数, 并留标本病理检查, HE染色, 用显微镜观察并予嗜酸性粒细胞和肥大细胞计数. 肉眼观用modified Morris

■**研发前沿**  
IBS内脏高敏感模型制作方法很多, 但如何接近其发病机制而又制作简便、费时少是目前研究的热点.

## ■相关报道

Bourdu *et al*报道用正丁酸盐(butyrate)以不同浓度(8-1000 mmol/L)给成年大鼠灌肠,发现造模仅3 d,各项指标符合要求,除内脏敏感性增加外,皮肤痛觉敏感性亦增加,同时无肠黏膜损害。

scoring method: 0分,无损伤;1分,局部糜烂,但无溃疡;2分,有1处溃疡和炎症;3分,2处或/更多的地方有炎症或溃疡。

1.2.6 结肠运动压力变化:在结肠内插入测压气囊后,给予一定的初始压力(囊内注入0.2 mL生理盐水,初始压力为40 mmHg),连接压力换能器,用苹果计算机分析,记录时间为10 min. 分别记录平均压力、最大压力(均为记录压力减去基础压力)。

1.2.7 嗜酸性粒细胞和肥大细胞计数:在放大400倍的条件下,随机观察固有膜层10个视野,计数嗜酸性粒细胞和肥大细胞个数,表达为每视野平均细胞个数。

1.2.8 肠黏膜髓过氧化物酶(MPO)活性测定:大鼠处死后,取冻存结肠黏膜层组织称质量,在4℃下制成匀浆,收集上清液,用BECKMAN DU650分光光度计测定其在 $A_{437nm}$ 值,并换算为酶活性单位(IU/g上清蛋白)。

**统计学处理** 统计数字以mean±SD表示,数据用方差分析、*t*检验分析,统计资料用统计表和图表示,所有资料用SPSS11.0统计软件分析。

## 2 结果

2.1 丁酸盐灌肠对各项生理参数的影响 用丁酸盐灌肠,与等量生理盐水灌肠比较,观察大鼠6 d内各项指标变化,发现体质量以及食物摄取、水摄取、尿量、粪干质量与体质量之比差异均无显著性( $P>0.05$ ,表1)。

2.2 丁酸盐灌肠对结肠黏膜的影响 在4 wk实验结束后取结肠黏膜肉眼观察、放大镜下观察并检测MPO活性,予肥大细胞及嗜酸性粒细胞计数,结果显示:与生理盐水对照组比较,差异均无显著性( $P>0.05$ ,表2)。

2.3 盐水对照组和模型组结肠组织改变 结肠组织石蜡包埋HE染色后,分别放大×40和×100倍观察,模型组和盐水对照组均未见黏膜及黏膜下层组织结构破坏(图1)。

2.4 第3、6天不同压力直肠扩张对模型的影响 压力为0、1.33、7.98 kPa时,两组积分无差异(标准差为0),在压力为2.66 kPa时积分差异无显著意义( $t = -1, P>0.05$ )、压力为3.99、5.32及6.65 kPa时,模型组较对照组积分明显升高,差异均有显著意义( $t_1 = -4.58, P<0.01$ ;  $t_2 = -3.66, P<0.01$ ;  $t_3 = -3.06, P<0.05$ ,表3)。

2.5 造模3、6 d对结肠运动平均压力、最大压力及最大耐受压力的影响 造模3 d平均压力较

表 1 丁酸盐灌肠对各项生理参数的影响 (mean ± SD)

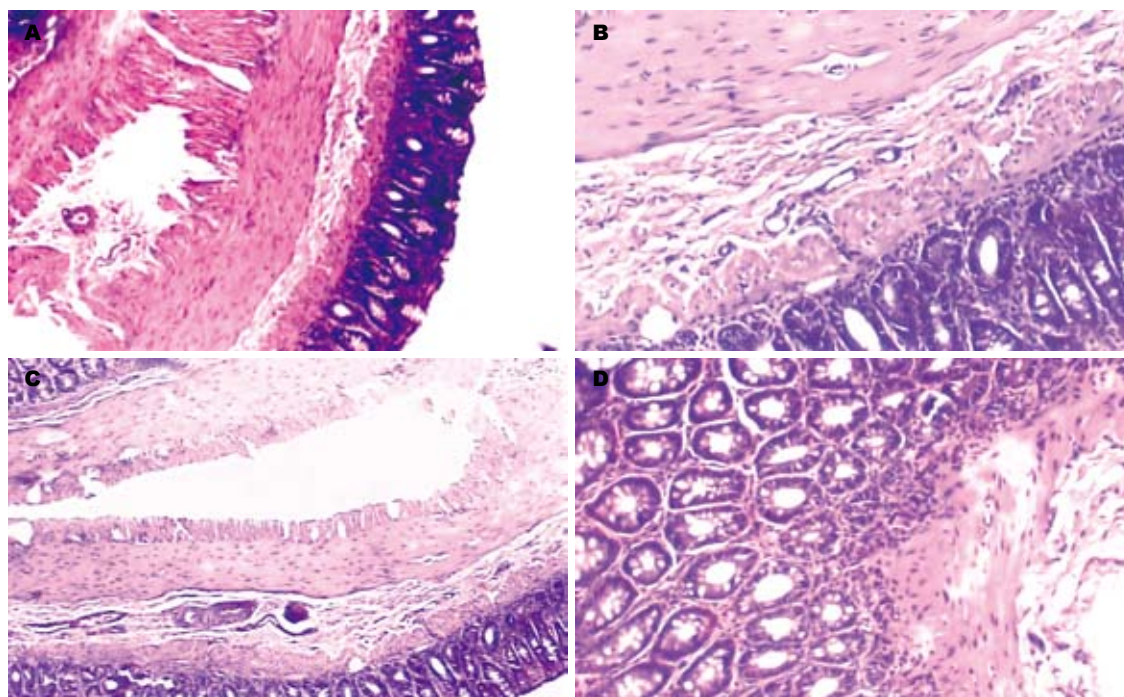
	0 d	3 d	6 d
体质量(g)			
丁酸盐	235 ± 3	260 ± 3	280 ± 4
生理盐水	253 ± 5	270 ± 6	285 ± 7
食物摄取/体质量			
丁酸盐	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
生理盐水	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
水摄取/体质量			
丁酸盐	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01
生理盐水	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
尿量/体质量			
丁酸盐	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
生理盐水	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
粪干质量/体质量			
丁酸盐	17 ± 2	18 ± 1	15 ± 1
生理盐水	15 ± 1	14 ± 1	16 ± 1

表 2 丁酸盐对结肠黏膜的影响

	生理盐水	丁酸盐肉眼损伤
评分		
Morris Score	0	0
MPO活性(IU/g蛋白)	ND	ND
组织学改变	无	无
肥大细胞	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01
嗜酸性粒细胞	4.4 ± 1.20	3.6 ± 0.50

盐水对照组无显著改变( $t_1 = -1.744, P>0.05$ )、造模6 d模型组结肠运动平均压力较盐水对照组明显升高,差异有显著意义( $t_2 = -3.81, P<0.01$ )。造模组6 d与3 d比较,差异无显著意义( $t = 0.28, P>0.05$ ,图2A)。造模3 d结肠运动最大压力较盐水对照组无显著差异( $t = -1.47, P>0.05$ )、造模6 d模型组结肠运动最大压力较盐水对照组明显升高,差异有显著意义( $t = -3.81, P<0.01$ )。造模组6 d与3 d比较,差异无显著意义( $t = 0.28, P>0.05$ )(图2B)。造模3 d、6 d模型组最大耐受压力较盐水对照组明显降低,差异有显著意义( $t_1 = 23.64, P<0.01$ ;  $t_2 = 20.56, P<0.01$ )。模型组6 d与3 d最大耐受压力比较差异无显著意义( $t = -1.53, P>0.05$ ,图2C)。

2.6 造模3、6 d的初始压力感觉 模型组初始压力感觉较盐水对照组明显降低,差异有显著意义( $t_1 = 2.96, P<0.05$ ;  $t_2 = 3.87, P<0.01$ )。模型组6 d与3 d的初始压力感觉比较差异无显著意义( $t = 0.55, P>0.05$ ,图2D)。



## ■应用要点

正丁酸盐为体内常见的食物代谢产物, 与其他化学药物比较具有接近不良反应小、不引起结肠黏膜损害、符合IBS的优点。

图 1 两组大鼠结肠组织病理变化(HE染色). A: 对照组(×40); B: 对照组(×100); C: 实验组(×40); D: 实验组(×100).

表 3 不同压力直肠扩张积分(分)

时间(d)	分组	压力(kPa)					
		1.33	2.66	3.99	5.32	6.55	7.98
3	对照组	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.46	1.38 ± 0.52	1.63 ± 0.74	2.50 ± 0.53	3.63 ± 0.52
	实验组	1.00 ± 0.00	1.38 ± 0.52	2.13 ± 0.35	3.25 ± 0.46	3.50 ± 0.43	3.75 ± 0.46
6	对照组	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.71	1.37 ± 0.52	1.63 ± 0.74	2.50 ± 0.76	3.50 ± 0.53
	实验组	1.00 ± 0.00	1.63 ± 0.74	2.38 ± 0.92	3.50 ± 0.53	3.63 ± 0.74	3.75 ± 0.71

### 3 讨论

法国学者Bourdu *et al*<sup>[5]</sup>用不同浓度的正丁酸钠(8-1000 mmol/L)灌肠3 d, 发现结肠及皮肤敏感性增加, 且对结肠黏膜无器质性损害, 对大鼠的各项生理参数如体质量、食物摄取、水摄取、尿量、干粪质量及粪的水含量等无影响. 杜亚平 *et al*<sup>[6]</sup>用200 mmol/L的正丁酸盐灌肠18 d, 发现可诱导内脏过敏, 亦无结肠黏膜组织病理学改变.

Drossman *et al*研究认为<sup>[7-8]</sup>肥大细胞广泛存在于人类胃肠道, 其分布及状态改变与胃肠道的敏感性有关, 心理压力、肠道感染和食物过敏是IBS症状的诱发因素, 且多解释为肥大细胞激活所致<sup>[9-13]</sup>. 本研究结肠组织病理学检查未见组织有炎症改变, MPO活性无增加, 炎性细胞亦无增加, 反应大鼠代谢的各项生理指标如体质量、食物摄取、尿量、粪量、粪水含量等与盐水对照组无差异, 这与法国学者结果一致.

在评价直肠扩张时的内脏敏感性, 以腹部

回撤反射记录和衡量大鼠直肠球囊扩张的初始感觉、最大耐受感觉和平均压力在研究中广泛使用<sup>[14]</sup>, 我们选择非麻醉大鼠进行上述实验, 避免了麻醉对内脏感觉的影响.

本研究选用300 mmol/L丁酸盐造模, 分别于第3天和第6天对有关指标进行检测, 发现第3天和第6天, 对从0-60 mmHg不同压力的直肠扩张, 直肠扩张反应在压力为0和10 mmHg, 各组无差异, 随着压力逐步升高, 积分亦逐步增加. 直肠扩张的初始压力感觉和最大压力耐受阈值均明显降低, 直肠运动的平均压力和最大压力均升高. 造模6 d与3 d比较, 除结肠运动平均压力和最大压力升高更明显外, 其余主观指标均无显著差异. 从上述指标看造模后内脏敏感性有明显升高, 造模3 d各项指标均基本符合模型要求, 增加3 d造模时间模型敏感性有所增加, 但与3 d比较差异无显著性.

对模型的评价有许多方法, 常用的有直肠

# 同行评价

本研究通过正丁酸盐灌肠诱导制作产生内脏高敏感大鼠模型,为IBS的研究提供了有效工具,有一定实用价值。

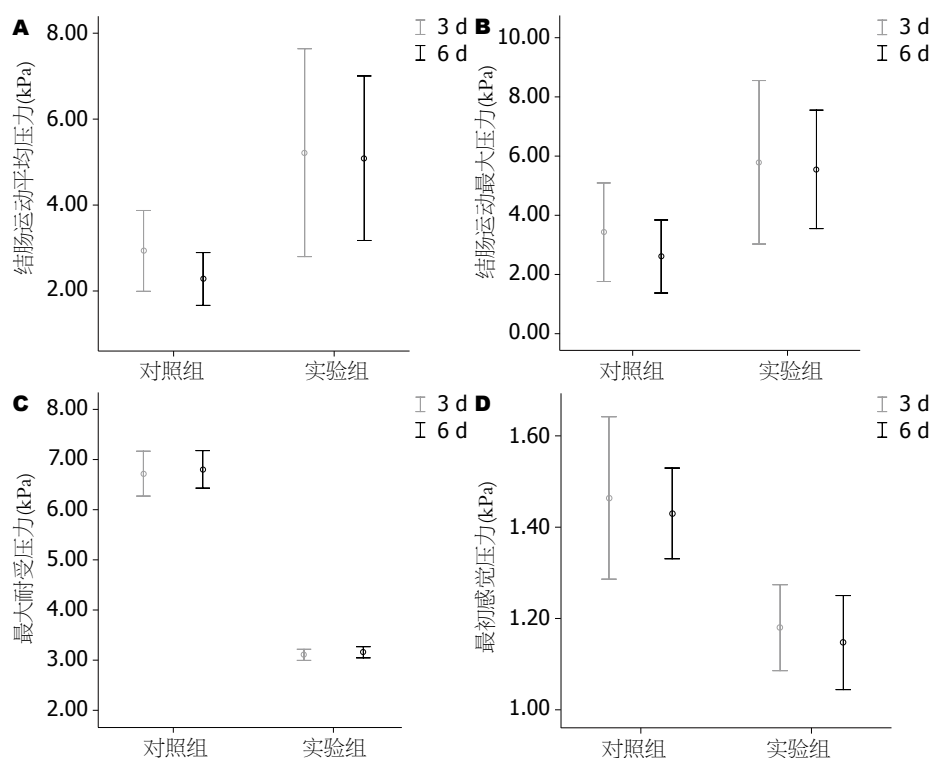


图2 造模3、6 d对结肠运动压力的影响。A: 平均压力; B: 最大压力; C: 最大耐受压力; D: 初始感觉压力。

扩张积分法、结肠动力检测法、对疼痛敏感性的皮肤针刺法、腹壁肌电活动记录法、脊髓诱发电位记录法及组织病理学检测<sup>[3,15-16]</sup>等,以直肠扩张观察腹部回缩反射(AWR)最常用,能在某种程度上反应大鼠的内脏敏感性,且实验方法简便易行。本模型的成功在4方面有重要意义:(1)可直接用成年鼠造模,使实验简化,操作更容易;(2)用时较少,仅用3-6 d就可造模成功;(3)对黏膜无损害,更接近IBS的真实情况,更能反应IBS的实质;(4)不改变体质量、食物摄取、尿量、粪量等生理参数,符合IBS为功能性肠病的要求。一般认为IBS模型的内脏高敏感雌鼠更明显<sup>[17]</sup>,这与临床上常见的女性IBS患者对直肠扩张比男性更敏感是一致的<sup>[18]</sup>。尽管本实验的所选大鼠为雄性,但实验结果符合要求。用正丁酸盐造模的原理主要是与正丁酸盐影响结肠黏膜下肽能C-纤维的敏感性有关,使肽能C-纤维发生可塑性改变。肽能C-纤维与IBS的内脏高敏感有明确的关系<sup>[19]</sup>,他直接影响脊髓背角的神经传导。如乳鼠用辣椒素破坏C-纤维,则正丁酸盐不能诱导形成IBS模型。当乳鼠用辣椒素预处理后,可下调脊髓伤害性信号输入,导致VR1辣椒素受体(TRPV1)选择性的消除。还可修饰调节脊髓背角对脊髓伤害的甩尾反射,TRPV1还广泛分布于脑组织及一些与伤害性反应有关的中枢组织,如导水管周围灰质、丘脑的神经元,真正确切

的功能还不太清楚。肽能C-纤维含钙相关调节蛋白(CGRP),可被CGRP受体拮抗剂CGRP8-37阻断, Friese *et al*报道 $\mu$ 和 $\kappa$ 鸦片受体激动剂可降低CGRP诱导的腹痛<sup>[20]</sup>。NK1受体拮抗剂对疼痛阈值无影响,也意味着P物质无影响,不过也有相反的报道<sup>[21]</sup>。普遍认为IBS的发病与食物因素有相当大的关系,一些食物以及一些食物的代谢产物可引起IBS及其他功能性胃肠病。研究发现部分IBS患者结肠正丁酸水平升高<sup>[5]</sup>,可能与摄食含某种纤维的食物有关,所以对待人们普遍认为的食物纤维对IBS有利的观点需区别对待。我们所用的正丁酸盐为体内常见的食物代谢产物,与其他化学药物比较具有接近不良反应小、不引起结肠黏膜损害、符合IBS的优点。

## 参考文献

- Diop L, Raymond F, Fargeau H, Petoux F, Chovet M, Doherty AM. Pregabalin (CI-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1013-1022
- Delvaux M. Role of visceral sensitivity in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i67-i71
- Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000; 119: 1276-1285
- Mayer EA, Naliboff BD, Chang L. Evolving pathophysiological model of functional

- gastrointestinal disorders: implications for treatment. *Eur J Surg Suppl* 2002; 3-9
- 5 Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, Artigue F, Vasson MP, Dechelotte P, Bommelaer G, Eschaliere A, Ardid D. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 1996-2008
- 6 杜亚平, 刘谦, 钱伟, 侯晓华. 丁酸钠溶液灌肠对大鼠内脏感觉的影响. *胃肠病学* 2008; 13: 91-94
- 7 Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, Whitehead WE. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 2108-2131
- 8 Austin GL, Dalton CB, Hu Y, Morris CB, Hankins J, Weinland SR, Westman EC, Yancy WS Jr, Drossman DA. A Very Low-Carbohydrate Diet Improves Symptoms and Quality of Life in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 Mar 10. [Epub ahead of print]
- 9 董文珠, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 满小华. 肠易激综合征患者内脏高敏感性的机制研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 18-22
- 10 康明祥, 贾红. 肠易激综合征内脏高敏感性机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1554-1558
- 11 Gui XY. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 980-989
- 12 Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 727-737
- 13 陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 46-50
- 14 郭玉婷, 李延青, 庄明蕊, 欧阳建东, 夏培军, 左秀明, 张海燕, 匡荣光, 袁海鹏. 替加色罗治疗内脏高敏感大鼠前后感觉阈值的变化. *胃肠病和肝病杂志* 2004; 13: 377-380
- 15 王敬东. 脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3299-3301
- 16 胡品津. 从脑-肠互动的高度认识肠易激综合征. *中华消化杂志* 2003; 23: 261-262
- 17 任天华, 胡品津, 胡志远, 沈祖尧. 新生儿母婴分离对大鼠成年后结直肠扩张后5-羟色胺表达的影响. *中山大学学报(医学科学版)* 2004; 25: 234
- 18 Toner BB, Akman D. Gender role and irritable bowel syndrome: literature review and hypothesis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 11-16
- 19 Mayer EA, Naliboff B, Lee O, Munakata J, Chang L. Review article: gender-related differences in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13 Suppl 2: 65-69
- 20 Friesen N, Diop L, Chevalier E, Angel F, Rivière PJ, Dahl SG. Involvement of prostaglandins and CGRP-dependent sensory afferents in peritoneal irritation-induced visceral pain. *Regul Pept* 1997; 70: 1-7
- 21 Francis CY, Whorwell PJ. Bran and irritable bowel syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1994; 344: 39-40

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

# 丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆

## ■背景资料

结肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 严重的威胁了国民身体健康。对筛选结肠癌防治药物的研究具有重要的临床意义。丁酸钠是一种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂, 主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质的构象, 参与基因表达调控, 其控制多种肿瘤细胞生长, 诱导癌细胞分化成熟及癌细胞凋亡。通过对其作用机制的探讨, 寻找到治疗结肠癌分子靶点。

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆, 中国人民解放军广州军区武汉总医院医学实验科 湖北省武汉市 430070

作者贡献分布: 本实验设计由刁波完成; 唐瑛为实验负责人; 实验操作由文晔与王晓昆完成。

通讯作者: 唐瑛, 430070, 湖北省武汉市, 中国人民解放军广州军区武汉总医院医学实验科, maotou01@163.com

电话: 027-68878659

收稿日期: 2008-12-03 修回日期: 2009-03-23

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-28

## Sodium butyrate induces apoptosis and regulates caspase-3 in colorectal cancer cells COLO205

Bo Diao, Ying Tang, Ye Wen, Xiao-Kun Wang

Bo Diao, Ying Tang, Ye Wen, Xiao-Kun Wang, Department of Medicine Experiment, Wuhan General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Correspondence to: Ying Tang, Department of Medicine Experiment, Wuhan General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China. maotou01@163.com

Received: 2008-12-03 Revised: 2009-03-23

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To observe the regulatory effects of sodium butyrate on caspase-3 in COLO205 colorectal cancer cells, and to investigate the mechanisms of apoptosis in COLO205 induced by sodium butyrate.

**METHODS:** 1, 2, 4 mmol/L sodium butyrate were co-cultured with COLO205 cells for 48 h, respectively; the viability of COLO205 was detected using MTT method; the expression of caspase-3, using immunohistochemical method; the rate of apoptosis in COLO205, using flow cytometry.

**RESULTS:** Compared with negative control group, the viability of COLO205 ( $0.47 \pm 0.09$ ,  $0.40 \pm 0.03$ ,  $0.37 \pm 0.02$  vs  $0.55 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$  or  $0.01$ ) was lower obviously; sodium butyrate promoted the masculine expression of caspase-3 ( $31.9 \pm 1.15$ ,  $40.6 \pm 1.04$ ,  $51.7 \pm 1.17$  vs  $29.4 \pm 1.02$ ,  $P < 0.05$

or  $0.01$ ), and elevated the rate of apoptosis ( $8.27\% \pm 0.42\%$ ,  $15.1\% \pm 0.72\%$ ,  $21.6\% \pm 0.95\%$  vs  $7.0\% \pm 0.33\%$ ,  $P < 0.05$  or  $0.01$ ) in COLO205.

**CONCLUSION:** Sodium butyrate induces the apoptosis of COLO205 through enhancing the expression of caspase-3 gene.

**Key Words:** Sodium butyrate; Colorectal cancer; Apoptosis; Caspase-3

Diao B, Tang Y, Wen Y, Wang XK. Sodium butyrate induces apoptosis and regulates caspase-3 in colorectal cancer cells COLO205. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1558-1560

## 摘要

**目的:** 观察丁酸钠对COLO205结肠癌细胞株caspase-3的调控, 并探讨其诱导COLO205细胞株凋亡的机制。

**方法:** 1、2、4 mmol/L丁酸钠与结肠癌细胞共同培养48 h; MTT法测定细胞活性; 免疫组织化学法检测细胞中caspase-3的蛋白表达; 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

**结果:** 与阴性对照组比较, 1、2、4 mmol/L丁酸钠组细胞活性下降( $0.47 \pm 0.09$ ,  $0.40 \pm 0.03$ ,  $0.37 \pm 0.02$  vs  $0.55 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ); 丁酸钠能显著促进caspase-3蛋白的阳性表达( $31.9 \pm 1.15$ ,  $40.6 \pm 1.04$ ,  $51.7 \pm 1.17$  vs  $29.4 \pm 1.02$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), 增加COLO205细胞的凋亡率( $8.27\% \pm 0.42\%$ ,  $15.1\% \pm 0.72\%$ ,  $21.6\% \pm 0.95\%$  vs  $7.0\% \pm 0.33\%$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。

**结论:** 丁酸钠能通过上调caspase-3基因的表达并诱导COLO205细胞凋亡。

**关键词:** 丁酸钠; 结肠癌; 细胞凋亡; Caspase-3

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆. 丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控. *世界华人消化杂志* 2009; 17(15): 1558-1560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1558.asp>

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

## 0 引言

结肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一,居胃肠道肿瘤的第3位。好发部位为直肠及直肠与乙状结肠交界处,男女之比为2-3:1。丁酸钠是一种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质的构象,参与基因表达调控。丁酸钠可抑制多种肿瘤细胞生长<sup>[1-3]</sup>,诱导癌细胞分化成熟及癌细胞凋亡。

## 1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞株购置上海中科院细胞库;丁酸钠购置Sigma公司;caspase-3抑制剂Z-DEVD-FMK、碘化丙啶(PI)-Annexin-FITC凋亡检测试剂盒购置碧云天生物技术研究;胎牛血清购置Gibco公司;RPMI 1640细胞培养基购置Hyclone公司;caspase-3抗体及sABC试剂盒均购自武汉博士德生物公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: COLO205细胞培养在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640细胞培养基中,置于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 95%湿度, CO<sub>2</sub>培养箱中。调整细胞数至 $1 \times 10^9$ 个/L,将细胞悬液按100 μL/孔接种于96孔板中,2 mL/孔接种于6孔板,5 mL/瓶接种于25 cm<sup>3</sup>的细胞培养瓶每3天换液1次。实验时细胞应处在对数生长期,并具有>90%的细胞存活率。实验处理前,COLO205细胞需生长在不含胎牛血清的培养中,饥饿24 h,阴性对照组不加任何处理因素,实验组加入含终浓度为1、2、4 mmol/L丁酸钠的全培养基共同培养24 h。收集细胞,进行实验检测<sup>[4]</sup>。

1.2.2 MTT法检测细胞活性: 实验分组处理24 h后,吸走每孔的上清液,加入MTT 25 μL(5.0 μg/L),继续于37℃, CO<sub>2</sub>培养箱内温育4 h,终止培养,小心弃去孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,充分振荡10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪于492 nm波长处测定各孔的吸光度,用该值代表细胞活性。

1.2.3 caspase-3表达量的测定: 应用细胞爬片技术,按上述进行实验分组,干预因素处理完毕后,冰丙酮固定30 min,自然晾干。用30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇溶液,除去内源性过氧化氢酶;洗涤,100 mL/L羊血清封闭20 min;加入一抗(1:100兔抗鼠caspase-3抗体)4℃冰箱过夜;PBS洗涤3次;二抗(1:100生物素化山羊抗兔)37℃孵育20 min;PBS洗涤3次;DAB显色,复染,脱水,透明,封片。每张免疫组织化学片随机10视野,采用

HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统,选用阳性单位(positive unit, PU)指标定量表达免疫组织化学阳性反应<sup>[5]</sup>。

1.2.4 细胞凋亡率的检测: 弃除各组细胞上清培养基, PBS(pH7.2-7.4)轻洗2次, 2.5 g/L胰蛋白酶干消化3 min, RPMI 1640培养基重悬细胞,并调整细胞浓度为 $10^4$ 个/L, 1000 g离心5 min,弃除上清, PBS重悬细胞, 1000 g离心5 min,弃除PBS。FITC细胞结合液195 μL重悬细胞,加入5 μL Annexin-FITC, 25℃避光孵育10 min, 1000 g离心5 min,弃上清, FITC细胞结合液190 μL重悬细胞,加入10 μL PI染液及300 μL PBS共同冰孵5 min, 30 min内上机检测各组细胞凋亡率<sup>[6]</sup>。每组重复做4次。

1.2.5 caspase-3活性抑制实验: 根据上述实验选出丁酸钠诱导COLO205细胞凋亡的最佳浓度,以此浓度为作用基础,在加入丁酸钠前1 h加入终浓度为50 μmol/L的Z-DEVD-FMK,再加入丁酸钠溶液。共同培养24 h后,取出细胞检测caspase-3蛋白的表达及细胞凋亡率。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示,采用统计软件SPSS8.0进行单因素方差分析及t检验。

## 2 结果

2.1 丁酸钠对COLO205细胞活性的影响 实验结果显示,与阴性对照组比较,丁酸钠干预组细胞活性明显下降,并具有浓度依赖性(表1)。

2.2 丁酸钠对caspase-3表达量的影响 免疫组织化学法检测发现,阴性对照细胞caspase-3的阳性单位值低于丁酸钠干预组,并具有统计学意义,证实丁酸钠具有上调caspase-3蛋白表达的功能(表1)。

2.3 丁酸钠对细胞凋亡率的影响 丁酸钠3个剂量组均能明显增加COLO205细胞的凋亡率,具有统计学意义。当丁酸钠浓度越高,细胞凋亡率越高,呈现一定的浓度依赖性(表1)。

2.4 caspase-3活性抑制实验 当COLO205细胞经Z-DEVD-FMK处理完后,再加入终浓度为4 mmol/L丁酸钠进行干预,检测结果发现, caspase-3蛋白表达及细胞凋亡率与单纯丁酸钠干预组比较均下降,并具有统计学意义(表2)。

## 3 讨论

丁酸钠由厌氧菌分解发酵结肠中未经消化吸收的食物中的碳水化合物和蛋白产生,是结肠上皮细胞主要的能量来源,并能刺激结肠肽或生

### ■研发前沿

目前公认的治疗结肠癌的方法是以手术为主、并辅以化疗、免疫治疗、中药以及其他支持治疗的综合治疗。但术后复发和转移是患者死亡的重要原因。因此,筛选出结肠癌治疗的靶向药物,减轻患者的痛苦是目前研究结肠癌的热点及重点。

### ■应用要点

本文通过添加了caspase-3抑制剂,进一步证实丁酸钠可以通过激活caspase途径来诱导结肠癌细胞凋亡。因此,可以通过针对凋亡途径设计靶向药物诱导癌细胞凋亡。

### ■同行评价

本文主要介绍丁酸钠诱导凋亡的可能机制,有一定的研究意义和价值。

表 1 各组细胞活性(I)、凋亡率及caspase-3的PU值

分组	细胞活性(I)	凋亡率(%)	caspase-3(PI)
阴性对照组	0.55 ± 0.09	7.0 ± 0.33	29.4 ± 1.02
NaB 1 mmol/L	0.47 ± 0.09 <sup>a</sup>	8.27 ± 0.42 <sup>a</sup>	31.9 ± 1.15 <sup>a</sup>
2 mmol/L	0.40 ± 0.03 <sup>b</sup>	15.1 ± 0.72 <sup>b</sup>	40.6 ± 1.04 <sup>b</sup>
4 mmol/L	0.37 ± 0.02 <sup>b</sup>	21.6 ± 0.95 <sup>b</sup>	51.7 ± 1.17 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 阴性对照组, NaB: 丁酸钠。

表 2 caspase-3抑制实验中各组细胞凋亡率及PU值

分组	凋亡率(%)	caspase-3(PI)
阴性对照组	7.5 ± 0.46	33.5 ± 1.14
NaB	24.7 ± 0.88 <sup>b</sup>	53.9 ± 1.25 <sup>b</sup>
NaB+Z-DEVD-FMK	9.3 ± 0.69	42.4 ± 1.21

<sup>b</sup>P<0.01 vs NaB+Z-DEVD-FMK组, NaB: 丁酸钠。

长因子的释放,调节结肠黏膜血供促进上皮细胞的增生<sup>[7-9]</sup>。但丁酸钠还具有抑制肿瘤细胞增生,促进肿瘤细胞分化,调控肿瘤细胞的周期。丁酸钠是最主要的组蛋白乙酰化酶的抑制剂,增强组蛋白乙酰化酶的活性,导致组蛋白高度乙酰化,使组蛋白与相邻的DNA结合受到抑制,改变了染色质的紧密结合,有利于转录因子激活特异性的基因。如研究证实,丁酸钠作用于恶性间皮瘤细胞后,明显上调bcl-XL基因的表达,促进细胞的凋亡<sup>[10-11]</sup>。Bonnotte *et al*<sup>[12]</sup>研究发现丁酸钠能够明显增强Fas与FasL结合的灵敏度,促进肿瘤细胞凋亡。

本研究表明,丁酸钠对COLO205细胞的生长具有明显的抑制作用,并具有相应的浓度依赖性,随着药物浓度的增加,细胞活性也在下降。丁酸钠能上调caspase-3基因的表达,诱导COLO205细胞凋亡。当caspase-3被抑制后,丁酸钠诱导COLO205细胞凋亡的能力下降。大量实验研究证实,细胞凋亡途径大致有3条:死亡受体通路、线粒体通路、内质网通路。Nakagawa *et al*研究认为,丁酸诱导肿瘤细胞凋亡的机制是作用与内质网,由caspase级联活化所致。水解caspase-3前体,激活caspase-3蛋白,引发细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。这与本实验结果相符。

总之,丁酸钠能体外诱导结肠癌细胞株COLO205细胞凋亡,其机制可能与丁酸钠能上调caspase-3基因的表达进而促进细胞的凋亡。

### 4 参考文献

- 1 Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1141-1149
- 2 Sung YH, Hwang SJ, Lee GM. Influence of down-regulation of caspase-3 by siRNAs on sodium-butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metab Eng* 2005; 7: 457-466
- 3 Daehn IS, Varelías A, Rayner TE. Sodium butyrate induced keratinocyte apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1379-1390
- 4 Tsai CH, Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lo CS, Lin YH, Hu XW, Lin SR. Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer colo205 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 177-182
- 5 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ). 中国组织化学与细胞化学杂志 1995; 4: 89-91
- 6 Yang L, Zhou X, Yang J, Yin X, Han L, Zhao D. Aspirin inhibits cytotoxicity of prion peptide PrP106-126 to neuronal cells associated with microglia activation in vitro. *J Neuroimmunol* 2008; 199: 10-17
- 7 Blottière HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 101-106
- 8 Mazzoni M, Le Gall M, De Filippi S, Minieri L, Trevisi P, Wolinski J, Lalatta-Costerbosa G, Lallès JP, Guilloteau P, Bosi P. Supplemental sodium butyrate stimulates different gastric cells in weaned pigs. *J Nutr* 2008; 138: 1426-1431
- 9 Rishi P, Pathak S, Ricke SC. Short chain fatty acids influence virulence properties of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Environ Sci Health B* 2005; 40: 645-657
- 10 Cao XX, Mohiuddin I, Ece F, McConkey DJ, Smythe WR. Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 562-568
- 11 Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Gilardini Montani MS. Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 318-329
- 12 Bonnotte B, Favre N, Reveneau S, Micheau O, Droin N, Garrido C, Fontana A, Chauffert B, Solary E, Martin F. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death Differ* 1998; 5: 480-487
- 13 Nohara K, Yokoyama Y, Kano K. The important role of caspase-10 in sodium butyrate-induced apoptosis. *Kobe J Med Sci* 2007; 53: 265-273

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# caveolin-1、Dnmt1基因与胃癌发生发展的关系及其临床意义

刘斌, 顾立萍, 邢传平, 哈英娣, 高自芳, 苏勤军, 张俊会, 钱震, 董亮

刘斌, 顾立萍, 邢传平, 哈英娣, 高自芳, 苏勤军, 张俊会, 钱震, 董亮, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科 甘肃省兰州市 730050  
全军医药卫生科研基金资助项目, No. 06MB102  
甘肃省自然科学基金资助项目, No. 3ZS061-A25-094  
作者贡献分布: 此课题由刘斌设计并负责完成; 研究过程主要由顾立萍操作完成; 实验标本的病理分型由邢传平与哈英娣完成; 图像采集、分析由高自芳、苏勤军及张俊会完成; 数据分析由钱震与董亮完成; 本论文写作由刘斌与顾立萍完成。  
通讯作者: 刘斌, 主任医师, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科. liumb@public.lz.gs.cn  
电话: 0931-8994569 传真: 0931-8994566  
收稿日期: 2009-02-21 修回日期: 2009-04-18  
接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-05-28

## Clinical significance and association of caveolin-1 and Dnmt1 gene with carcinogenesis, development of gastric carcinomas

Bin Liu, Li-Ping Gu, Chuan-Ping Xing, Ying-Di Ha, Zi-Fang Gao, Qin-Jun Su, Jun-Hui Zhang, Zhen Qian, Liang Dong

Bin Liu, Li-Ping Gu, Chuan-Ping Xing, Ying-Di Ha, Zi-Fang Gao, Qin-Jun Su, Jun-Hui Zhang, Zhen Qian, Liang Dong, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Supported by: the Military Medical and Health Research Foundation, No. 06MB102, and the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 3ZS061-A25-094  
Correspondence to: Dr. Bin Liu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. liumb@public.lz.gs.cn  
Received: 2009-02-21 Revised: 2009-04-18  
Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of caveolin-1 and Dnmt1 genes in normal gastric mucosa and gastric carcinoma, and to detect methylation status of CpG island of caveolin-1 gene promoter region located in exon 1 and its clinical significance in gastric carcinoma.

**METHODS:** Methylation status of caveolin-1 gene in 60 gastric carcinoma cases and 14 normal gastric tissues was detected using Methylation-specific PCR (MSP). SP immunohistochemical method and *in situ* hybridization (ISH) were

used to detect the expression of caveolin-1 protein and Dnmt1 protein and mRNA.

**RESULTS:** The methylation rate of the 5' CpG island of caveolin-1 gene was 0% in 14 normal gastric tissues, and 73.3% in 60 gastric carcinoma cases. There was significant difference between two groups ( $P < 0.005$ ). Methylation status of caveolin-1 gene was related to the patient's age. The positive rates of caveolin-1 protein, Dnmt1 protein and mRNA were 30%, 63.3% and 53.3% in 60 gastric carcinoma cases.

**CONCLUSION:** The methylation and inactivation of caveolin-1 gene leads to carcinogenesis and development of gastric carcinomas by the function of Dnmt1 gene.

**Key Words:** Gastric carcinoma; Caveolin-1 gene; Dnmt1 gene; Methylation-specific PCR; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization

Liu B, Gu LP, Xing CP, Ha YD, Gao ZF, Su QJ, Zhang JH, Qian Z, Dong L. Clinical significance and association of caveolin-1 and Dnmt1 gene with carcinogenesis, development of gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1561-1566

## 摘要

**目的:** 研究正常胃黏膜及胃癌组织中caveolin-1、Dnmt1蛋白的表达, 并探讨caveolin-1、Dnmt1基因与胃癌发生发展的关系及其临床意义。

**方法:** 采取甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)检测不同分化程度的60例胃癌组织(其中包括新鲜组织50例、石蜡包埋组织10例)和14例正常胃组织中caveolin-1基因启动子区域甲基化状态; 同时用SP免疫组织化学法、原位杂交法检测caveolin-1蛋白、Dnmt1蛋白及mRNA的表达。

**结果:** 14例正常胃组织中, 未检测到caveolin-1基因甲基化; 在60例胃癌组织中, 检测到44例胃癌组织中存在甲基化, 甲基化发生率为73.33%, 两组间差异具有统计学意义( $P < 0.005$ )。caveolin-1基因甲基化的发生与患

## ■背景资料

本实验室的先前研究结果表明caveolin-1基因在胃癌组织中低表达甚至缺失, 推测其表达抑制发生在蛋白水平以前。大量的实验表明, Dnmt1的活性在肿瘤中表达增高, 且这可能与DNA甲基化及肿瘤的发生、发展有关, 但Dnmt1在胃癌中的表达及其与肿瘤发生发展的关系研究报道较少, 胃癌组织中caveolin-1基因的低表达与Dnmt1的关系如何, 则未见相关文献报道。

## ■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心; 钱睿哲, 教授, 复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室

## ■ 研发前沿

近几年研究发现DNA序列以外的调控机制异常在肿瘤的发生、发展过程中更为普遍、也更为重要,这种调控机制被称为表遗传学。DNA甲基化是表遗传学主要形式,现已成为近来备受关注的热点问题。DNA甲基化及相关基因在肿瘤发生中的关系及作用机制已成为急需解决的问题。

者年龄有关。60例胃癌标本中, caveolin-1蛋白阳性表达率仅为30%(18/60), Dnmt1蛋白阳性表达率为63.3%(38/60), Dnmt1基因mRNA阳性表达率为53.3%(32/60)。

**结论:** 在胃癌组织中, caveolin-1基因可能在Dnmt1基因的作用下发生甲基化, 丧失其活性, 进而导致胃癌的发生、发展。

**关键词:** 胃癌; caveolin-1基因; Dnmt1基因; 甲基化特异性聚合酶链反应; 免疫组织化学染色; 原位杂交

刘斌, 顾立萍, 邢传平, 哈英娣, 高自芳, 苏勤军, 张俊会, 钱震, 董亮. caveolin-1、Dnmt1基因与胃癌发生发展的关系及其临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1561-1566  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1561.asp>

## 0 引言

DNA甲基化不仅与基因调节机制密切相关, 还涉及胚胎发育、基因组印迹、X染色体失活、肿瘤的发生, 而且基因CpG岛区域过度甲基化对基因的表达发挥着重要的调节作用, 可导致基因在转录水平沉默<sup>[1]</sup>。在人类多种肿瘤中, 甲基化改变通常发生于正常情况下未甲基化的启动子CpG岛区域<sup>[2]</sup>。启动子CpG岛区域的超甲基化状态可以使一些抑癌基因(tumor suppressor genes)失活, 目前已在胃癌组织中检测到多种抑癌基因启动子区域CpG岛的过度甲基化以及该基因的失活, 如*p73*、*p16*、*E-cadherin*、*SOCS-1*、*RIZ1*、*RUNX3*、*Cyclin D2*、*hMLH1*、*CDH1*、*RAR-beta*等。抑癌基因的DNA甲基化被人们认为可能是导致胃癌众多因素中的一个重要机制, 是胃癌发生过程中的重要分子事件。Engelman *et al*<sup>[3]</sup>发现, 在人类乳腺癌细胞系中, caveolin-1基因由于5'端启动子CpG岛区域存在甲基化, 而使该抑癌基因失活, 导致肿瘤的发生。本实验室已采用免疫组织化学染色方法和原位杂交技术对胃癌组织中caveolin-1基因的表达状况进行了研究, 并发现caveolin-1基因在正常胃黏膜→不典型增生胃黏膜→胃癌中阳性表达率逐渐降低, 且组间差异性有统计学意义, 在胃癌组织中的阳性表达率仅为23.9%<sup>[4-5]</sup>。为探究caveolin-1基因在胃癌组织中表达降低乃至缺失的原因, 我们采用敏感性较高的甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)检测60例胃癌组织(其中包括新鲜组织50例、石蜡包埋组织10

例)、14例正常胃组织中的caveolin-1基因外显子1启动子CpG岛区域的甲基化状态, 并对此74例标本中caveolin-1蛋白、Dnmt1蛋白及Dnmt1基因mRNA的表达状况进行检测, 旨在研究caveolin-1基因异常甲基化及Dnmt1基因在胃癌发生发展中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 50例新鲜胃癌组织、10例石蜡标本及14例正常胃组织来自2007-05/2007-09在中国人民解放军兰州军区兰州总医院切除的胃癌标本。胃癌组包括男52例, 女8例, 年龄31-74(中位年龄60)岁。所有标本术前均未行放疗和化疗。所有标本均进行HE、免疫组织化学染色、原位杂交及MSP试验。MSP试剂盒购于美国Chemicon公司。caveolin-1基因外显子1的甲基化和非甲基化引物由大连宝生物工程有限公司合成, Taq酶、DL2000、琼脂糖粉、200 μL扩增管也购于该公司。caveolin-1抗体为鼠抗人mAb(稀释度为1:400)购于美国基因公司。Dnmt1抗体为鼠抗人mAb(原液浓度为400 mg/L, 工作液浓度为1.5 mg/L)购于美国Alexis公司。Pan-Path REMBRANT® Universal RISH & HRP Detection Kit(原位杂交检测试剂盒)购于Pan-Path公司, Dnmt1基因(基因序列号为NM\_001379)寡核苷酸探针为5'-TGGGAGGGTGGGTCTTGGAG-3', 探针片段长度20 bp, 两端标记地高辛, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 新鲜组织及石蜡包埋组织中DNA的提取:** 采用本实验室改进的运用饱和酚-氯仿抽提法从新鲜组织及石蜡包埋组织中提取DNA<sup>[6]</sup>, 通过紫外分光光度仪检测DNA含量, 从中选取 $A_{260}/A_{280}$ 在1.8-2.0的标本, 并应用电泳技术对DNA的完整性进行检测, 选取理想标本进行甲基化修饰。提取组织冻存于-40℃。

**1.2.2 DNA甲基化修饰:** 甲基化修饰严格按照试剂盒说明书进行, 修饰步骤简述如下: DNA修饰过程; 脱盐处理; 完全甲基化(脱磺酸基作用); 二次脱盐; DNA纯化。置于-40℃备用。

**1.2.3 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP):** 根据GenBank中caveolin-1基因外显子1的基因序列(AF095591), 采用Prime 5.0软件, 针对外显子1的启动子CpG岛区域设计并合成甲基化引物(methylation primer)及非甲基化引物(unmethylation primer), 产物大小为

139 bp(表1)。PCR运用25  $\mu$ L反应体系: 2.5  $\mu$ L dNTP Mixture(各2.5  $\mu$ mol/L); 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer( $Mg^{2+}$  Plus); 0.5  $\mu$ g模板; 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各1.5  $\mu$ L(非甲基化为2.0  $\mu$ L); 0.3  $\mu$ L Taq酶(5 U/ $\mu$ L)(非甲基化为0.5  $\mu$ L); 其余用灭菌三蒸水补足25  $\mu$ L。循环数设置为30个: 95.5 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95.5 $^{\circ}$ C变性30 s; 58.0 $^{\circ}$ C(非甲基化为48.0 $^{\circ}$ C)退火45 s; 72.0 $^{\circ}$ C复性45 s; 72.0 $^{\circ}$ C延伸7 min; 实验结束温度为40 $^{\circ}$ C。5  $\mu$ L PCR产物用20 g/L的琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后观察, 在紫外灯下观察, 凝胶成像系统成像。

1.2.4 甲基化判断标准: PCR扩增产物经电泳后, 出现一条或两条139 bp特异性目的条带视为实验成功; 反之, 则视为实验失败, 需重新实验。

1.2.5 caveolin-1基因、Dnmt1基因的蛋白及Dnmt1基因mRNA表达检测(免疫组织化学SP法及原位杂交): 免疫组织化学操作按照SP试剂盒所附说明进行。原位杂交技术: 整个实验操作均在无RNA酶的环境下进行, 切片厚4  $\mu$ m, 组织切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 37 $^{\circ}$ C经蛋白酶消化30 min; 在无水乙醇中脱水10 s, 每张切片上滴加一滴探针溶液, 盖上盖玻片37 $^{\circ}$ C过夜; TBS冲洗去除盖玻片, TBS洗片3 $\times$ 3 min; 加2-3滴地高辛抗体37 $^{\circ}$ C作用30 min; TBS洗片3 $\times$ 3 min; DAB显色; 苏木素复染; 以TBS缓冲液代替探针作阴性对照。本实验室先前研究显示: 在正常胃黏膜, caveolin-1蛋白表达均位于细胞质内, Dnmt1蛋白不表达(除部分增生的小凹和间质的淋巴细胞胞核)。原位杂交结果: 在正常胃黏膜, Dnmt1基因mRNA不表达。病变区域, caveolin-1蛋白不表达或着色减弱、Dnmt1蛋白阳性表达、Dnmt1基因mRNA阳性表达都判定为蛋白或mRNA表达异常。

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验, 使用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理, 显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 caveolin-1、Dnmt1蛋白及Dnmt1基因 mRNA的表达 在14例正常胃黏膜中, caveolin-1蛋白表达均位于细胞质内, Dnmt1蛋白不表达(除部分增生的小凹和间质的淋巴细胞胞核), Dnmt1基因mRNA不表达。60例胃癌组织中, caveolin-1蛋白阳性表达率仅为30.0%(9/30)(图1A-B), Dnmt1蛋白阳性表达率为63.3%(38/60)(图1C-D), Dnmt1基因mRNA阳性表达率为53.3%(32/60)(图1E-F, 表2)。

表1 caveolin-1基因外显子1启动子区域甲基化检测引物

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
caveolin-1-M	gggttcaaagcgaggaaatg(Sense) taggcactccccaaggttct(Antisense)	139
caveolin-1-U	gggtttaaagtgggaaatg(Sense) taaacactccccaaaattct(Antisense)	139

M: 甲基化引物; U: 非甲基化引物。

2.2 胃组织中caveolin-1基因甲基化状态 用caveolin-1基因甲基化引物caveolin-1-M和非甲基化引物caveolin-1-U分别对修饰后的14例正常胃组织和60例胃癌组织DNA进行扩增。14例正常胃标本均显示caveolin-1基因启动子区CpG岛甲基化阴性而非甲基化阳性。60例胃癌标本中, 73.3%(44/60)的癌组织检测出caveolin-1基因外显子1启动子CpG岛区域异常甲基化, 其中26例癌组织(43.3%)表现为完全甲基化; 18例癌组织(30.0%)表现为部分甲基化。癌组织caveolin-1基因甲基化率显著高于正常组织(Fisher确切概率发 $P < 0.0005$ , 图2, 表3)。

2.3 caveolin-1基因外显子1启动子CpG岛区域甲基化发生率与胃癌临床病理的关系 经 $\chi^2$ 检验, caveolin-1基因外显子1启动子CpG岛区域甲基化发生率在性别、肿物大小、有无脉管侵犯、有无淋巴结转移和浸润深度各组内阳性表达率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而与年龄有关( $P < 0.05$ , 表4)。

## 3 讨论

胃癌的发生是一个多阶段、多步骤的过程, 涉及肿瘤相关基因的遗传学(genetics)与表遗传学(epigenetics)的改变<sup>[7-8]</sup>。DNA甲基化紊乱与胃癌的发生密切相关。DNA甲基化通常发生在基因的CpG岛, 所谓CpG岛(CpG island)即是基因组中富含CpG二核苷酸的区域, 通常位于基因的5'端启动子区域, 呈不连续分布, 是基因具有活性的标志<sup>[9]</sup>。正常生理情况下, CpG岛多为非甲基化状态。近来研究表明, 在人类基因组中, 基因组总体水平降低和部分基因启动子区域高甲基化状况共存是DNA甲基化的总特征。DNA甲基化状态改变是肿瘤抑制基因的失活方式之一, 他通过基因机制和基因外机制导致细胞增殖和分化的相关基因表达异常, 造成细胞失去正常的基因调控而发生恶变。抑癌基因启动子区域的CpG

## ■相关报道

目前研究表明, caveolin-1能抑制癌细胞的转移, 促进癌细胞的分化; 在多种肿瘤中表达下降, 他在胃癌中的表达亦是如此, 且与胃癌的发生及演进过程密切相关。

## ■创新盘点

本文从分子水平初步揭示了caveolin-1基因在胃癌中失活的原因,即该基因启动子区域CpG岛的甲基化。

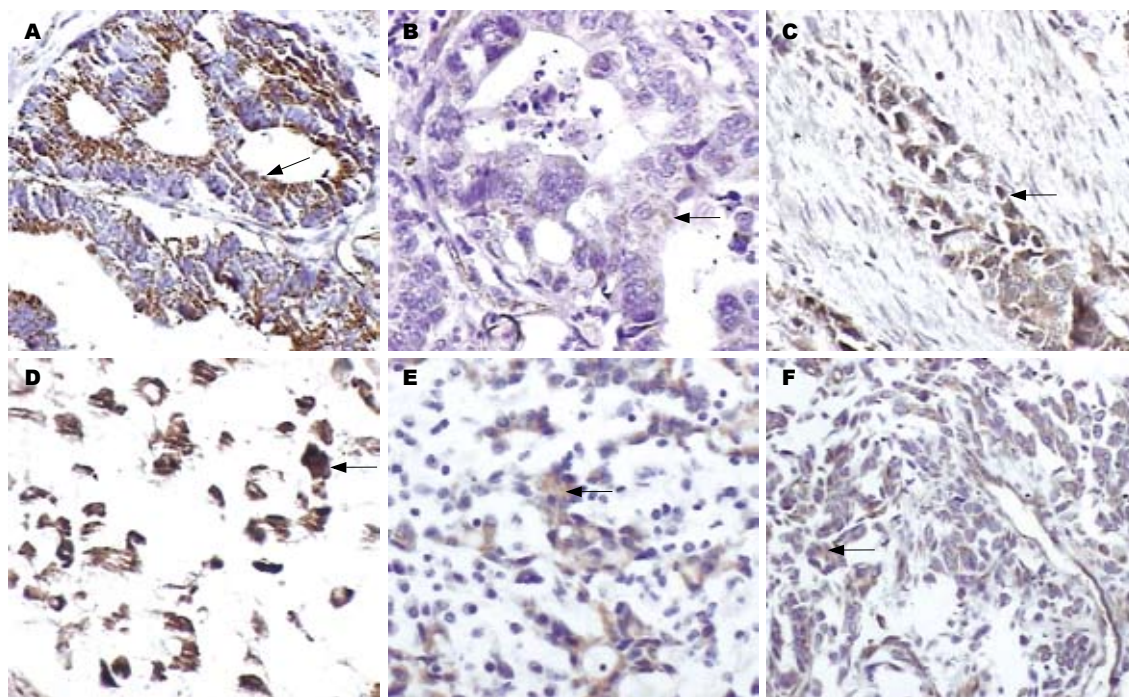


图1 caveolin-1、Dnmt1蛋白及Dnmt1基因mRNA的表达。A: 高分化胃癌组织中caveolin-1蛋白呈强阳性表达(SP法 $\times 100$ ); B: 高分化胃癌组织中caveolin-1蛋白偶见弱阳性表达(SP法 $\times 200$ ); C: 低分化胃癌组织中Dnmt1蛋白呈强阳性表达(SP法 $\times 100$ ); D: 黏液腺癌组织中Dnmt1蛋白呈强阳性表达(SP法 $\times 100$ ); E: 低分化胃癌组织Dnmt1 mRNA呈阳性表达(ISH法 $\times 200$ ); F: 中分化胃癌组织中Dnmt1 mRNA呈强阳性表达(ISH法 $\times 100$ )。

表2 胃癌组织中caveolin-1、Dnmt1蛋白及Dnmt1基因mRNA的表达

caveolin-1	caveolin-1蛋白		Dnmt1蛋白		Dnmt1基因mRNA		合计
	+	-	+	-	+	-	
甲基化(+)	6	38	32	12	28	16	44
甲基化(-)	12	4	6	10	4	12	16
合计	18	42	38	22	32	28	60
阳性率(%)	30.0		63.3		53.3		73.3

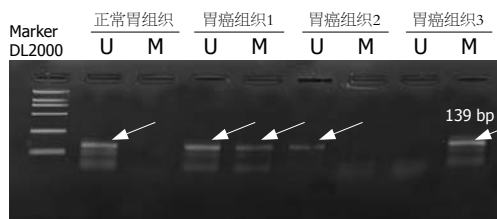


图2 胃组织中MSP法检测caveolin-1基因甲基化。M: 甲基化产物; U: 非甲基化产物。正常胃组织未发生甲基化; 胃癌组织1发生半甲基化; 胃癌组织2未发生甲基化; 胃癌组织3发生完全甲基化。

岛甲基化是某些人类恶性肿瘤的频发事件<sup>[10]</sup>。

Caveolae(胞膜窝)是细胞表面特异性内陷所形成的烧瓶样结构, caveolin-1(窖蛋白)是caveolae的标志性蛋白<sup>[11]</sup>, 在许多生理、病理活动中都起重要作用, 是各种信号分子和信号通路的整和器。研究证明caveolin-1与细胞的恶性

表3 caveolin-1基因启动子CpG岛区域甲基化发生率

分组	甲基化(+)	甲基化(-)	合计	阳性率(%)	P值
正常组	0	14	14	0	
胃癌组	44	16	60	73.3	<0.0005
合计	44	30	74	59.5	

转化及肿瘤的演进密切相关。本实验室先前的研究表明: caveolin-1基因在正常胃黏膜→不典型增生胃黏膜→胃癌中阳性表达率逐渐降低, 且组间差异性有统计学意义, 在胃癌组织中的阳性表达率仅为23.9%<sup>[4-5]</sup>, 明显低于正常组织, 且其表达的抑制发生于转录或转录前的水平, 并推测可能与该基因甲基化有关。本实验针对caveolin-1蛋白的表达状况表明: caveolin-1在正常胃黏膜组织中呈强阳性表达, 而在胃癌组织

表 4 caveolin-1基因甲基化发生率与胃癌临床病理的关系

临床病理指标	n	caveolin-1基因甲基化			P值
		+	-	阳性率(%)	
性别					
男	52	36	16	69.2	0.161
女	8	8	0	100.0	
年龄(岁)					
<50	14	2	12	14.3	0.000
≥50	46	42	4	91.3 <sup>b</sup>	
分化程度					
高中分化	16	9	7	56.3	0.140
低分化	44	35	9	79.5	
肿瘤大小(cm)					
<5	30	24	6	80.0	0.243
≥5	30	20	10	66.6	
有无淋巴结转移					
有	40	30	10	75.0	0.680
无	20	14	6	70.0	
有无脉管侵犯					
有	4	2	2	50.0	0.612
无	56	42	14	75.0	
浸润深度					
黏膜层肌层	8	8	0	100.0	0.161
浆膜层	52	36	16	69.2	

<sup>b</sup>P<0.01 vs ≥50岁组.

中表达显著降低乃至部分缺失. 对胃癌组织中caveolin-1基因甲基化状态的研究表明: 14例正常胃标本均显示caveolin-1基因启动子区域CpG岛甲基化阴性而非甲基化阳性; 60例胃癌标本中, 73.3%(44/60)的癌组织检测出caveolin-1基因启动子区域CpG岛异常甲基化. caveolin-1基因在胃癌中的沉默原因就在于该基因发生甲基化. 实验亦表明: caveolin-1基因甲基化的发生与年龄有关, 这与先前学者对于胃癌的研究结果相一致: 胃癌多发生于老年人; 部分肿瘤相关基因的甲基化与年龄有关, 但甲基化极少发生于青年个体<sup>[12]</sup>.

在研究了caveolin-1基因甲基化状况的同时, 我们还对其可能的调节机制进行了初步的探索. DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶DNMTS(DNA methyltransferases)的介导下(包括Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3a、Dnmt3b), 二核苷酸中胞嘧啶(c)的第5位C原子上的H被S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基取代, 使之变成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m<sup>5</sup>C)<sup>[13-14]</sup>的化学修饰过程. 目前的研究结果表明Dnmt1基因与DNA甲基化关系密切, 它具有维持甲基化的作用. 我们的

实验结果表明: 在正常胃黏膜中, Dnmt1蛋白不表达(除部分增生的小凹和间质的淋巴细胞胞核), Dnmt1基因mRNA亦不表达蛋白; 而在胃癌组织中, Dnmt1蛋白阳性表达率为63.3%(38/60), Dnmt1基因mRNA阳性表达率为53.3%. 在胃癌组织中, Dnmt1的活性明显提高. 综合以上实验结果, 我们初步推测: 在胃癌组织中, Dnmt1蛋白及mRNA的表达显著提高, 在其作用下caveolin-1基因外显子1启动子CpG岛区域发生甲基化, 进而使其蛋白表达异常, 以致该基因失活, 失去对肿瘤发生的抑制作用. 这仅是本实验的一些初步推测, 其具体机制, 还有待于我们今后的实验进一步证实.

目前, 对于caveolin-1基因在胃癌组织中的作用机制还不是很清楚, 但实验结果一致表明caveolin-1基因在胃癌组织中的表达下调. 根据本实验结果, 我们初步判断其原因是该基因发生了甲基化. 由于caveolin-1通常与caveolin-2相互作用, 共同形成异寡聚体而发挥作用, 在caveolin-1基因沉默时, caveolin-2基因的表达状况如何, 二者具有何种联系, 还有待于进一步研究. 在胃癌的研究中, 已发现多种抑癌基因发生甲基化改变且具有肿瘤特异性<sup>[15-17]</sup>, 多基因甲基化的肿瘤患者往往预后较差<sup>[18]</sup>. 在本实验的基础上, 今后可以建立胃癌中相关基因的甲基化谱, 并研究DNMTS家族的作用及具体机制, 为胃癌的预防、早期诊断和抗甲基化治疗提供实验和理论依据. *H. pylori*感染已被证明与胃癌的发生有关, 他与基因甲基化之间是否有关, 为我们今后的胃癌研究提供了新的课题.

#### 4 参考文献

- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-196
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
- Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* 1999; 448: 221-230
- 刘斌, 杨育生, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. Caveolin-1基因的mRNA和蛋白在胃癌组织的表达. 第四军医大学学报 2007; 28: 1868-1871
- 杨育生, 刘斌, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. 胃癌组织中Caveolin-1、nm23及MMP-2的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1725-1730
- 顾立萍, 刘斌, 邢传平, 黄小玲, 高自芳, 苏勤, 钱震, 董亮. 甲基化特异性PCR技术的质量控制及改进. 第四

#### ■应用要点

在本实验的基础上, 今后可以建立胃癌中相关基因的甲基化谱, 并研究DNMTS家族的作用及具体机制, 为胃癌的预防、早期诊断和抗甲基化治疗提供实验和理论依据.

## ■同行评价

本研究选题新颖, 结果可靠, 具有一定的意义.

- 7 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002; 17: 323-329
- 8 Nardone G. Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 2: 75-81
- 9 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070
- 10 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3724-3728
- 11 Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 494-499
- 12 Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 221-228
- 13 Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem* 2002; 3: 274-293
- 14 Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3784-3795
- 15 Luo D, Zhang B, Lv L, Xiang S, Liu Y, Ji J, Deng D. Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. *Lab Invest* 2006; 86: 591-598
- 16 Zhou YN, Xu CP, Han B, Ji R. [CpG island methylation of E-cadherin gene promoter in gastric carcinoma] *Ai Zheng* 2005; 24: 1220-1224
- 17 Cai JC, Liu D, Zhang HP, Zhong S, Xia NS. [Frequent promoter hypermethylation of several tumor suppressor genes in gastric carcinoma and foveolar epithelium] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2007; 29: 510-513
- 18 Issa JP. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phenotypes. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2879-2881

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)

# 产ESBLs细菌在肝硬化合并自发性腹膜炎患者腹水中的检测及其耐药性

骆成林, 呼闯营, 殷国建, 睦振宇, 程桂莲, 王少峰

骆成林, 呼闯营, 殷国建, 睦振宇, 程桂莲, 王少峰, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004

作者贡献分布: 骆成林与王少峰对此文所作贡献均等; 此课题由骆成林、呼闯营、殷国建、睦振宇、程桂莲及王少峰设计; 研究过程由骆成林、呼闯营、殷国建、睦振宇及程桂莲操作完成; 研究过程所用新试剂及分析工具由王少峰提供; 数据分析由骆成林与呼闯营完成; 本论文写作由骆成林、王少峰及呼闯营完成。

通讯作者: 王少峰, 主任医师, 215004, 江苏省苏州市苏州大学附属第二医院消化科. sfwang68@yahoo.com.cn

电话: 0512-67783877

收稿日期: 2009-03-03 修回日期: 2009-03-26

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-28

## Extended-spectrum $\beta$ -lactamases producing strains and drug resistance analysis in ascitic patients with spontaneous bacterial peritonitis

Cheng-Lin Luo, Chuang-Ying Hu, Guo-Jian Yin, Zhen-Yu Sui, Gui-Lian Cheng, Shao-Feng Wang

Cheng-Lin Luo, Chuang-Ying Hu, Guo-Jian Yin, Zhen-Yu Sui, Gui-Lian Cheng, Shao-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Dr Shao-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. sfwang68@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-03 Revised: 2009-03-26

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing strains and drug resistance in ascitic patients with spontaneous bacterial peritonitis so as to provide theoretical basis for clinical drug use.

**METHODS:** Isolated *E.coli* and *klebsiella pneumonia* from January 2005 to December 2008, confirmed by Vitek-32, underwent extended-spectrum  $\beta$ -lactamases detection and drug sensitivity tests using Kirby-Bauer methods.

**RESULTS:** There were 38.3%(18/47) of *E.Coli* and 0 of *klebsiella pneumonia* producing ESBL.

Drug resistance rates of the ESBL-producing strains to AMX, AMK, CZA, CZP, ATM, FEP, SMZ, CFP and PIP were significantly higher than those of the Non-ESBL producing strains, but to CSL and TZP there was no discrimination between them. Drug resistance rates of ESBL-producing and Non-ESBL producing strains were zero to TMP.

**CONCLUSION:** Monitoring the ESBL-producing strains and drug resistance would be important for treatment of patients with spontaneous bacterial peritonitis.

**Key Words:** Spontaneous bacterial peritonitis; *E. scherichia*; *Klebsiella pneumonia*; Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; Drug resistance

Luo CL, Hu CY, Yin GJ, Sui ZY, Cheng GL, Wang SF. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing strains and drug resistance analysis in ascitic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1567-1569

## 摘要

**目的:** 了解肝硬化合并自发性腹膜炎患者腹水中细菌产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和耐药性。

**方法:** 我院2005-01/2008-12肝硬化合并自发性腹膜炎患者腹水中分离出的大肠埃希菌和克雷伯杆菌, 采用vitek-32全自动细菌鉴定及药物分析仪进行ESBLs检测和药敏试验。

**结果:** 38.3%(18/47)大肠埃希氏菌中检测出产ESBLs, 10株肺炎克雷伯杆菌中未检测出ESBLs, 产ESBLs菌对9种抗生素(阿莫西林、阿米卡星、头孢他啶、环丙沙星、氨曲南、头孢吡肟、复方新诺明、头孢哌酮、哌拉西林)的耐药性较不产ESBLs菌明显高, 对抗生素(哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦)的耐药性与不产ESBLs菌相比无显著差异, 产ESBLs菌与不产ESBLs菌对亚胺培南的耐药性均为0。

**结论:** 对腹水中产ESBLs细菌及耐药性的检测

## ■背景资料

自发性腹膜炎(SBP)的病原菌大多数为革兰阴性杆菌, 其中以大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌为主, 近年来随着广谱抗生素特别是头孢菌素类的大量使用, 大肠埃希菌和克雷伯杆菌的耐药性日趋严重。李家泰 *et al*报道大肠埃希菌和克雷伯杆菌的耐药机制之一是产 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs), 因此了解肝硬化合并SBP的腹水中细菌产ESBLs和耐药情况能更好的指导临床用药。

## ■同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科; 倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

## ■研发前沿

目前在临床上对SBP经验性选用抗菌药物主要是三代头孢或喹诺酮类抗菌药物,而疗效并不是很理想,分析原因除了与患者本身伴有的严重基础病及并发症等因素外,耐药率的提高也应是影响预后的重要因素之一。

对指导临床用药方面具有重要意义。

**关键词:** 自发性腹膜炎; 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯杆菌; 超广谱 $\beta$ -内酰胺酶; 耐药性

骆成林, 呼闯营, 殷国建, 睦振宇, 程桂莲, 王少峰. 产ESBLs细菌在肝硬化合并自发性腹膜炎患者腹水中的检测及其耐药性. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1567-1569

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1567.asp>

## 0 引言

自发性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化常见并发症,也是导致患者死亡的主要原因之一,早期诊断并有效治疗SBP是改善肝硬化患者预后的重要因素。SBP的病原菌大多数为革兰阴性杆菌,其中以大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌为主,近年来随着广谱抗生素特别是头孢菌素类的大量使用,大肠埃希菌和克雷伯杆菌的耐药性日趋严重。李家泰 *et al*<sup>[1]</sup>报道大肠埃希菌和克雷伯杆菌的耐药机制之一是产 $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs),因此了解肝硬化合并SBP的腹水中细菌产ESBLs和耐药情况能更好地指导临床用药。我们对2005-01/2008-12我院肝硬化合并SBP的患者腹水中分离培养出的细菌及耐药情况进行分析,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-01/2008-12在我院诊断为肝硬化合并SBP住院患者122例,肝硬化的诊断与分型参照2000年全国病毒性肝炎防治方案。患者入院后均做床边腹水细菌培养,其中培养出47株大肠埃希菌,10株克雷伯杆菌。大肠埃希氏菌ATCC25922,肺炎克雷伯氏菌ATCC700603,均购自卫生部临床检验中心,所有结果均符合NCCLS颁布的药敏质控范围。哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、阿米卡星、环丙沙星、阿莫西林、复方新诺明(纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株鉴定:** 所有实验菌株均按要求分离纯化后,用0.45% NaCl制成1个麦氏浊度的菌悬液,充入GNI+卡,采用Vitek-32全自动细菌鉴定(购自法国梅里埃公司)。

**1.2.2 ESBLs检测:** 按NCCLS进行,判定标准按1999年版标准: 头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维

表 1 产ESBL与非产ESBL的大肠埃希菌及肺炎克雷伯杆菌对12种抗生素的耐药率的比较 (%)

抗菌药	大肠埃希菌		肺炎克雷伯杆菌(ESBLs <sup>-</sup> )
	ESBLs <sup>+</sup>	ESBLs <sup>-</sup>	
阿莫西林	100.00	93.10	80.00
阿米卡星	44.44	24.13	20.00
头孢他啶	94.44	31.03	30.00
环丙沙星	72.22	48.27	40.00
氨曲南	100.00	55.17	30.00
头孢吡肟	33.33	17.24	10.00
复方新诺明	61.11	41.37	40.00
头孢哌酮	77.77	31.03	30.00
头孢哌酮/舒巴坦	0.00	3.48	0.00
哌拉西林	88.88	37.93	40.00
哌拉西林/他唑巴坦	5.55	6.89	10.00
亚胺培南	0.00	0.00	0.00

酸、头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸,任一组抑菌环直径相差 $\geq 5$  mm为产酶株。

**1.2.3 抗菌药物及药敏试验:** 用纸片琼脂扩散法(K-B法)测定所有菌株对12种抗菌药物的耐药性,观察时间和结果评价依据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)1999年版本的标准。

**统计学处理** 采用SPSS11.5软件进行 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

**2.1 ESBLs试验** 47株大肠埃希菌中产ESBLs菌株18株,检出率为38.3%(18/47),10株肺炎克雷伯杆菌中未检测出ESBLs。

**2.2 药敏结果** 12种抗菌药物对产ESBLs的大肠埃希菌耐药性,除亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦(耐药率 $<6\%$ )均敏感外,产ESBLs菌株对阿莫西林、哌拉西林、头孢他啶、氨曲南、头孢哌酮耐药率较高均在77%以上,对四代头孢菌素如头孢吡肟敏感性较高,耐药率仅33.33%。对阿米卡星、环丙沙星、复方新诺明耐药率均 $>44\%$ ,以上耐药性有显著差异。而非产ESBLs的大肠埃希菌及肺炎克雷伯杆菌则表现出良好的敏感性除氨曲南、环丙沙星、阿莫西林(耐药性 $>45\%$ ,表1)。

## 3 讨论

ESBLs是由广谱 $\beta$ -内酰胺酶经1-4个基因位点突变而形成,能水解 $\beta$ -内酰胺类抗菌药物的 $\beta$ -内酰胺环而使之灭活。产ESBLs是革兰阴性杆菌(如大肠埃希菌和肺炎克雷伯杆菌等)对第3代头孢菌素和单环 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的最重要和

## ■应用要点

为遏制产ESBLs菌株的产生,临床医生应加强细菌耐药性的检测,严格掌握抗菌药物的使用指征,提高合理用药的意识,根据体外药物敏感试验选用抗菌药物。

最常见的机制. 本组资料中示产ESBLs占大肠埃希菌的38.3%(18/47)与杨玉英 *et al*<sup>[2]</sup>报道33.3%相近, 克雷伯杆菌中未发现产ESBLs, 可能与样本例数较少有关.

产ESBLs大肠埃希菌对碳青霉类及含 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂如亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率均 $<6.00\%$ , 表现出良好的抗菌活性. ESBLs的特点是能被 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂所抑制. 本组2种含 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抗菌药物的药敏结果显示, 头孢哌酮和头孢哌酮/舒巴坦对产ESBLs菌株的耐药率分别为77.77%和0, 哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦的耐药率分别为88.88%和5.55%, 产ESBLs菌与不产ESBLs菌对抗生素(亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦)的耐药性相比无显著差异( $P>0.05$ ). 可能是 $\beta$ -内酰胺类抗菌药物与 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的联用增强了前者的抗菌活性, 产ESBLs大肠埃希菌多重耐药现象严重, 药敏试验表明产ESBLs菌株对青霉素类、三代头孢菌素类、环丙沙星、复方新诺明耐药率均 $>70.0\%$ , 对四代头孢吡肟耐药率也有33.33%, 阿米卡星耐药率为44.44%. 产ESBLs菌表现为多重耐药<sup>[3]</sup>, 其中对青霉素类抗菌药物的耐药率最高, 这与文献报道一致<sup>[4]</sup>, 可能是因携带ESBLs基因的质粒可同时携带氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、磺胺类及氟喹诺酮类等耐药基因<sup>[5]</sup>, 从而被多种抗菌药物筛选. 近年来提出具有同时整合和表达多种耐药基因特征的整合子中可能含有某些ESBLs编码基因<sup>[6-7]</sup>, 导致携带整合子的产ESBLs菌株表现出更大的扩散优势, 整合子在介导耐药基因水平转移中的作用已经得到证实<sup>[8]</sup>.

目前在临床上对SBP经验性选用抗菌药物主要是三代头孢或喹诺酮类抗菌药物, 而疗效并不是很理想, 分析原因除了与患者本身伴有的严重基础病及并发症等因素外, 耐药率的提高也应是影响预后的重要因素之一. 本组资料中示产ESBLs菌株对青霉素、头孢菌素类高度耐药性, 原因在于这些抗菌药物不耐酶, 可被ESBLs水解. 喹诺酮类药物因肝肾脏毒性低、腹水中药物浓度高等优点, 曾被广泛应用于治疗

腹水感染, 但近年发现, 革兰阴性菌对喹诺酮类抗菌药物耐药性迅速上升, 且喹诺酮类抗菌药物又存在明显交叉耐药性, 故临床医生在得到药敏结果前不宜首选使用. 产ESBLs革兰阴性菌对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类、阿米卡星的耐药性比非产ESBLs菌株明显增高, 经 $\chi^2$ 检验差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 这与产ESBLs菌株携ESBLs的质粒可能同时带有喹诺酮类、氨基糖苷类等多种抗菌药物的耐药基因有关. 为遏制产ESBLs菌株的产生, 临床医生应加强细菌耐药性的检测, 严格掌握抗菌药物的使用指征, 提高合理用药的意识, 根据体外药物敏感试验选用抗菌药物. 对产ESBLs革兰阴性菌引起的腹水感染, 不宜选用头孢菌素和青霉素类抗菌药物, 而应选用亚胺培南等碳青霉烯类或 $\beta$ -内酰胺类/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂类药物.

因此临床上对此类患者需进行常规的腹水病原菌培养和药敏试验, 同时进行ESBLs检测以指导临床合理应用抗生素.

#### 4 参考文献

- 1 李家泰, 李耘, 齐慧敏. 2002-2003年中国革兰阴性细菌耐药性监测研究. 中华检验医学杂志 2005; 28: 19-29
- 2 杨玉英, 张锦前, 王慧珠, 吴亮, 罗凌, 赫嵘, 蒋煜, 刘庄. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎患者腹水培养阳性的病原菌分析. 中华传染病杂志 2005; 23: 402-405
- 3 植志全, 姜鹏, 何志恒, 邹惠锋, 马劲光. 医院感染肺炎克雷伯菌耐药性及氨基糖苷类修饰酶、 $\beta$ -内酰胺酶基因研究. 中华医院感染学杂志 2005; 15: 1208-1213
- 4 Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 500-510
- 5 罗燕萍, 张秀菊, 徐雅萍, 田芳, 沈定霞. 产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的分布及其耐药性研究. 中华医院感染学杂志 2006; 16: 101-104
- 6 Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14
- 7 Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D. blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2303-2306
- 8 Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 115-125

#### ■同行评价

文章切合临床研究了肝硬化合并自发性腹膜炎的感染现状和治疗提示, 具有一定的临床使用价值, 但新颖性一般.

编辑 李军亮 电编 何基才

# 广西肝癌高、低发区CYP3A5基因多态性的对比

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 冯震博

## ■背景资料

广西西南部为肝癌高发区, 在相同水平AFB1暴露和HBV感染的情况下, 肝癌的发病风险存在很大的个体差异, 提示遗传因素也可能是肝癌重要的病因。本课题组通过研究广西肝癌高发区和低发区人群中的CYP3A5基因多态性, 以探讨CYP3A5基因多态性与肝癌易感性的关系。

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 黑龙江省佳木斯大学司法鉴定中心 佳木斯大学基础医学院病理法医学教研室 黑龙江省佳木斯市 154007

冯震博, 广西医科大学基础医学院病理教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

作者贡献分布: 卢凤美、冯震博与刘东璞对此文所作贡献均等; 此课题由冯震博与卢凤美共同设计; 研究过程由卢凤美、刘东璞、孟庆媛及郭梦凡操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由冯震博提供; 数据分析由卢凤美与刘东璞完成; 本论文写作由冯震博、卢凤美与刘东璞完成。

通讯作者: 冯震博, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学基础医学院病理教研室。  
lufengmei200520136@163.com

电话: 0454-8618292

收稿日期: 2009-03-03 修回日期: 2009-04-08

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-28

## Comparative analysis on the genetic polymorphisms of CYP3A5 between hepatocellular carcinoma high and low incidence area in Guangxi Zhuang Autonomous Region

Feng-Mei Lu, Dong-Pu Liu, Qing-Yuan Meng, Meng-Fan Guo, Zhen-Bo Feng

Feng-Mei Lu, Dong-Pu Liu, Qing-Yuan Meng, Meng-Fan Guo, Forensic Science Right Expertise Center of Jiamusi University, Department of Pathology of Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Zhen-Bo Feng, Department of Pathology of Basic Medical College of Guangxi Zhuang Autonomous Region Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Zhen-Bo Feng, Department of Pathology of Basic Medical College of Guangxi Zhuang Autonomous Region Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lufengmei200520136@163.com

Received: 2009-03-03 Revised: 2009-04-08

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between genetic polymorphism of CYP3A5 and HCC affectability through analysis of two groups of patients coming from Guangxi HCC high-incidence area and HCC low-incidence area.

**METHODS:** We had collected 72 cases of HCC tissues and HCC-adjacent tissues from the

First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University during 2005-12/2006-09, and all the cases, who came from Guangxi HCC high-incidence area and HCC low-incidence area respectively, had been pathologically confirmed. At the same time, we used 12 cases of hepatic angioma-surrounding tissue as the normal control group. PCR-RFLP assay was used to analyze CYP3A5 genetic polymorphism of the above-mentioned samples.

**RESULTS:** There were statistic differences between the population with CYP3A5\*1 allele frequency and the proportion of (CYP3A5\*1/\*1 + CYP3A5\*1/\*3) genotypes of Guangxi HCC high-incidence area and the population of Guangxi HCC low-incidence area ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences between the population of Guangxi HCC high-incidence area and the population of the normal control group ( $P < 0.05$ ). There were no statistic differences between Guangxi HCC low-incidence area population and the normal control group.

**CONCLUSION:** CYP3A5 might take part in the morbidity of AFB1 related HCC.

**Key Words:** CYP3A5; Genetic polymorphism; Aflatoxin B1; Hepatocellular carcinoma; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

Lu FM, Liu DP, Meng QY, Guo MF, Feng ZB. Comparative analysis on the genetic polymorphisms of CYP3A5 between hepatocellular carcinoma high and low incidence area in Guangxi Zhuang Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1570-1574

## 摘要

**目的:** 研究广西肝癌高发区和低发区人群中CYP3A5基因多态性, 以探讨CYP3A5基因多态性与肝癌易感性的关系。

**方法:** 收集广西医科大学第一附属医院2005/12-2006/09经病理确诊的72例肝细胞癌(HCC)患者的肝癌组织及其癌旁组织, 患者分

## ■同行评议者

李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

别来自于肝癌高发区(黄曲霉素高污染区)和低发区. 12例血管瘤的瘤旁肝组织作为正常对照. 用PCR-RFLP法检测CYP3A5在上述标本中的多态性.

**结果:** 广西肝癌高发区患者CYP3A5\*1等位基因频率和基因型比(CYP3A5\*1/\*1+CYP3A5\*1/\*3)与广西肝癌低发区患者比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 肝癌高发区人群与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 低发区与正常对照组之间比较, 差异无统计学意义.

**结论:** CYP3A5可能参与黄曲霉毒素B1(AFB1)相关性HCC的发生.

**关键词:** CYP3A5; 遗传多态性; 黄曲霉毒素B1; 肝癌; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 冯震博. 广西肝癌高、低发区CYP3A5基因多态性的对比. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1570-1574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1570.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重威胁人类生命健康及生活质量的重要消化系统恶性肿瘤之一, 慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致HCC最主要的原因之一<sup>[1]</sup>. 广西西南部为HCC高发区, 与江苏启东和非洲撒哈拉以南地区共同成为世界上HCC最高发地区, HBV感染和AFB1的暴露是造成这些地区HCC高发的主要原因<sup>[2]</sup>. 而且, AFB1与HBV有协同致癌作用<sup>[3]</sup>. CYP3A家族成员(主要包括CYP3A4和CYP3A5)一方面参与AFB1的代谢活化生成具有DNA结合活性的活性代谢产物AFBO, 同时又参与AFB1的I相解毒, 生成无遗传毒性的代谢产物AFQ1<sup>[4]</sup>. CYP3A5由于个体间表达水平差别很大, 而且他们的基因多态性较大程度上影响表达水平<sup>[5]</sup>, CYP3A5\*1是蛋白表达水平较高的主要原因<sup>[6]</sup>. 研究显示, 最常见的人类遗传多态形式是基因组中散在的单个碱基的不同-单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs), 肿瘤患者个体治疗敏感性和与治疗相关的不良反应等均与SNPs有关<sup>[7]</sup>.

为了检测遗传因素在肝癌发生中的作用, 我们在广西肝癌高发区和低发区肝癌人群中以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法研究CYP3A5的基因多态性, 以探讨他们与HCC遗传易感性的潜在关系. 从遗传易感性方面探讨HCC发生的内在原因, 并期望以他们的多态性为依据帮助识别HCC易感基因和易感人群, 为HCC的防治提供进一步的理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 取2005-12/2006-09广西医科大学第一附属医院肝胆外科肝癌患者手术切除的标本共72例, 其中广西肝癌高发区(黄曲霉素高污染区)组40例肝癌及癌旁组织(广西肝癌高发地区-南宁地区之扶绥县、宁明县); 低发区(黄曲霉素低污染区)组32例肝癌及其癌旁组织(广西肝癌低发地区-玉林地区及柳州地区几个县); 取其癌组织和与癌相距 $\geq 2$  cm的癌旁组织. 其中, 男62例, 女10例. 另取肝血管瘤旁肝组织12例作为正常对照组, 标本均取自与肿瘤相距 $\geq 2$  cm的瘤旁组织. 其中男10例, 女2例. 所有正常对照人员均无肿瘤家族史. 对照组的性别、年龄和民族与疾病组进行频数匹配, 以病例记录和直接调查方式获取相关资料. Taq DNA聚合酶, 购自大连宝生物工程公司; dDNA混合液、琼脂糖、 $50\times$  TAE电泳缓冲液, DNA提取试剂: 北京天根公司DNA提取试剂盒血液/细胞/组织基因组, 购自恒因生物公司; 溴酚蓝、溴化乙锭(EB), 购自恒因生物公司; 限制性内切酶Dde I 购自美国Promega公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA提取:** 肝癌组织基因组DNA的制备及定量: 北京天根公司血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒进行抽提, 实验步骤按DNA提取试剂盒说明书进行提取DNA.

**1.2.2 PCR反应:** 引物合成与设计: 由上海Sangon生物工程公司合成. CYP3A5上游引物: 5'-CTT TAA AGA GCT CTT TTG TCT CTC A-3'; 下游引物: 5'-GAA CAG TTA CTC ACA GAT AGA GGA GTA TC-3'. 扩增片段长度为200 bp, 采用25  $\mu$ L的反应体系. CYP3A5反应混合物循环条件: 94℃预变性4 min; 接着94℃变性40 s, 56℃退火40 s, 和72℃延伸1 min, 进行30个循环; 最后72℃延伸7 min.

**1.2.3 RFLP:** 取PCR 扩增产物3  $\mu$ L, 加入 $10\times$  restriction Buffer、 $10\times$  BSA和Dde I 3 U, 终体

## ■ 研发前沿

有些肝癌往往发展到中晚期出现临床症状, 手术机会少, 化疗效果差, 5年生存率极低. 可见, 进一步开展相关基因的遗传多态性与肝癌易感性关系的研究对肝癌高危个体的筛查和早期预防以及寻找肝癌药物防治的潜在靶点具有重要的理论和现实意义.

## ■ 相关报道

多项研究显示, CYP3A5在肝脏组织中的检出率与CYP3A5\*1/\*1和CYP3A5\*1/\*3基因型比例的总和相近, 即\*1/\*1和\*1/\*3基因型CYP3A5蛋白表达水平高, 而\*3/\*3基因型CYP3A5表达低, CYP3A5\*1携带者CYP3A5表达高.

### ■创新盘点

在本研究中,发现广西肝癌高发区CYP3A5高表达个体百分比明显高于广西肝癌低发区,提示广西AFB1高污染区人群由于长期暴露于AFB1的污染环境中,以致与AFB1代谢相关的酶表达增加,对AFBO的易感性增加,导致HCC高发。

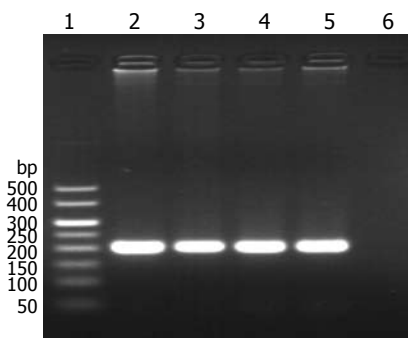


图1 CYP3A5 PCR产物电泳结果。1: DNA Marker; 2-5: PCR产物; 6: 空白对照。

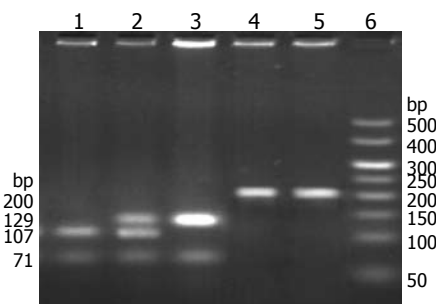


图2 CYP3A5 PCR产物酶切电泳结果。1-3: 酶切产物; 4-5: PCR产物; 6: DNA Marker; 1: 基因型CYP3A5\*3/\*3; 2: 基因型CYP3A5\*1/\*3; 3: 基因型CYP3A5\*1/\*1。

积12  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C至少消化2 h。

**统计学处理** 实验结果用SPSS13.0进行分析。

计量资料用mean $\pm$ SD, 计数资料用整数表示, 统计方法采用 $\chi^2$ 检验(Chi-square test)两两比较、t检验。

## 2 结果

**2.1 CYP3A5 PCR产物电泳结果** CYP3A5 PCR产物片段长度为200 bp(图1)。

**2.2 CYP3A5 PCR产物酶切电泳结果** CYP3A5 PCR产物基因型为CYP3A5\*3/\*3酶切片段长分别为107 bp、71 bp和22 bp; 基因型为CYP3A5\*1/\*3酶切片段长分别为129 bp、107 bp、71 bp和22 bp; 基因型为CYP3A5\*1/\*1酶切片段长分别为129 bp和71 bp(图2)。

**2.3 研究对象观察指标** 经 $\chi^2$ 检验结果显示, 三组在年龄、性别、民族、饮塘水、肿瘤家族史, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 但在饮酒、AFB1暴露和乙肝感染情况这三方面有差异( $P<0.05$ )。提示饮酒、AFB1暴露和乙肝感染是HCC一个危险因素。尽管我们在实验过程中尽力控制所有因素, 以期达到三组间这些影响因素在频数上相配, 但未能如愿(表1)。

表1 研究对象观察指标n(%)

分组	高发区肝癌组	低发区肝癌组	正常对照
性别			
男	34(85)	28(87.5)	10(83.3)
女	6(15)	4(12.5)	2(16.7)
平均年龄(岁)	47.6	47.1	53.3
民族			
汉族	25(62.5)	23(71.5)	8(66.7)
壮族及其他	15(37.5)	9(28.5)	4(33.3)
饮酒			
频繁	12(30)	9(28.13)	1(9)
不频繁	28(70)	23(71.87)	11(91)
饮塘水			
有	2(5)	1(3)	0(0)
无	38(95)	31(97)	12(100)
HBV			
+	38(95)	31(96)	1(8)
-	2(5)	1(4)	11(92)
AFB1暴露 <sup>1</sup>			
频繁	12(30)	4(12.5)	0(0)
不频繁	28(70)	28(87.5)	12(100)
肿瘤家族史			
有	7(17.5)	2(6)	0(0)
无	33(82.5)	30(94)	12(100)

<sup>1</sup>: 主要根据玉米的食用情况作一粗略估计, 每年多于2 mol以玉米为主食的研究对象定为AFB1暴露频繁。

**2.4 CYP3A5\*1、\*3基因型及等位基因分布** 高发区HCC组、低发区HCC组和正常对照组CYP3A5\*1/\*1、\*1/\*3和\*3/\*3基因型比例分别为25.0%、45.0%和30.0%; 6.25%、31.5%和62.25%; 4.8%、33.3%和61.9%, 差异有统计学意义( $\chi^2=9.937, P<0.05$ )。三组间进行高表达基因型(\*1/\*1+\*1/\*3)和低表达基因型(\*3/\*3)构成比比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两两比较的结果, 3组间高表达基因型(\*1/\*1+\*1/\*3)与低表达基因型(\*3/\*3)构成比 $\chi^2$ 检验, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 肝癌高发区人群与肝癌低发区人群比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 肝癌高发区人群与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 肝癌低发区人群与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。三组的\*1、\*3等位基因频率分别为40.0%和60.0%; 21.5%和78.5%; 20.9%和79.1%, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表2)。

## 3 讨论

人体肝脏和小肠中的CYP3A主要由CYP3A4和

表 2 肝癌高、低发区及正常肝组织中CYP3A5的基因型及等位基因分布 *n*(%)

CYP3A5	基因型			等位基因	
	*1/*1	*1/*3	*3/*3	*1	*3
HCC高发区	10(25.0)	18(45.0)	12(30.0)	28(40.0)	42(60.0)
HCC低发区	2(6.25)	10(31.5)	20(62.25)	14(21.5)	51(78.5)
正常组	1(4.8)	4(33.3)	7(61.9)	5(20.9)	19(79.1)

CYP3A5这两种同工酶组成, 其中CYP3A5在这两种组织中的表达存在多态性. CYP3A5\*1携带者CYP3A5表达高, 可占肝脏CYP3A的17%-50%, Kuehl *et al*<sup>[8-9]</sup>提出甚至超过50%. 在白种人、黄种人和黑种人的有关研究中, CYP3A5在肝脏组织中的检出率与CYP3A5\*1/\*1和CYP3A5\*1/\*3基因型比例的总和相近<sup>[10]</sup>. AFB1经细胞色素P450(CYP450)酶氧化为AFB1-外-8, 9-环氧化物(AFBO)才有诱变作用, AFBO与DNA共价结合成AFB1-DNA加合物, 引起DNA改变, 从而导致个体HCC发生<sup>[11]</sup>. CYP3A5主要介导AFB1生成毒性代谢产物AFBO<sup>[12]</sup>, 因此, 体内高水平的CYP3A5可通过增加AFBO的生成, 从而增加患肝癌的风险. Bethke *et al*<sup>[13]</sup>研究表明, CYP3A基因多态性能增加结肠癌的风险性. Wojnowski *et al*<sup>[14]</sup>对冈比亚人群的进行的一项研究结果表明, 携带与该酶高酶活性相关的CYP3A5单倍型的个体血浆AFB1-白蛋白加合物的水平显著增加, 体内表达高水平CYP3A5的个体肝脏生成AFBO的能力增强.

在本研究中, 广西肝癌高发区人群、肝癌低发区人群, 正常对照组CYP3A5\*1、\*3基因型及等位基因分布存在差异. 我们在3组间进行高表达基因型(\*1/\*1+\*1/\*3)和低表达基因型(\*3/\*3)构成比比较, 两两比较的结果, 3组间高表达基因型(\*1/\*1+\*1/\*3)与低表达基因型(\*3/\*3)构成比 $\chi^2$ 检验, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 高发区肝癌组CYP3A\*1的比率明显高于低发区和正常对照组, CYP3A\*3的纯合子的比率在肝癌高发区明显低于低发区和正常肝组织.

本实验通过对CYP3A5遗传多态性与肝癌的遗传易感性进行关联研究, 发现广西肝癌高发区CYP3A5高表达个体百分比明显高于广西肝癌低发区, 提示广西AFB1高污染区人群由于长期暴露于AFB1的污染环境中, 以致与AFB1代谢相关的酶表达增加, 对AFBO的易感性增加,

导致HCC高发, CYP3A5基因型和等位基因分布在高发区HCC组与低发区肝癌组及正常对照组之间存在差异, 但在本研究中尚未发现低发区与正常对照组之间存在差别, 这有待于扩大样本进一步深入研究.

总之, HCC是遗传因素和环境因素长期协同作用的结果, 是在个体遗传易感性的基础上, 在各种环境致癌因子的作用下, 体细胞遗传物质多种癌基因激活和/或抑癌基因失活等多方面改变, 最终使细胞增殖及分化发生紊乱所致.

#### 4 参考文献

- 1 侯全玲, 唐红, 黄飞骏. 乙型肝炎病毒X蛋白与原发性肝癌. 世界华人消化杂志 2008; 16: 50-55
- 2 Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 203-209
- 3 Lunn RM, Zhang YJ, Wang LY, Chen CJ, Lee PH, Lee CS, Tsai WY, Santella RM. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1997; 57: 3471-3477
- 4 Macé K, Aguilar F, Wang JS, Vautravers P, Gómez-Lechón M, Gonzalez FJ, Groopman J, Harris CC, Pfeifer AM. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1291-1297
- 5 Kamdem LK, Meineke I, Gödtel-Armbrust U, Brockmöller J, Wojnowski. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 577-586
- 6 Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7\*1C allele. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 625-631
- 7 许玲, 孙大志, 余志红. 关于肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考的问题. 世界华人消化杂志 2005; 13: 592-595
- 8 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391
- 9 Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 13-31
- 10 Balram C, Zhou Q, Cheung YB, Lee EJ. CYP3A5\*3 and \*6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 123-126
- 11 陆海霞, 冯震博, 冯小兰. 广西黄曲霉毒素B1高污染区肝细胞癌与细胞色素P3A5基因多态性的相关性. 中华肝病杂志 2007; 15: 705-706
- 12 Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski

#### ■名词解释

1 多态性: 是指在一个生物群体中, 同时和经常存在2种或多种不连续的变异型或基因型或等位基因, 亦称遗传多态性或基因多态性.

2 单核苷酸多态性: 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性, 只涉及单个碱基的变异, 这种变异可由单个碱基的转换或颠换所引起, 也可由碱基的插入或缺失所致.

## ■同行评价

本研究实验设计合理, 结论明确, 具有一定的学术价值.

- 13 L. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem* 2002; 277: 24280-24288
- 14 Bethke L, Webb E, Sellick G, Rudd M, Penegar S, Withey L, Qureshi M, Houlston R. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007; 7: 123
- 15 Wojnowski L, Turner PC, Pedersen B, Hustert E, Brockmöller J, Mendy M, Whittle HC, Kirk G, Wild CP. Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in The Gambia, West Africa. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 691-700

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志修回稿须知

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

### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出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、补充或删节时, 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, 须经得《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 2009-05-28)

## 恶性阻塞性黄疸临床分析153例

刁同进, 高百春, 蔡宏剑, 官林, 矫学黎, 于茜茜

刁同进, 官林, 矫学黎, 中国人民解放军济南军区第401医院肝胆外科(肝移植中心) 山东省青岛市 266071

高百春, 于茜茜, 中国人民解放军济南军区第401医院特检科 山东省青岛市 266071

蔡宏剑, 中国人民解放军济南军区第401医院肿瘤中心 山东省青岛市 266071

作者贡献分布: 刁同进对此课题的设计、实施操作、数据分析、总结、论文撰写与修改等方面做出主要贡献; 高百春、蔡宏剑、官林、矫学黎及于茜茜对此课题的实施、操作、分析、资料检索等方面予以大力协助与支持。

通讯作者: 刁同进, 副主任医师, 266071, 山东省青岛市市南区闽江路22号, 中国人民解放军济南军区第401医院肝胆外科(肝移植中心). diaotongjin@126.com

电话: 0532-51870835 传真: 0532-51870832

收稿日期: 2009-03-26 修回日期: 2009-04-29

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-28

### Malignant biliary obstructive jaundice: a clinical analysis of 153 cases

Tong-Jin Diao, Bai-Chun Gao, Hong-Jian Cai, Lin Gong, Xue-Li Jiao, Qian-Qian Yu

Tong-Jin Diao, Lin Gong, Xue-Li Jiao, Department of Hepatobiliary Surgery, the 401<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Bai-Chun Gao, Qian-Qian Yu, Department of Ultrasound-diagnosis, the 401<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Hong-Jian Cai, Department of Ultrasound-diagnosis, the 401<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Tong-Jin Diao, Department of Hepatobiliary Surgery, the 401<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China. diaotongjin@126.com

Received: 2009-03-26 Revised: 2009-04-29

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-28

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical application value of ultrasound-guided percutaneous transhepatic biliary drainages (PTCD) in 153 patients with malignant biliary obstructive jaundice (MBOJ).

**METHODS:** The 153 MBOJ cases were divided into four groups at our hospital from March 1995 to March 2008. Twenty seven MBOJ cases in group A were successfully placed expandable metal biliary stents (EMS) using PTCD by X-rays positioning (xPTCD). PTCD by ultrasound-guided (uPTCD) were operated in 75 MBOJ pa-

tients in group B. The 16 MBOJ cases in group C received xPTCD or uPTCD, and underwent endoscopic retrograde biliary drainage (ERBD) or endoscopic metal biliary endoprosthesis (EMBE). The 35 MBOJ patients in group D received exploratory laparotomy surgery by uPTCD or xPTCD from 1 wk to 4 mo.

**RESULTS:** The survival rates of half year, 1-year and 3-year were 52.6%, 10.5% and 0% in group A. The success ratios 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> placed the tube were enhanced more obviously in group B than in group A (88.7% vs 66.7%, 100% vs 76.7%,  $P < 0.01$ ). Survival rates of half year, 1-year and 3-year were 47.7%, 13.8% and 0%. Higher incidence of postoperative complications was observed in group C (68.8%) than in group A or group B ( $P < 0.01$ ). The survival rates of half year, 1-year and 3-year were 53.8%, 23.1% and 0%. The postoperative survival time in group D was more significantly prolonged ( $P < 0.01$ ). The survival rates of half year, 1-year, 3-year and 5-year were 77.8%, 66.7%, 18.5% and 14.8%.

**CONCLUSION:** uPTCD or xPTCD and/or ERBD or EMBE is a more effective treatment method of palliative treatment. The uPTCD for advanced MBOJ patients, in preoperative localization at diagnosis, preoperative degrading jaundice to improve liver function, are of important clinical values in the palliative treatment.

**Key Words:** Malignant obstructive jaundice; Percutaneous transhepatic cholangiography drainage; Expandable metallic stent; Endoscopic retrograde biliary drainage or endoscopic metal biliary endoprosthesis

Diao TJ, Gao BC, Cai HJ, Gong L, Jiao XL, Yu QQ. Malignant biliary obstructive jaundice: a clinical analysis of 153 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1575-1581

### 摘要

**目的:** 评价经皮经肝穿刺胆道内置管引流术(PTCD)在恶性阻塞性黄疸(MBOJ)患者中的临床诊断及其治疗价值。

**方法:** 回顾性分析我院1995-03/2008-03收

### ■背景资料

恶性阻塞性黄疸(MBOJ)尤其肝门部胆管癌及其壶腹周围癌,由于其部位的特殊性和高发病率,受到临床医师高度重视,一直是临床及基础医学研究的重要攻关课题。在临床上并不很常见,在诊断上却较为困难、很容易被误诊。在治疗上也较为棘手,目前全世界公认的最为有效的MBOJ的治疗措施是早期诊断并行根治性手术切除术。

### ■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

## ■ 研究前沿

近年来关于MBOJ患者是否需要术前胆管引流术减黄的观点已基本达成共识, 仅以胆红素水平作为主要减黄指标的方法基本被摒弃, 代之以患者的全身因素如营养状况、重要脏器功能、肿瘤位置等作为评估标准。随着影像医学的不断飞速发展和人们对胆管癌认识的不断加深, MBOJ尤其肝门部胆管癌及壶腹周围癌的早期诊断、扩大根治性切除术和增大手术彻底性已成为医学界的共识。

治153例MBOJ患者的临床资料。A组采用xPTCD并成功放置可膨胀性胆道金属内支架(EMS)治疗MBOJ患者27例; B组采用uPTCD治疗75例; C组选择uPTCD/xPTCD外引流及内窥镜下胆道内塑料或金属支架置入内引流术(ERBD/EMBE)内引流治疗16例; D组35例MBOJ选择PTCD及ERBD/EMBE内引流1 wk-4 mo后剖腹探查手术。

**结果:** A组第1、2、3及4次以上置管成功率66.7%, 76.7%, 83.3%及100%; 患者0.5、1及3年生存率分别为52.6%, 15.8%及0%; B组置管成功率较A组明显提高( $P<0.01$ ), 其第1及2次置管成功率88.7%及100%, 0.5、1及3年生存率分别为47.7%, 21.5%及0%; C组术后胆道感染、急性胰腺炎等并发症发生率较高为68.8%( $P<0.01$ ), 0.5、1及3年生存率分别为53.8%, 23.1%及0%; D组术后生存率较其他组明显延长( $P<0.01$ ), 0.5、1、3及5年生存率分别为77.8%、66.7%、18.5%及14.8%。

**结论:** PTCD/ERBD/EMBE是手术不能根治的恶性胆道梗阻较为有效的姑息性治疗方法, uPTCD对于晚期MBOJ患者术前定位定性诊断、术前减黄以改善肝功能及姑息性治疗方面均具有重要的临床价值。

**关键词:** 恶性阻塞性黄疸; 经皮肝穿刺胆道置管引流术; 经皮胆道金属内支架置入引流术; 内镜胆道塑料或金属支架内支撑引流术

刁同进, 高百春, 蔡宏剑, 宫林, 矫学黎, 于茜茜. 恶性阻塞性黄疸临床分析153例. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1575-1581  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1575.asp>

## 0 引言

恶性阻塞性黄疸(malignant biliary obstructive jaundice, MBOJ)尤其肝门部胆管癌及其壶腹周围癌, 由于其部位的特殊性和高发病率, 受到临床医师高度重视, 一直是临床及基础医学研究的重要攻关课题。在临床上并不常见, 在诊断上却较为困难、很容易被误诊。在治疗上也较为棘手, 目前全世界公认的最为有效的MBOJ的治疗措施是早期诊断并行根治性手术切除术。恶性梗阻性黄疸因其起病隐匿, 大多数患者被确诊时往往已属于晚期, 尤其高龄危重患者往往合并其他重要脏器功能障碍或不全而不能耐受或拒绝接受外科根治性切除术, 而丧失根治性手术的机会。超声或X线引导下经皮经肝穿

刺胆道内置管引流术(percutaneous transhepatic cholangiography drainage, PTCD)或内窥镜下胆道内塑料或金属支架置入内引流术(endoscopic retrograde biliary drainage/endoscopic metal biliary endoprosthesis, ERBD/EMBE)仍是一种较为有效的姑息性治疗手段, 对减轻胆道梗阻所致的高胆红素血症以及改善肝功能、提高生存质量、减轻痛苦、延长生存时间、为其他辅助治疗提供更多的机会均具有重要的临床意义。我院南北院区1995-03/2008-03共收治部分MBOJ患者153例, 取得满意治疗效果。本文旨在总结PTCD的临床价值, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院南北院区1995-03/2008-03共收治部分MBOJ患者153例, 男115例, 女38例, 平均年龄62.7岁。采用日本Aloka-1200、3500型线阵穿刺探头及百胜AU5凸阵探头配备穿刺引导架。MBOJ患者临床表现主要有皮肤巩膜进行性无痒性加重的黄疸、尿色变深、陶土样大便、全身皮肤瘙痒, 黄疸出现时间10-45 d。所有患者均经BUS、CT、胃镜、经内镜逆行胆胰管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)、磁共振水胆道成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP), 肝组织活体检、剖腹手术、病理切片等确诊。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及治疗:** 本组MBOJ患者153例, 分为以下4组: A组采用传统方法经X线定位下经皮肝穿刺胆道置管引流术(percutaneous transhepatic cholangiography drainage by X-rays positioning, xPTCD)并成功放置可膨胀性胆道金属内支架(expandable metallic stent, EMS)治疗MBOJ 27例, 男20例, 女7例, 年龄53-78岁; 其中, 肝门部胆管癌13例(48.1%), 按Bismuth-Colette分型: I型1例, II型3例, IIIa型2例, IIIb型4例, IV型3例; 胆管癌中段1例(3.7%); 壶腹周围癌8例(29.6%), 其中, 胆管癌下段3例, 胰头癌3例, 十二指肠乳头癌2例; 胃癌术后肝门部转移癌3例(11.1%); 胆囊癌伴肝门部转移2例(7.4%)。B组采用经超声引导下经皮肝穿刺胆道置管引流术(ultrasound-guided percutaneous transhepatic biliary drainage, uPTCD)治疗MBOJ 75例, 男52例, 女23例, 年龄55-87岁。肝门部胆管癌33例(44.0%), 其中, I型4例, II型7例, IIIa型10例, IIIb型7例, IV型5例; 胆管癌(中段)3例(4.0%);

壶腹周围癌32例(42.7%), 其中, 胆管癌(下段)5例, 胰头癌23例, 十二指肠乳头癌4例; 其他7例(9.3%), 原发性肝癌伴胆道癌栓2例, 肝内胆管癌伴胆道癌栓2例, 原发性肝癌伴肝门部转移癌3例. C组选择uPTCD/xPTCD及ERCP胆道塑料内支架置入引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)或胆道金属支架置入内引流术(endoscopic metal biliary endoprosthesis, EMBE)治疗MBOJ 16例, 其中, 男13例, 女3例, 年龄65-92岁; 肝门部胆管癌5例(31.2%), 其中, IIIa型1例, IV型4例; 壶腹周围癌11例(68.8%), 其中, 胆总管下段癌7例, 胰头癌1例, 十二指肠乳头癌3例. D组选择uPTCD/xPTCD以及ERBD/EMBE引流1 wk-4 mo后剖腹探查手术35例. 其中, 男30例, 女5例, 年龄45-68岁; 肝门部胆管癌13例(37.1%), 其中, I型2例, II型3例, IIIa型3例, IIIb型4例, IV型1例; 胆管癌中段2例(5.7%); 壶腹周围癌18例(51.4%), 其中, 胆管癌(下段)3例, 胰头癌11例, 十二指肠乳头癌4例; 其他为原发性肝癌伴胆管癌栓2例(5.7%).

1.2.2 uPTCD及xPTCD操作: (1)uPTCD操作: 患者采用取平卧位, 常规消毒铺巾单, 超声定位靶胆管, 穿刺方向、高度、进针距离及角度, 患者平静吸气、将18G-20G胆管穿刺针或19G-21G肝叶针沿探头引导槽预定路径, 局部麻醉下成功穿刺靶胆管内、插入导丝、置入PTCD引流管, 妥善固定, 接无菌引流袋, 必要时行胆道造影. 常规取胆汁送细菌培养及药物敏感试验, 以指导临床抗生素的应用. 术后密切注意胆汁引流及导管通畅情况. (2)xPTCD操作: 患者先在X线监视下常规行PTC胆道造影, 定位穿刺靶胆管, 用5F-6F肝穿刺针行PTC. 穿刺成功后置入PTCD管引流3-5 d. 依据患者病情改善状况再确定植入胆道内支架引流时间. 放置胆道Wallstent内支撑架时先自外引流管注入少量造影剂以了解引流管是否移位、胆管狭窄程度、肿瘤位置及范围等情况, 然后插入导丝通过胆道狭窄段到达十二指肠内, 退出PTCD引流管并沿导丝插入球囊扩张器扩张胆道狭窄段, 然后插入输送器, 胆道Wallstent内支撑架释放完成, 再重新植入PTCD外引流管. 术后继续保留外引流2 wk, 造影复查内支架位置准确、扩张胆道通畅, 再拔除外引流管.

**统计学处理** 两组间的比较采用 $t$ 检验, 两组以上的比较采用 $F$ 检验, 率的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 有统计学意义.

表 1 恶性阻塞性黄疸153例不同治疗方式生存期比较  $n(\%)$

分组	$n$	随访	生存期(年)			
			0.5	1	3	5
A	27	19(70.4)	10(52.6)	3(15.8) <sup>d</sup>	0	0
B	75	65(86.7)	31(47.7) <sup>d</sup>	14(21.5) <sup>d</sup>	0	0
C	16	13(81.3)	7(53.8)	3(23.1) <sup>d</sup>	0	0
D	35	27(77.1)	21(77.8)	18(66.7)	5(18.5) <sup>b</sup>	4(14.8) <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs A, B, C组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs D组.

## 2 结果

A、B、C 3组在性别、年龄、重要脏器功能状态、肿瘤部位、临床分期、分级、引流方式之间的疗效及生存率差异无显著性意义( $P>0.05$ ). D组年龄较轻及其他重要脏器功能较其他A、B、C三组相对良好( $P<0.05$ ), 但A组及C组术后胆道感染、气胸和急性胰腺炎的发生率明显增高( $P<0.01$ ), A组及C组手术时间较B组长, 手术及材料费用高. B组与A组相比置管成功率较高( $P<0.01$ ), D组术后生存率与A、B、C 3组比较明显延长( $P<0.01$ ).

2.1 A组 27例MBOJ患者经X线定位下PTCD 30例次, 第1、2、3及4次以上置管成功率20/30(66.7%), 23/30(76.7%), 25/30(83.3%)及100%; PTCD引流3-7 d后, 再用介入方式放置Wallstent EMS置入内引流术27例共置入30 EMS枚, 对3例肝门部胆管癌IV型的左右肝管同时分别置入1枚EMS胆道金属内支架行双侧内引流术. 术后出现急性胆管炎8例(29.6%), 术后出现气胸3例(11.1%); 有2例术后立即出现膈神经受损的症状; 有2例1 wk后胆道引流管脱出, 选择再次行PTCD, 同时行EMS置入内引流术(表1-2).

2.2 B组 75例MBOJ经B超声引导下PTCD引流术80例次, 其中, 第1次及2次置管成功率88.7%(71/80)及100%; 术后出现急性胆管炎5例; 本组有3例患者首次因穿刺针进入胆管后导丝送入过深引起导丝头端折叠导致首次PTCD穿刺失败, 择期行2次穿刺置管引流成功. 本组无胆漏、胆汁性腹膜炎、血气胸、腹腔内出血、急性胰腺炎等并发症. 术后生存期最短2例, 其中, 有1例患者属于82岁高龄、因合并双肺重度纤维化、支气管哮喘、肺部感染(真菌及细菌混合感染)、高血压、冠心病、肝肾综合征等, 于术后15 d死于肺部感染、急性肾功能衰竭、肺功能衰竭; 另1例属于88岁高龄、合并糖尿病、

## ■相关报道

多数学者认为ERBD/EMBE术后可结合肝动脉插管灌注栓塞化疗(TACE)或局部内、外放射治疗, 在一定程度上可抑制局部肿瘤的生长, 延长支架通畅时间, 进一步延长患者的带瘤生存期或为二期根治性手术切除提供机会.

## ■创新盘点

本文通过对153例恶性阻塞性黄疸患者诊断与治疗的临床分析, 评价PTCD在临床诊断及治疗的价值。

表 2 恶性阻塞性黄疸118例姑息性治疗术后并发症比较  $n(\%)$ 

分组	<i>n</i>	急性胆管炎	急性胰腺炎	气胸	膈神经损伤	合计
A(xPTCD)	27	8(29.6) <sup>b</sup>	0(0)	2(7.4)	2(7.4)	12(44.4) <sup>b</sup>
B(uPTCD)	75	5(47.7)	0(0)	0(0)	0(0)	5(47.7)
C(ERBD/ERME)	16	6(37.5) <sup>b</sup>	5(31.3) <sup>d</sup>	0(0)	0(0)	11(68.8) <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs B组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs A组或B组。

双侧股骨头无菌性坏死、高血压、冠心病、完全性房室传导阻滞、成对性房性早搏、成对性室性早搏及房颤, 于术后12 d死于急性心功能衰竭。PTCD 24 h胆汁引流量一般为150-1200 mL, 术后5-20 d黄疸逐渐消退, 梗阻性黄疸症状和体征明显改善, 2-3 wk内血清总胆红素逐渐降至接近正常范围, 引流效果满意, 有效地改善了患者生存质量(表1-2)。

2.3 C组 16例MBOJ患者选用经BUS或X-rays引导下PTCD以及ERBD/EMBE, 其中, 有4例IV型肝门部胆管癌患者先行ERBD/EMBE, 术后并发急性胆管炎, 考虑单侧支架引流效果不好, 再行对侧PTCD外引流术, 有2例1-2 wk内PTC管脱出, 再行EMBE内引流术; 另有10例先行PTCD引流后又接受了ERBD/EMBE。C组术后并发症发生率较高68.8%, 其中, 急性胆管炎6例(37.5%)、急性胰腺炎5例(31.3%)。随访率81.3%(13/16), 生存期3-15 mo, 中位生存期10.6 mo。患者0.5年、1年及3年生存率分别为53.8%, 23.1%及0%(表1-2)。

2.4 D组 35例MBOJ患者行uPTCD/xPTCD及ERBD/EMBE术后1 wk-4 mo又接受了剖腹探查手术。本组壶腹周围癌18例中有7例胰头癌、3例十二指肠乳头癌、2例胆总管下段癌选择了胰十二指肠根治性切除术, 有4例胰头癌、1例胆管癌(下段)及1例十二指肠乳头癌选择姑息性胆管或胆囊空肠内引流术及胃空肠吻合术。其中, 有1例56岁男性胰头癌患者, 在EMBE术后1 wk患者强烈要求手术, 予以成功实施胰十二指肠根治性切除术。有2例原发性肝癌伴胆管癌栓及1例IV型肝门部胆管癌患者, 成功实施同种异体改良背托式原位肝移植手术, 1例存活22 mo、1例存活3年死于肿瘤复发转移, 另1例自2003-12手术至今, 仍健康存活, 存活约51 mo。目前患者肝脏功能及肿瘤标志物正常, BUS及CT等影像学未见肿瘤复发征象。本组肝门部胆管癌I型2例、II型1例、IIIa型1例、IIIb型4例及胆管癌(中段)1例, 均成功实施肝门部胆管癌根治

性切除术, 或左半肝切除、或尾状叶、或方叶切除术、或门静脉部分切除术再移植(或修复)术, 肝门部胆管整形肝门板胆管空肠悬挂式(盆式)Roux-en-Y吻合术及T型管引流术。肝门部胆管癌有2例II型、2例IIIa型及1例胆管癌(中段)因肿瘤浸润肝动脉或门静脉而放弃肿瘤切除术, 行姑息性胆管或胆囊空肠吻合术及T型管引流术。其中, 有1例肝门部胆管癌II型及1例胆管癌(中段)行EMBE后4 mo成功行肝门部胆管癌切除术(1例R1, 1例R0)及肝门部胆管空肠盆式Roux-en-Y吻合术。随访率77.1%(27/35), 术后0.5年、1年、3年及5年生存率分别为77.8%, 66.7%、18.5%及14.8%(表1)。

### 3 讨论

MBOJ是一组由胆管系统管腔内、外或管壁本身的恶性病变所引起的胆管机械性阻塞, 包括肝内外胆管癌、胆囊癌、原发性肝癌、壶腹部癌、胰头癌、十二指肠降段癌及肝门部转移性癌等, 常伴有阻塞近端的胆管扩张及胆道感染, 在诊断及治疗上却较为棘手、常常误诊的疾病之一<sup>[1]</sup>。临床表现主要有皮肤巩膜进行性加重的无疼性黄疸, 尿色变深、陶土样大便, 全身皮肤瘙痒、肝区隐痛不适、乏力、纳差、恶心及呕吐等消化系症状。一般MBOJ的外科手术治疗仍是目前最重要和唯一的根治性方法, 而临床确诊时往往因高龄、危重或重要脏器功能不全等不能耐受或家属拒绝肿瘤根治性切除术而失去手术根治的机会, 超声或X线引导下PTCD或ERBD/EMBE仍是一种较为有效的姑息性治疗手段。

PTCD是目前肝胆外科比较常用的基本治疗手段之一, 并且具有较广泛的适应证, 应用于良、恶性阻塞性黄疸, 高位或低位, 轻、中、重度的阻塞性黄疸以及外科手术后胆道狭窄、胆道阻塞性病变等方面更具有优越性。20世纪50年代Cater首先报道了经皮肝穿刺胆道引流术后, 人们才逐渐关注并认识了这一新技术, 60年代

Seldinger *et al*对PTC的穿刺途径及穿刺针进行了改进而使其并发症得到了明显的降低。70-80年代逐渐应用EMBE内引流术。我院自20世纪80-90年代开始采用传统方法xPTCD, 本组收集我院1995-03/2000-03收治MBOJ部分患者27例, 并成功放置EMS30例次, 1、2、3及4次置管成功率分别为66.7%、76.7%、83.3%及100%; 其0.5年、1年及3年生存率分别为52.6%、15.8%及0%。术后发生急性胆管炎8例(29.6%), 气胸3例(11.1%), 膈神经损伤2例(7.4%), PTCD引流管脱出2例(7.4%)。传统方法经X线定位下PTCD术后并发症较多、约为58.9%, 费时较长、穿刺成功率不高, X射线曝射量却较高。2000年以后我们逐渐采用uPTCD治疗MBOJ75例, 取得较为满意的效果, 穿刺时间较短、成功率较xPTCD组明显提高( $P<0.01$ ), 其2次置管成功率为100%; 术后总的并发症为6.7%, 较xPTCD组明显降低, 两组比较有非常显著性差异( $P<0.01$ )。MBOJ患者凝血机制往往较差、大量腹水、糖尿病合并全身感染、合并心肺等严重疾病或患者身体状况极度衰竭者, 为PTC相对禁忌证。MBOJ非手术胆汁引流术的方法一般有X线、CT和超声引导下PTCD及ERBD/EMBE。X线引导下PTC为“半盲”下穿刺, 盲目性较大, 成功率较低, 目前我院2000年以后临床上已较少应用。ERCP及CT引导下PTCD操作较为复杂、价高费时费力, 20世纪80-90年代ERCP术后急性胆管炎、急性胰腺炎等并发症较多, 而近十余年来随着内窥镜微创技术的广泛应用, 其技术也日趋成熟, ERCP并发症也较以往明显减少。B组属于PTCD外引流术, 其优点外引流管易脱落、不方便患者, 易引起胆汁大量丢失。C组主要为内引流及外引流术, 其优点在于患者较易接受, 可以减少大量胆汁的丢失, 避免水电解质紊乱, 有助于脂溶性维生素的吸收。该两组均为姑息性治疗, 统计学生存率无明显差别( $P>0.05$ ), 但ERCP费时较长, 费用较高, 技术要求较高, 尤其容易引起致命的急性胰腺炎等严重并发症为其最大缺点。而超声引导下PTCD, 因其微创价廉、简便快捷、安全准确、具有床边可操作性、并发症较少、术前准备简单、无X线曝射之虑, 患者、家属及外科医生均乐意接受。

PTCD对左、右肝管同时进行置管引流术, 还可进行胆道内或外引流术, 内引流术除减黄外还可避免胆汁等营养物质丢失, 有利于改善

消化功能。据报道PTCD可同时对肿瘤组织进行活检<sup>[2]</sup>。PTCD及其ERBD/EMBE作为一种姑息性疗法, 能够使患者无黄疸生存, 对其恶性原发病并无治疗作用, 如果不控制原发肿瘤的发展, 短期2-4 mo内往往容易引起支架阻塞, 而使支架失去功能为其缺点。因此, 积极治疗原发病仍然是支架置入术后提高疗效的关键所在。多数学者认为ERBD/EMBE术后可结合肝动脉插管灌注栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)或局部内、外放射治疗, 在一定程度上可抑制局部肿瘤的生长, 延长支架通畅时间, 进一步延长患者的带瘤生存期或为二期根治性手术切除提供机会。本组有1例肝门部胆管癌II型及1例胆管癌(中段)行EMBE 4 mo后发生胆管支架梗阻, 又成功实施II期肝门部胆管癌切除术。

肝门部胆管癌、胰腺癌、壶腹周围癌及转移癌等多为少血供肿瘤, 且血供特殊、碘油沉积欠佳, 因而, 动脉栓塞化疗对这类肿瘤的作用十分有限。外照射治疗对肝门部胆管癌、胰腺癌、壶腹周围癌及转移癌等虽有一定疗效, 但由于瘤体周围有肝脏、胰腺、胃肠道及其肾脏等对放射线较敏感的器官, 限制了外照射的剂量, 因而影响疗效的提高。近年来, 已有较多的学者开始采用支架植入后的腔内放射治疗、避免了外照射的缺点, 多经PTCD途径置入放射源<sup>192</sup>In, 运用胆管腔内放射使其照射的区域局限在肿瘤和胆管系统, 可安全有效的控制肿瘤的生长发展。目前该项治疗已成为MBOJ姑息性疗法的较为理想的选择<sup>[3]</sup>。ERBD/EMBE近年来已经发展为较成熟的技术, 此方法与外引流相比, 具有损伤小、恢复快的优点, 是一种比较符合生理要求的理想引流方式, 避免外引流所引起的胆汁及电解质丢失、维持了正常胆盐的肠肝循环、保持了一定的生存质量。但后期支撑管易堵塞和黄疸易复发, 也不能解除十二指肠梗阻。主要适用于: (1)预计生存时间不超过4 mo或年老体弱等高危、高龄、晚期MBOJ患者; (2)血清胆红素浓度过高的梗阻性黄疸的术前减黄, 一般认为血清总胆红素 $>256-342 \mu\text{mol/L}$ 。对于估计生存期较长、已失去手术机会的MBOJ患者, 应积极选择手术内引流较为适宜。

ERCP能同时显示胰管、胆管和壶腹部, 对不明原因的阻塞性黄疸具有诊断价值, 此外还能直接观察十二指肠乳头, 并收集胰液作脱落细胞学检查。但在已有阻塞性黄疸的情况下作

#### ■应用要点

PTCD/ERBD/EMBE是手术不能根治的恶性胆道梗阻较为有效的姑息性治疗方法。uPTCD对于晚期MBOJ患者术前定位定性诊断、术前减黄以改善肝功能及姑息性治疗方面均具有重要的临床价值。

# ■同行评价

本文对于恶性阻塞性黄疸的诊断及治疗提供借鉴. 文章数据充实, 内容详细, 分析得当, 意义明确, 具有一定的临床意义.

ERCP有诱发胆道感染、急性胰腺炎的危险. 尽管PTC和ERCP检查是20世纪90年代阻塞性黄疸的主要诊断手段, 目前多数学者已不赞成把PTC及ERCP作为MBOJ的常规诊断性检查, 而仅作为MBOJ的姑息性治疗手段、而非诊断性检查为目的. 进入21世纪以后, 随着对胆管癌病理的不断认识和现代医学的不断飞速发展进步, 超薄多层CT(multi-slice computed tomography angiography, MSCT)、血管成像技术(computed tomography angiography, CTA)及磁共振胆道水成像技术(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)等较为理想的无创性检查技术日趋成熟, 自2003年以后, 我院由于成功开展了同种异体原位肝脏移植术及亲属活体部分肝脏移植技术, 带动相关科室陆续开展了这些新技术. MRCP作为一种特异性及敏感性极高的无创性方法, 应当首先应用于MBOJ及各种胆胰管疾病的临床诊断中, 具有简单、安全、无创、无放射线辐射等优点, 能够清晰精确提供关于MBOJ患者的胆道系统的解剖情况、提供关于肝门区的血管结构、淋巴结转移情况以及相应肝叶萎缩程度, 间接提示有无门静脉、肝动脉侵犯<sup>[4-5]</sup>. 而MSCT及CTA技术的三维融合像则能够更直观、清楚显示肿瘤与肝门血管、胆管的空间位置及其肝门部大血管受压或受侵犯情况, 有助于外科医师术前对病变作出准确定位性判断、对肿瘤的可切除性术前能够准确评价, 从而选择正确的术式等提供重要的参考依据<sup>[6]</sup>. 低张超薄MSCT尤其对壶腹周围癌具较高的诊断价值, 胃肠道扫描时处于低张状态、十二指肠充分扩张, 减少胃肠道蠕动的伪影, 清楚显示病灶, 可避免普通强化CT遗漏早期壶腹周围癌<sup>[7-8]</sup>.

MBOJ关于术前是否胆道引流术减黄的问题一直是人们争论的焦点<sup>[9]</sup>. 20世纪术前减黄的应用较为普遍, 高位胆管癌患者术前发生肝功能损害的程度往往较壶腹周围癌患者更为严重, 对手术根治性切除术、尤其肝门阻断下的极量肝叶切除术的耐受性更差, 术后发生肝功能衰竭等并发症的几率更高, 有些国外学者的观点更倾向于合理应用术前减黄以保证手术的安全性<sup>[10-11]</sup>. 进入21世纪随着医疗技术水平、尤其外科手术技能以及术后围手术期重症监护水平的不断飞速提高, 术前减黄的标准发生了微妙的改变, 术前减黄的应用逐渐减少, 但未形成统一标准<sup>[12-13]</sup>. 减黄的标准有人认为血清总胆红素

>256  $\mu\text{mol/L}$ 并持续>4 wk; 全志伟 *et al*<sup>[14]</sup>主张血清总胆红素>500  $\mu\text{mol/L}$ . 但何科基 *et al*<sup>[15]</sup>对94例壶腹周围癌的胰十二指肠切除术后并发症及死亡率的危险因素进行系统分析, 结果发现其主要危险因素为术中出血量、手术时间长短、血清胆红素水平及黄疸持续时间. 认为术前是否行减黄治疗对手术并发症和死亡率的影响差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 主张血清总胆红素>342  $\mu\text{mol/L}$ , 全身情况较差、梗阻时间较长、有严重凝血功能障碍, 胆道梗阻合并胆道感染或并发急性重症胆管炎者, 应考虑先行ERCP鼻胆管引流或放置ERBD/EMBE引流术前减黄, 待病情稳定后再及早行胰十二指肠切除术为妥. 近年来, 关于MBOJ患者是否需要术前胆管引流术减黄的观念已基本达成共识, 仅以胆红素水平作为主要减黄指标的方法基本被摒弃, 代之以患者的全身因素如营养状况、重要脏器功能、肿瘤位置等作为评估标准. 认为术前黄疸较重、术后有肝衰可能、拟行极量肝切除(60-75%)的MBOJ患者, 手术时机一般选择在胆管引流术后3-4 wk为宜.

随着影像医学的不断飞速发展和人们对胆管癌认识的不断加深, 肝门部胆管癌因其部位的特殊性和高发病率近年来尤其受到医学专家的格外重视, 肝门部胆管癌约占肝外胆管癌的58%-75%, 越来越多的医学专家开始将胆管癌的治疗寄希望于早期确诊并行根治性切除术<sup>[16]</sup>. 由于肝门部胆管癌特殊的转移方式主要是沿胆管壁上下浸润及沿神经周围、淋巴间隙转移, 胆管周围重要结构如肝动脉、门静脉、肝实质等易受侵犯. 肝十二指肠韧带结缔组织内癌细胞残留是胆管癌术后复发的重要因素. 胆管癌的手术治疗主要包括根治性切除、姑息性切除和单纯引流术. 具体术式可选择肿瘤局部切除, 肝十二指肠韧带骨骼化、联合部分肝切除术或/和尾状叶切除术、连同门静脉和/或肝动脉切除术, 和/或联合胰十二指肠切除术、全肝切除后原位肝移植术等. 我院自2003年开展肝移植以来, 共实施肝移植手术80余例, 其中, 有2例原发性肝癌伴胆管癌栓及1例IV型肝门部胆管癌患者, 均成功实施同种异体改良背驮式原位肝移植手术, 1例存活22 mo, 1例存活3年死于肿瘤复发转移; 另1例自2003-12手术至今, 仍健康存活, 目前已存活51 mo, 患者肝脏功能及肿瘤标志物正常, BUS及CT等影像学未见肿瘤复发征

象. 本研究D组手术35例, 27例获得随访, 术后患者0.5年、1年、3年及5年生存率分别为77.8%、66.7%、18.5%及14.8%, 与A、B、C 3组相比较, 术后生存率明显延长( $P<0.01$ ). 因此, MBOJ尤其肝门部胆管癌及壶腹周围癌的早期诊断、扩大根治性切除术和增大手术彻底性已成为医学界的共识.

总之, uPTCD/xPTCD及其ERBD/EMBE是手术不能根治的恶性胆道梗阻较为有效的姑息性治疗方法, uPTCD对于晚期MBOJ患者术前定位定性诊断、术前减黄改善肝功能和姑息性治疗方面均具有重要的临床价值, 具有微创价廉、简单快捷、安全准确、床边可操作性、并发症较少等优点. 对于胆管癌及壶腹周围癌所致的MBOJ, 手术根治性切除术是目前唯一有效和可治愈的首选治疗手段.

#### 4 参考文献

- 1 何效东, 董家鸿, 赵晓雷, 周振宇, 崔泉, 宋健, 杨毅. 肝门部胆管癌的诊断与外科治疗. 中华肝胆外科杂志 2008; 14: 582-584
- 2 韩新巍, 李永东, 马南, 邢古生, 吴刚, 马波. 经皮肝穿刺胆道造影术下的胆道活组织检查诊断阻塞性黄疸. 胃肠病学和肝病杂志 2003; 16: 470-472
- 3 张永春, 顾占军, 邓晓涛, 韩京芬, 李果珍. 经皮胆管内支架放置术并发症及发生意外情况的处理方法. 中华放射学杂志 2002; 36: 1084-1086
- 4 袁维军, 张效智. 低场强MRCP在低位胆管梗阻定性诊断中的应用价值. 医学影像学杂志 2008; 18: 203-205
- 5 李宁, 杨贞振. MRCP在梗阻性黄疸性疾病中的应用价值及进展. 医学影像学杂志 2008; 18: 87-90
- 6 张追阳, 丁乙, 李建平, 丁忠, 张雷, 金慧涵, 龚镭, 马建勇. 3D CT成像对肝门部胆管癌的可切除性评价. 临床放射学杂志 2008; 27: 46-50
- 7 刘焱, 陈宏伟, 钱萍艳, 陈玉林, 吴曼莉, 陈国兰. 低张MSCT增强扫描在胆总管壶腹部梗阻诊断中的价值. 影像诊断与介入放射学 2008; 17: 7-9
- 8 钱懿, 曾蒙苏. 肝门胆管癌的MSCT诊断及可切除性评价. 放射学实践 2008; 23: 215-217
- 9 褚光平, 朱其一. 恶性梗阻性黄疸术前减黄观念的变迁. 肝胆外科杂志 2008; 16: 156-157
- 10 Mansfield SD, Barakat O, Charnley RM, Jaques BC, O'Suilleabhain CB, Atherton PJ, Manas D. Management of hilar cholangiocarcinoma in the North of England: Pathology, treatment, and outcome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7625-7630
- 11 Seyama Y, Makuuchi M. Current surgical treatment for bile duct cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1505-1515
- 12 何晓东, 康维明. 恶性梗阻性黄疸的术前减黄与Ⅱ期手术. 中国医刊 2002; 37: 14-16
- 13 刘宇斌, 简志祥, 刘子贤, 区金锐. 肝门部胆管癌的外科治疗. 第一军医大学学报 2004; 24: 1401-1403
- 14 全志伟, 田伏洲, 吴志勇, 余云, 杨福全, 梁力建, 苗毅, 戴存才, 郭峰, 王宇, 王健东, 王忠裕, 何振平, 姜洪池, 秦鸣放, 田雨霖, 谭毓铨, 王贵民. 恶性梗阻性黄疸术前减黄的利弊及合理选择. 中国实用外科杂志 2007; 27: 776-778
- 15 何科基, 焦兴元, 杨学伟, 胡以则. 影响胰十二指肠切除术后并发症发生的相关因素分析. 癌症 2008; 27: 75-77
- 16 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗观念能否有所转变. 临床外科杂志 2008; 16: 3-4

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28中期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28中期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-05-28)

# 中国人群幽门螺杆菌感染相关因素的Meta分析

张天哲, 张铁民, 赵丹丹, 唐桂钰

## ■背景资料

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 感染是世界范围广泛存在且最常见的细菌感染之一。许多研究证实 *H. pylori* 感染是成年人胃肠疾病发生的重要因素, 是消化性溃疡、胃癌发生的危险因素。目前 *H. pylori* 感染已经发展成世界性问题。我国是 *H. pylori* 高感染国家, 普通人群的感染率为 34.52%-80.55%, 多数地区人群感染率在 50% 左右, 平均感染率为 58.07%。我国约有 7 亿人感染 *H. pylori*, 已经发展为严重危害我国居民健康的公共卫生问题。

张天哲, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科 河北省煤矿卫生与安全实验室 河北省唐山市 063000

张铁民, 唐山钢铁公司医院儿科 河北省唐山市 063000

赵丹丹, 华北煤炭医学院预防医学系预防医学教研室 河北省唐山市 063000

唐桂钰, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 此课题由张天哲与张铁民设计; 由唐桂钰、张铁民及赵丹丹检索文献收集数据; 统计分析由张天哲与唐桂钰完成; 本论文写作由张天哲、张铁民及唐桂钰完成; 赵丹丹在研究中给予极大的工作支持。

通讯作者: 张天哲, 副教授, 063000, 河北省唐山市建设南路 57 号, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科。tianzhezhang@sina.com

电话: 0315-3725719 传真: 0351-3725713

收稿日期: 2008-12-27 修回日期: 2009-04-29

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-28

## Meta-analysis of factors relative to *Helicobacter pylori* infection in China

Tian-Zhe Zhang, Tie-Min Zhang, Dan-Dan Zhao, Gui-Yu Tang

Tian-Zhe Zhang, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University; Laboratory of Occupational Health and Safety For Coal Industry of Hebei Province, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Tie-Min Zhang, Department of Pediatrics, Hospital of Tangshan Steel Company, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Dan-Dan Zhao, Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Gui-Yu Tang, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Tian-Zhe Zhang, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University, 57 Jianshe Southern Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. tianzhezhang@sina.com

Received: 2008-12-27 Revised: 2009-04-29

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the factors relative to *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection using meta-analysis so as to provide evidence for preventing *H. pylori* infection.

**METHODS:** Articles published from 1990 to 2008

on the relationship between factors and *H. pylori* infection were searched in CNKI database and CBM database, using the searching terms "*Helicobacter pylori*", "infection", "relative factors", "epidemiology", etc. Meanwhile, Relative journals were manually looked up. Chinese literatures about factors relative to *H. pylori* infection were collected and quantitatively analyzed by Meta-analysis, using OR value as the effect index. According to result of test for homogeneity, pooled odds ratio (OR) values and 95% confidence interval (CI) were calculated by choosing a fixed effect model or a random effect model. At the same time, sensitivity analysis was performed by two methods, that were eliminating studies of single variate analysis and changing models. Fail-Safe Number ( $N_{fs}$ ) were calculated to evaluate the publication bias.

**RESULTS:** Twenty one epidemiological studies on factors relative to *H. pylori* infection were analyzed synthetically using Meta-analysis. The pooled odds ratio (OR) values and 95% CI of the factors were as follows: history of stomach disease 2.09 (1.40, 3.12), drinking contaminated water 2.01 (1.35, 3.00), drinking unboiled water 3.08 (1.02, 9.26), being nursed by persons with gastric disease 2.43 (1.74, 3.40), feeding dogs 1.75 (1.02, 3.00), being fed with chewed food at a young age 2.66 (1.41, 5.02), smoking 1.47 (1.09, 1.97), eating cured food 1.94 (1.25, 3.02) and 1.87 (1.43, 2.44), eating garlic 0.67 (0.56, 0.80), eating bean products 0.37 (0.17, 0.79). In the study, the relationships of factors with *H. pylori* infection, such as sex, eating uncooked vegetables, drinking, taking antibiotics were not found out.

**CONCLUSION:** The factors which we selected to analyze in our study influencing Chinese people infected with *H. pylori* include stomach disease history, drinking contaminated water, drinking unboiled water, feeding dogs, being fed with chewed food, eating cured food, eating garlic and bean products.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Infection; Meta-analysis; Relative factors

Zhang TZ, Zhang TM, Zhao DD, Tang GY. Meta-analysis

## ■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科; 刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

of factors relative to *Helicobacter pylori* infection in Chinese literature in China. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(15): 1582-1589

1582-1589

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1582.asp>

## 摘要

**目的:** 评价*H pylori*感染的相关因素, 为预防决策提供依据。

**方法:** 以“幽门螺杆菌”、“感染”、“相关因素”和“流行病学”等为检索词, 检索CNKI中国期刊全文数据库及CBM光盘数据库, 并辅以文献追溯、手工检索等方法收集1990-01/2008-05国内正式刊物上公开发表的有关*H pylori*感染相关因素的研究文献。对这些研究中涉及的某些相关因素采用Meta分析方法选择危险比值比OR值作为效应指标进行综合定量分析, 估计其合并OR值及其95%CI。根据异质性检验结果选择固定效应模型或随机效应模型进行合并, 并从原始文献统计方法采用单因素分析还是多因素分析及变换模型2个角度进行敏感性分析, 评价Meta分析结论的稳定性, 同时计算失效安全系数来估计发表偏倚的大小。

**结果:** 纳入本次Meta分析的文献共21篇, 涉及包括来自宿主的因素(性别、本人胃病史)、行为习惯(吸烟、饮酒、饮用水源、饮水习惯、养狗、近期服用抗生素)、饮食习惯(进食生蔬菜、豆类、大蒜、腌制食物、熏制食物)、家人或照顾者胃病史及年幼时是否接受口嚼食物, 可能与*H pylori*感染相关的因素OR值及其95%CI分别为: 本人胃病史2.09(1.40, 3.12)、看护人胃病史2.43(1.74, 3.40)、饮用不洁水源2.01(1.35, 3.00)、饮水习惯3.08(1.02, 9.26)、养狗1.75(1.02, 3.00)、接受过口嚼食物2.66(1.41, 5.02)、吸烟1.47(1.09, 1.97)、经常食用大蒜0.67(0.56, 0.80)、豆类0.37(0.17, 0.79)、熏制1.94(1.25, 3.02)及腌制食物1.87(1.43, 2.44), 性别、近期服用抗生素、饮酒、经常食用生蔬菜与*H pylori*感染无关。

**结论:** 在选择的15个因素中, 影响我国人群*H pylori*感染的主要因素为本人胃病史、看护人胃病史、饮用不洁水源、喝生水、养狗、接受过口嚼食物、吸烟、经常食用大蒜、熏制及腌制食物等。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 感染; Meta分析; 相关因素

张天哲, 张铁民, 赵丹丹, 唐桂钰. 中国人群幽门螺杆菌感染相关因素的Meta分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(15):

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染是世界范围广泛存在且最常见的细菌感染之一。许多研究证实*H pylori*感染是成年人胃肠疾病发生的重要因素, 是消化性溃疡、胃癌发生的危险因子。据报道在全球自然人群的感染率超过50%<sup>[1]</sup>, 目前*H pylori*感染已经发展成一个世界性问题。我国是*H pylori*高感染国家, 普通人群的感染率为34.52%-80.55%, 多数地区人群感染率在50%左右, 平均感染率为58.07%<sup>[2]</sup>。我国约有7亿人感染*H pylori*, 已经发展为严重危害我国居民健康的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。近年来, 国内众多学者对*H pylori*感染危险因素的研究十分关注。我们采用Meta分析方法对国内近20年来已发表的有关*H pylori*感染相关因素的流行病学文献进行综合定量分析, 探讨影响我国人群*H pylori*感染的主要相关因素, 并用危险比值比(OR)估计这些因素与感染的联系强度, 为预防*H pylori*感染提供科学依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 以“幽门螺杆菌”、“感染”、“相关因素”“流行病学”等为检索词, 检索CNKI中国期刊全文数据库及CBM光盘数据库, 并辅以文献追溯、手工检索等方法收集1990-01/2008-05国内正式刊物上公开发表的有关*H pylori*感染相关因素的研究文献, 并严格按照纳入与排除标准进行筛选。

### 1.2 方法

**1.2.1 文献纳入标准:** (1)国内公开发表的有关*H pylori*感染危险因素的研究文献; (2)*H pylori*感染至少经过1种诊断方法进行确诊; (3)文献的原始数据提供单因素分析的OR值及OR 95%CI或多因素分析提供回归系数 $\beta$ 及其标准误差SE( $\beta$ )值或Wald  $\chi^2$ 值或Z值可以换算成OR值及95%CI。 (4)有3篇及以上都研究了相同因素的文献。

**1.2.2 排除标准:** (1)只有摘要无全文的文献资料以及数据不完整无法利用的文献; (2)无对照组的文献以及综述性的文献; (3)重复发表的文献; (4)研究因素赋值方式相差较大的文献。

**1.2.3 数据整理及Meta分析方法:** 按Meta分析的要求对数据整理及换算<sup>[4]</sup>, 用Excel建立文献数据

## ■研究前沿

*H pylori*感染的预防需要科学研究的成果为依据, 但在多项危险因素与*H pylori*感染关系的流行病学研究中对研究因素与*H pylori*感染是否有关联及其关联强度报道不一。

## ■相关报道

Meta分析是近十年来在医学领域中采用的一种新的研究分析方法, 1976年由Glass首次提出, 随着循证医学的发展, 不再简单地局限为一种统计分析方法, 而是对具有相同研究目的的多个研究结果进行综合定量的一种系统评价。

信息的电子文档。对研究因素相同的各研究进行异质性检验(Q检验): 设纳入Meta分析的研究个数为 $k$ , 各个研究所对应的比值比为 $OR_i (i = 1, 2, \dots, k)$ , 令 $y_i = \ln(OR_i)$ ,  $Q = \sum [w_i(y_i - \bar{y})^2]$ , 其中 $\bar{y} = \sum w_i y_i / \sum w_i$ ,  $w_i = 1/V_i$ ,  $V_i$ 为各独立研究的方差, 可以通过以下方法计算<sup>[5]</sup>: (1) $V_i = [\ln(OR_i/OR_{H_i})/1.96]^2$ ; (2) $V_i = [\ln(OR_{ui}/OR_i)/1.96]^2$ ; (3) $V_i = [SE(\hat{\beta})]^2$ . 其中 $OR_{ui}$ 和 $OR_{H_i}$ 为各个研究所对应 $OR$ 值的95%CI的上下限,  $SE(\hat{\beta})$ 为多因素logistic回归分析的回归系数标准误。经异质性检验后如果无异质性则选择固定效应模型(fixed effect model, FEM)计算 $OR_{\text{合并}}$ 及其95%CI,  $OR_{\text{合并}} = \exp(\sum w_i y_i / \sum w_i)$ ,  $OR_{\text{合并}}$ 的95%CI =  $\exp(\sum w_i y_i / \sum w_i \pm 1.96/\sqrt{\sum w_i})$ ; 如果存在异质性则选择随机效应模型(Random Effect Model, REM)计算 $OR_{\text{合并}}$ 及其95%CI, 用 $w_i^* = (w_i^{-1} + D)^{-1}$ 代替上述 $OR_{\text{合并}}$ 及其95%CI计算公式中的 $w_i$ 即可, 其中 $D = (Q - k + 1) / (\sum w_i - \sum w_i^2 / \sum w_i)$ 。

1.2.4 敏感性分析: 从剔除未控制混杂因素的单因素分析研究及变换模型2个角度进行敏感性分析, 如果结论变化不大, 则提示本次研究的结果较为可靠。

1.2.5 发表性偏倚的评估: 采用失安全系数( $N_{fs}$ )定量评价发表性偏倚的影响程度。计算方法为<sup>[6-7]</sup>:  $N_{fs, 0.05} = (\sum Z / 1.64)^2 - k$ , 按 $P = 0.05$ 水平计算失安全系数, 式中 $k$ 为研究个数,  $Z$ 为各独立研究的 $Z$ 值。将原始文献中各个因素研究的单因素分析方法的 $\chi^2$ 值或多因素分析方法的Wald  $\chi^2$ 值开平方根, 得出失安全系数计算时所需的 $Z$ 值。如未提供 $\chi^2$ 值, 可通过 $OR$ 值及其95%CI的大小, 由公式 $V_i = [(\ln OR_i) / Z]^2$ 换算。若失安全系数较大, 则说明该meta分析结果受发表性偏倚的影响程度较小, 结论较为可靠; 如果 $N_{fs} < 10$ , 下结论要慎重。

## 2 结果

2.1 研究文献基本特征 根据上述文献资料的纳入和排除标准, 经筛选符合要求纳入本次Meta分析的文献有21篇<sup>[8-28]</sup>, 均为有关 $H. pylori$ 感染相关因素的流行病学研究。以各研究中涉及较多的因素作为Meta分析的因素, 包括来自宿主的因素(性别、本人胃病史)、行为习惯(吸烟、饮酒、饮用水源、饮水习惯、养狗、近期服用抗生素)、饮食习惯(进食生蔬菜、豆类、大蒜、腌制食物、熏制食物)、看护者胃病史及年幼时是否接受口嚼食物。入选文献研究因素及数据信息按提供 $OR$ 值及其95%CI或回归系数 $\hat{\beta}$ 及其标准误 $SE(\hat{\beta})$ 进行整理(表1-2)。

## 2.2 Meta分析结果

2.2.1 资料的异质性检验: 对研究因素相同的各研究的结果进行异质性检验, 除有关看护者胃病史、饮酒、经常食用大蒜、经常食用腌制食物4个因素的研究结果有一致性外, 其余各研究因素的研究结果间均存在异质性(表3)。

2.2.2  $H. pylori$ 相关因素的Meta分析结果: 根据异质性检验结果, 对各研究结果不具有异质性的因素采用固定效应模型进行合并分析; 对研究结果存在异质性的因素采用随机效应模型计算 $OR_{\text{合并}}$ 及其95%CI。结果显示除性别、饮酒、近期服用抗生素、经常食用生蔬菜与 $H. pylori$ 感染之间的关联无统计学意义, 其他研究因素与 $H. pylori$ 感染之间的关联均有统计学意义。其中经常食用豆类及其制品、大蒜的合并 $OR$ 值及95%CI小于1, 与 $H. pylori$ 感染成负关联; 饮用水源、本人胃病史、看护者胃病史、吸烟、饮用不洁水源、饮水习惯(喝生水)、接受过口嚼食物、养狗、经常食用腌制及熏制食物的合并 $OR$ 值及95%CI大于1, 与 $H. pylori$ 感染成正关联, 各因素与 $H. pylori$ 感染的关联程度由强到弱依次为: 饮水习惯(饮生水)、接受过口嚼食物、看护者胃病史、本人有胃病史、饮用不洁水源、经常食用腌制食物、熏制食物、吸烟, 详细结果见表4。

2.2.3 发表偏倚的评估: 当Meta分析的结果有统计学意义时, 为排除发表偏倚的可能, 采用失安全系数( $N_{fs}$ )来估计发表偏倚的程度, 计算最少需要多少未发表的研究(特别是阴性结果的研究)才能使研究结论发生逆转。表4中最后一栏显示了失安全系数的大小, 即要推翻本次Meta分析 $H. pylori$ 感染与相关因素有关联的结论需要未发表的阴性结果的文献数量, 除养狗(13篇)较少外, 其他因素如本人胃病史(295篇)、饮用不洁水源(76篇)、吸烟(47篇)、饮水习惯(152篇)、接受过口嚼食物(31篇)、经常食用豆类(126篇)、经常食用大蒜(20篇)、经常食用腌制食物(59篇)、经常食用熏制食物(45篇)。

2.3 敏感性分析 由于单因素分析没有考虑混杂因素的干扰, 有可能引入混杂偏倚, 影响其结果的真实性, 因此剔除个别统计方法为单因素分析的文献, 再次进行Meta分析, 以此判断Meta分析结果的稳定性及可靠性; 另外再从变换Meta分析模型角度进行敏感性分析, 结果见表5-6。在剔除单因素分析的研究之后, 除吸烟与饮酒两个因素的结论发生改变, 其余各研究因素在剔除单因素分析文献前后 $OR_{\text{合并}}$ 较为接近, 且95%CI大部分相互重叠, 各研究因素与 $H. pylori$ 感染成正关联或负

表 1 纳入的21篇研究文献中提供OR值及其95%CI数据的研究文献

作者	因素	OR值(95% CI)	$\chi^2$ 值或Z值	权重 $w_i$
陈胜良 <i>et al</i> <sup>[8]</sup>	性别(男)	0.877(0.798, 0.965)	7.16	431.11
韩咏梅 <i>et al</i> <sup>[9]</sup>	饮用不洁水源 <sup>m</sup>	5.216(2.487, 10.939)	4.37 <sup>n</sup>	7.01
	近期服用抗生素 <sup>m</sup>	0.376(0.226, 0.625)	3.77 <sup>n</sup>	14.85
许亮文 <i>et al</i> <sup>[10]</sup>	性别(男)	1.288(0.907, 1.830)	2.00	31.23
	饮酒	1.176(0.819, 1.693)	0.76	29.35
	腌制食物	1.670(1.160, 2.390)	7.79	28.93
	熏制食物	1.202(0.722, 2.002)	0.50	14.79
马红英 <i>et al</i> <sup>[11]</sup>	胃病史 <sup>m</sup>	1.470(1.320, 1.640)	6.90 <sup>n</sup>	331.62
	吸烟 <sup>m</sup>	1.910(1.250, 2.910)	3.01 <sup>n</sup>	21.37
	饮酒 <sup>m</sup>	1.390(1.020, 1.890)	1.22 <sup>n</sup>	40.10
杨万刚 <i>et al</i> <sup>[12]</sup>	喝生水 <sup>m</sup>	1.100(0.890, 1.370)	0.84 <sup>n</sup>	85.60
	近期服用抗生素 <sup>m</sup>	0.850(0.660, 1.070)	1.26 <sup>n</sup>	60.02
郭智成 <i>et al</i> <sup>[13]</sup>	经常吃豆类食物 <sup>m</sup>	0.718(0.580, 0.889)	9.21	84.32
李富欢 <i>et al</i> <sup>[14]</sup>	性别(男)	1.689(1.198, 2.387)	2.99 <sup>n</sup>	32.56
	烟	1.199(0.833, 1.724)	0.58	28.96
	酒	0.889(0.627, 1.262)	0.66	31.51
	熏腌制品 <sup>m</sup>	2.779(1.960, 3.940)	5.74 <sup>n</sup>	31.51
	经常吃豆类 <sup>m</sup>	0.294(0.206, 0.418)	6.78 <sup>n</sup>	30.36
张群勇 <i>et al</i> <sup>[15]</sup>	性别(男)	1.049(0.690, 1.596)	0.05	21.89
	经常吃豆制品 <sup>m</sup>	0.223(0.160, 0.310)	8.86 <sup>n</sup>	34.85
蔡亚平 <i>et al</i> <sup>[16]</sup>	饮水来源	1.897(1.306, 2.756)	3.36 <sup>n</sup>	27.57
	喜食凉拌菜	1.174(0.799, 1.727)	0.81 <sup>n</sup>	25.94
	吸烟	1.739(0.991, 3.052)	1.93 <sup>n</sup>	12.15
	饮酒	1.113(0.561, 2.207)	0.31 <sup>n</sup>	8.19
	喝生水	6.217(2.387, 16.193)	13.99	4.19
徐顺福 <i>et al</i> <sup>[17]</sup>	性别(男)	0.990(0.790, 1.230)	0.09 <sup>n</sup>	75.43
	胃病史	0.950(0.700, 1.280)	0.33 <sup>n</sup>	41.19
	饮酒	0.990(0.760, 1.300)	0.07 <sup>n</sup>	54.96
	吸烟	0.960(0.740, 1.230)	0.31 <sup>n</sup>	56.70
	养狗	1.070(0.760, 1.530)	0.37 <sup>n</sup>	32.83
刘一运 <i>et al</i> <sup>[18]</sup>	腌菜	1.982(1.300, 3.021)	10.04	21.60
	烟熏食物	1.583(1.032, 2.429)	4.45	20.99
	常吃生蒜 <sup>m</sup>	0.735(0.600, 0.901)	8.78	93.27
	吸烟	1.549(1.005, 2.388)	3.96	20.53
	饮用河沟水 <sup>m</sup>	1.397(1.193, 1.634)	17.36	154.17
	常饮生水 <sup>m</sup>	1.948(1.238, 3.064)	8.32	18.70
	常饮酒者 <sup>m</sup>	1.542(0.975, 2.438)	3.43	18.28
	胃病史 <sup>m</sup>	1.160(0.998, 1.350)	3.72	169.78
单庆文 <i>et al</i> <sup>[19]</sup>	养狗 <sup>m</sup>	1.660(0.990, 2.780)	3.74	14.38
林希 <i>et al</i> <sup>[20]</sup>	看护者胃病史	2.260(1.200, 4.240)	6.44	9.59
	口嚼食物	2.100(1.050, 4.210)	4.37	8.00
俞亚娣 <i>et al</i> <sup>[21]</sup>	性别(男)	1.438(0.884, 2.338)	2.15	16.23
	胃病史	4.295(1.253, 14.717)	5.38	2.53
	接收过口嚼食物 <sup>m</sup>	4.902(2.743, 8.759)	5.38 <sup>n</sup>	11.40
	看护人胃病史 <sup>m</sup>	2.021(1.218, 3.354)	2.72 <sup>n</sup>	14.98
吴斌 <i>et al</i> <sup>[22]</sup>	接收过口嚼食物 <sup>m</sup>	1.810(1.050, 3.140)	4.49	12.96
	看护者胃病史 <sup>m</sup>	3.520(1.860, 6.650)	14.98	11.89
王焰 <i>et al</i> <sup>[23]</sup>	熏肉 <sup>m</sup>	2.748(1.411, 5.352)	2.97 <sup>n</sup>	8.65

<sup>m</sup>: 多因素分析结果; <sup>n</sup>: Z值.

## ■创新盘点

近年来国内众多学者对*H pylori*感染危险因素的研究十分关注. 本研究采用Meta分析方法对国内近20年来已发表的有关*H pylori*感染相关因素的流行病学文献进行综合定量分析, 探讨目前影响我国人群*H pylori*感染的主要相关因素, 并估计其危险比值比(OR), 为*H pylori*感染的预防决策提供科学依据.

■名词解释

失安全系数(fail-safe number,  $N_{fs}$ ):指当Meta分析的结果有统计学意义时,为排除发表偏倚的可能,计算最少需要多少未发表的研究(特别是阴性结果的研究)才能使研究结论发生逆转,用来估计发表偏倚的程度.

表 2 纳入的21篇研究文献中提供、标准误或Wald  $\chi^2$ 值数据的研究文献 (多因素分析)

作者	因素	回归系数、标准误或Wald $\chi^2$ 值	OR值(95%CI)	$\chi^2$ 值或Z值	权重 $w_i$
张枚 <i>et al</i> <sup>[24]</sup>	性别(男)	-0.103, 0.162	1.109(0.807, 1.522)	0.64 <sup>n</sup>	38.02
	吸烟	0.033, 0.180	1.034(0.726, 1.471)	0.19 <sup>n</sup>	30.72
	饮酒	0.072, 0.058	1.074(0.959, 1.204)	1.22 <sup>n</sup>	299.51
	胃病史	0.162, 0.250	1.176(0.720, 1.919)	0.65 <sup>n</sup>	15.96
杨建 <i>et al</i> <sup>[25]</sup>	吃生蔬菜	2.4157, 0.4963	11.198(4.233, 29.620)	4.87 <sup>n</sup>	4.06
	胃病史	3.7881, 0.4094	44.173(19.80, 98.546)	9.25 <sup>n</sup>	5.97
	养狗	1.0238, 0.4343	2.784(1.188, 6.521)	2.36 <sup>n</sup>	5.30
陈世耀 <i>et al</i> <sup>[26]</sup>	性别(男)	0.207, 0.117	0.813(0.646, 1.022)	1.77 <sup>n</sup>	72.66
	进食生蔬菜水果	0.429, 0.235	1.535(0.969, 2.434)	1.82 <sup>n</sup>	18.15
	近期抗 <i>H. pylori</i> 治疗	0.731, 0.178	0.482(0.340, 0.683)	4.10 <sup>n</sup>	31.92
周曾芬 <i>et al</i> <sup>[27]</sup>	喝生水	2.0074, 0.1531	7.444(5.514, 10.049)	171.97	42.67
	饮用不洁水源	0.6426, 0.2240	1.901(1.226, 2.950)	8.23	19.94
	养狗	1.6969, 0.8256	5.457(1.082, 27.525)	4.22	1.47
	常吃大蒜	-0.6114, 0.3564	0.5426(0.975, 1.091)	2.944	11.18
卢平 <i>et al</i> <sup>[28]</sup>	腌菜	1.098, 4.810 <sup>m</sup>	2.998(1.124, 7.998)	4.81	3.99
	胃病史	0.796, 52.461 <sup>m</sup>	2.217(1.787, 2.750)	52.46	82.60
	大蒜	-0.637, 10.420 <sup>m</sup>	0.529(0.359, 0.779)	10.42	25.56
	吸烟	1.325, 15.479 <sup>m</sup>	3.762(1.944, 7.279)	15.48	8.81

<sup>m</sup>: Wald  $\chi^2$ 值; <sup>n</sup>: Z值.

表 3 不同相关因素各研究结果的异质性检验结果

因素	$n$	$\sum w_i$	$\sum w_i y_i$	$\bar{y}$	Q值	P值
性别(男)	8	719.13	-36.58	-0.05	21.93	<0.05
本人胃病史	7	649.65	247.68	0.38	104.33	<0.05
看护者胃病史	3	34.01	30.24	0.89	1.88	>0.05
吸烟	7	179.24	45.18	0.25	21.93	<0.05
饮酒	7	481.89	38.38	0.08	6.68	>0.05
饮用不洁水源	4	208.68	93.58	0.45	14.03	<0.05
饮水习惯(喝生水)	4	151.16	114.42	0.76	107.85	<0.05
接受过口嚼食物	3	32.36	31.70	0.98	6.67	<0.05
近期使用抗生素	3	106.40	-1.13	-0.01	31.84	<0.05
养狗	4	53.98	17.54	0.32	7.97	<0.05
经常食用生蔬菜	3	52.15	21.77	0.42	18.00	<0.05
经常食用豆类	3	149.46	-117.00	-0.78	40.78	<0.05
经常食用大蒜	3	130.01	-52.01	-0.40	2.72	>0.05
经常食用腌制食物	3	54.52	34.10	0.63	1.29	>0.05
经常食用熏制食物	4	75.94	53.20	0.70	9.27	<0.05

关联的结论未发生改变,表6中将使用随机效应模型分析的结果与换用固定效应模型进行Meta分析的结果进行比较,除经常使用生蔬菜2种模型分析结论不一致外,其余因素结论均较为一致,说明本次大多数因素的Meta分析结论较为可靠.

3 讨论

Meta分析是近十年来在医学领域中采用的一种

新的研究分析方法,1976年由Glass首次提出,随着循证医学的发展,不再简单地局限为一种统计分析方法,而是对具有相同研究目的的多个研究结果进行综合定量的一种系统评价<sup>[29]</sup>.该方法在考虑研究结果一致性的前提下,采用不同的模型对各研究结果进行统计合并,扩大了样本含量,增加了统计学检验功效,改进了对研究效应的估计,与单项研究相比,综合研究得出

表 4 *H. pylori*感染相关因素Meta分析结果及评估发表偏倚的量化指标计算结果

因素	<i>n</i>	D值	$\sum w_i^*$ 或 $\sum w_i$	$\sum w_i^* y_i$ 或 $\sum w_i y_i$	$OR_{合并}$ 及95%CI	<i>N<sub>s</sub></i>
性别(男)	8	0.03	151.39	9.10	1.07(0.91, 1.25)	—
本人胃病史	7	0.23	21.13	17.83	2.09(1.40, 3.12)	295
看护者胃病史	3	—	34.01	30.24	2.43(1.74, 3.40)	28
吸烟	7	0.11	44.12	16.87	1.47(1.09, 1.97)	47
饮酒	7	—	481.89	38.38	1.08(0.99, 1.18)	—
饮用不洁水源	4	0.12	23.99	16.75	2.01(1.35, 3.00)	76
饮水习惯(喝生水)	4	1.19	3.16	3.55	3.08(1.02, 9.26)	152
接受过口嚼食物	3	0.22	9.51	9.30	2.66(1.41, 5.02)	31
近期使用抗生素	3	0.49	6.46	4.30	1.95(0.90, 4.21)	—
养狗	4	0.17	13.12	7.32	1.75(1.02, 3.00)	13
经常食用生蔬菜	3	0.49	5.08	4.38	2.37(0.99, 5.64)	—
经常食用豆类	3	0.44	6.46	-6.51	0.37(0.17, 0.79)	126
经常食用大蒜	3	—	130.01	-52.01	0.67(0.56, 0.80)	20
经常食用腌制食物	3	—	54.52	34.10	1.87(1.43, 2.44)	59
经常食用熏制食物	4	0.14	19.88	13.21	1.94(1.25, 3.02)	45

## ■同行评价

本文统计资料宝贵, 样本大, 对诸多影响感染因素进行综合定量分析, 统计评价, 结论可靠, 具有很好的学术价值。

表 5 所有纳入文献、单因素分析、多因素分析文献Meta分析结果的比较

因素	未剔除单因素分析的文献		剔除单因素分析文献Meta分析		仅单因素分析文献Meta分析	
	<i>n</i>	$OR_{合并}$ (95%CI)	<i>n</i>	$OR_{合并}$ (95%CI)	<i>n</i>	$OR_{合并}$ (95%CI)
性别(男)	8	1.07(0.91, 1.25)	2	0.90(0.75, 1.09)	6	1.14(0.92, 1.43)
本人胃病史	7	2.09(1.40, 3.12)	5	2.34(1.47, 3.72)	2	1.79(0.42, 7.70)
看护者胃病史	3	2.43(1.74, 3.40)	2	2.50(1.68, 3.72)	1	2.26(1.20, 4.24)
吸烟	7	1.47(1.09, 1.97)	3	1.87(0.95, 3.68)	4	1.17(0.98, 1.40)
饮酒	7	1.08(0.99, 1.18)	3	1.12(1.01, 1.25)	4	0.97(0.81, 1.16)
饮用不洁水源	4	2.01(1.35, 3.00)	3	2.17(1.18, 3.97)	1	1.90(1.31, 2.76)
接受过口嚼食物	3	2.66(1.41, 5.02)	2	2.96(1.11, 7.90)	1	2.10(1.05, 4.21)
养狗	4	1.75(1.02, 3.00)	3	2.06(1.34, 3.15)	1	1.07(0.76, 1.53)
经常食用生蔬菜	3	2.37(0.99, 5.64)	2	3.96(0.56, 27.81)	1	1.17(0.80, 1.73)
经常食用熏制食物	4	1.94(1.25, 3.02)	2	2.77(2.03, 3.77)	2	1.14(1.02, 1.96)
经常食用腌制食物	3	1.82(1.51, 2.19)	1	3.00(1.12, 8.00)	2	1.80(1.36, 2.37)

的结论更全面更可靠。

*H. pylori*感染的预防需要科学研究的结果为依据, 但在多项危险因素与*H. pylori*感染关系的流行病学研究中对研究因素与*H. pylori*感染是否有关联及其关联强度报道不一。本研究采用Meta分析的方法综合定量评价*H. pylori*感染与相关因素间的联系及关联强度, 使分析的结果可靠, 更具有代表性。

在本次Meta分析研究涉及的包括来自宿主因素(性别、本人胃病史)、行为习惯(吸烟、饮酒、饮用水源、饮水习惯、养狗、近期服用抗生素)、饮食习惯(进食生蔬菜、豆类、大蒜、腌制食物、熏制食物)、家人或照顾者胃病史及年幼时是否接受口嚼食物15个研究因素中,

性别、饮酒、近期服用抗生素、进食生蔬菜与*H. pylori*感染无关联( $P>0.05$ ); 本人胃病史、看护者胃病史、饮用不洁水源、接受过口嚼食物、吸烟、饮水习惯(喝生水)、养狗、常食用腌制食物及熏制食物与幽门螺杆菌感染之间存在正关联( $P<0.05$ ), 饮水习惯与*H. pylori*感染的关联强度最高,  $OR$ 值为3.08, 95%CI为(1.02, 9.26), 说明喝生水是*H. pylori*感染的一个重要危险因素。其次, 接受过口嚼食物、看护者胃病史、本人有胃病史也是*H. pylori*感染重要的危险因素,  $OR$ 值及其95%CI分别为2.66(1.41, 5.02)、2.43(1.74, 3.40)和2.09(1.40, 3.12); 常使用豆制品和大蒜与*H. pylori*感染之间存在负关联( $P<0.05$ ), 其 $OR$ 值及95%CI分别为0.37(0.17, 0.79)和0.67(0.56,

表 6 相关因素采用不同模型进行Meta分析的结果

因素	随机效应	固定效应
	$OR_{\text{合并}}(95\%CI)$	$OR_{\text{合并}}(95\%CI)$
性别(男)	1.07(0.91,1.25)	0.95(0.88,1.02)
本人胃病史	2.09(1.40,3.12)	1.46(1.36,1.58)
吸烟	1.47(1.09,1.97)	1.29(1.11,1.49)
饮用不洁水源	2.01(1.35,3.00)	1.57(1.38,1.80)
饮水习惯(喝生水)	3.08(1.02,9.26)	2.13(1.83,2.50)
接受过口嚼食物	2.66(1.41,5.02)	2.66(1.89,3.76)
养狗	1.75(1.02,3.00)	1.38(1.06,1.81)
近期使用抗生素	1.95(0.90,4.21)	0.99(0.82,1.20)
经常食用生蔬菜	2.37(0.99,5.64)	1.52(1.16,1.99)
经常食用豆类	0.37(0.17,0.79)	0.46(0.39,0.54)
经常食用熏制食物	1.94(1.25,3.02)	2.01(1.61,2.52)

0.80), 是 *H. pylori* 感染的保护因素, 尤其是多食生蒜有利于降低 *H. pylori* 感染的危险性。

在纳入的21项研究中, 有些研究的统计分析方法采用的是单因素分析, 这难免会引入混杂因素的干扰。通过敏感性分析, 剔除未控制混杂因素的单因素分析的研究后, Meta分析结果仍显示性别、常食用生蔬菜与感染无关; 本人胃病史、看护者胃病史、饮用不洁水源、接受过口嚼食物、养狗、常食用熏制及腌制食物与 *H. pylori* 感染成正关联, 合并  $OR$  值及  $OR_{\text{合并}} 95\%CI$  均大于1, 且剔除单因素分析前后的  $OR$  值接近,  $OR_{\text{合并}} 95\%CI$  重叠, Meta分析结论不变, 仅有吸烟与饮酒两个因素的结论发生改变, 在本研究结果中同时也列出了仅为单因素分析的Meta分析结果, 同多因素分析的Meta分析结果相比, 除在看护者胃病史、饮酒、养狗3个因素上两者结论有差别外, 其他因素单因素与多因素分析结论较为一致, 表明可以将单因素和多因素数据综合在一起进行分析, 增大样本含量, 所得结论较为可靠。

Meta分析属观察性研究, 如果原始文献在设计、资料收集、统计分析过程中存在偏倚, 那经过Meta分析偏倚仍然存在。本次研究有11个相关因素的研究结果存在异质性, 可能是由于各个研究对于同一个因素的暴露水平分级标准并不是完全相同, 以及所研究的人群特征有所不同, 对 *H. pylori* 感染的判断标准的不同所致, 由于各因素的研究数目较少, 无法进一步做亚组分析, 无法分析产生异质性的原因。而且由于未收集未公开发表的学位论文和会议论文, 可能会存在发表偏倚, 但各研究因素评估发表偏倚的量化指标失安全系数较大, 分别为本人胃

病史(295篇)、饮用不洁水源(76篇)、吸烟(47篇)、饮水习惯(152篇)、接受过口嚼食物(31篇)、经常食用豆类(126篇)、经常食用大蒜(20篇)、经常食用腌制食物(59篇)、经常食用熏制食物(45篇), 说明发表偏倚的影响程度较小。仅养狗(13篇)的  $N_{\text{总}}$  值相对较小, 其原因可能是由于纳入分析的文献数量较少的缘故。

本次Meta分析研究严格按照文献的纳入和排除标准收集文献, 避免了重复发表偏倚。研究结果对预防 *H. pylori* 感染具有一定的参考价值, 个别因素由于相关研究较少, 纳入Meta分析的研究个数较少, 仍需进一步纳入更多更高质量的研究, 以进一步明确与 *H. pylori* 感染的关系。

#### 4 参考文献

- 胡伏莲. 幽门螺旋杆菌感染的流行病学. 中国医刊 2007; 42: 17-18
- 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺旋杆菌感染流行病学Meta分析. 中华流行病学杂志 2003; 24: 443-446
- Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. JAMA 2004; 291: 187-194
- 方积乾, 陆盈. 现代医学统计学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 165-166
- 王吉耀. 循证医学与临床实践. 第1版. 北京: 科学出版社, 2002: 100
- 麦劲壮, 李河, 方积乾, 刘小清, 饶栩栩. Meta分析中失安全系数的估计. 循证医学 2006; 6: 297-303
- 方积乾. 卫生统计学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 409
- 陈胜良, 萧树东, 刘文忠, 徐蔚文, 潘熾. 1990-2001年上海市区幽门螺杆菌血清流行病学比较. 胃肠病学 2002; 7: 146-148
- 韩咏梅, 季峰, 厉有名. 部分人群幽门螺杆菌感染流行病学调查. 浙江中西医结合杂志 2003; 13: 458-459
- 许亮文, 邹立人, 任国平. 生活习惯与幽门螺杆菌感染关系的研究. 中国行为医学科学 1997; 6: 55-57
- 马红英, 湛颖琦, 樊龙中, 包德强, 霍新菊, 王志刚, 郝磊. 船员产细胞毒性幽门螺杆菌感染流行病学调查. 中华航海医学杂志 2000; 7: 115-116
- 杨万刚, 李凯, 李学锋, 周明欢, 向平. 湖南湘西地区成人幽门螺杆菌感染流行病学多因素分析. 中华临床医学研究杂志 2005; 11: 3215-3216
- 郭智成, 厉有名, 许卓睿, 季峰, 王丽君, 陈坤. 胃病患者幽门螺杆菌感染危险因素的病例对照研究. 中华预防医学杂志 2002; 36: 187-190
- 李富欢, 陈韦冰, 陈钟鸣, 赵越, 高晓燕, 刘红生, 朱淑萍, 吴珍珠, 刘小萍. 吉安地区425例胃病患者幽门螺杆菌感染易感因素的研究. 中国慢性病预防与控制 2005; 13: 284-286
- 张群勇, 杨其法, 王海英, 唐爱奇. 慢性胃炎患者幽门螺杆菌感染危险因素的病例对照研究. 中国预防医学杂志 2006; 7: 430-432
- 蔡亚平, 刘劫, 阳学风, 奉水东, 赵英. 衡阳市人群幽门螺杆菌感染危险因素的病例对照研究. 中国全科医学 2001; 4: 721-723
- 徐顺福, 施瑞华, 张国新, 丁岩冰, 孙桂前, 张红杰, 陈晓星, 黄霞玥, 李学良, 严志刚, 苗毅. 江苏地区幽门

- 螺杆菌感染及其危险因素调查. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3363-3370
- 18 刘一运, 周曾芬, 南琼, 马岚青, 王健, 金利, 虎月燕, 张静祎, 李晓燕, 段丽平, 魏永敏, 斯国仁, 桂云建. 云南玉溪地区两彝族乡幽门螺杆菌感染的流行病学调查. 云南医药 2003; 24: 442-445
- 19 单庆文, 王琳琳, 梁淡涓, 姜海行, 谢湘芝, 陈亭平. 儿童幽门螺杆菌感染的相关因素研究. 中国学校卫生 2005; 26: 118-119
- 20 林希, 吴斌. 幽门螺杆菌粪便抗原与血清学抗体联合检测在儿童幽门螺杆菌感染流行病学调查中的应用. 实用儿科临床杂志 2004; 19: 948-950
- 21 俞亚娣, 刘淑梅, 朱国政, 陈青, 阮学东, 董传昌, 江米足. 胃炎患儿幽门螺杆菌感染危险因素的病例-病例对照研究. 中国实用儿科杂志 2007; 22: 697-700
- 22 吴斌, 许能锋, 赵子庆, 陈影, 吴丽瑟, 陈素清. 儿童幽门螺杆菌感染高危因素的病例对照研究. 中华预防医学杂志 2000; 34: 115
- 23 王焰, 周力, 谭玉洁, 马启龄, 马莉. 儿童幽门螺杆菌感染调查. 贵阳医学院学报 2004; 29: 407-409
- 24 张枚, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 张辉, 孙书春. 北京地区老年人群幽门螺杆菌感染的血清流行病学比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1978-1980
- 25 杨建, 杨杰, 白伟民, 王金如, 吴莺莺, 刘文莉, 孙志荣, 李彬. 新疆兵团农六师五家渠地区含CagA基因型幽门螺杆菌感染的流行病学调查. 农垦医学 2000; 22: 276-277
- 26 陈世耀, 刘天舒, 樊晓明, 董玲, 方国汀, 涂传涛, 顾秀英, 王吉耀. 上海地区幽门螺杆菌感染及其危险因素调查. 中华医学杂志 2005; 85: 802-806
- 27 周曾芬, 张永生, 王玉明, 罗家洪, 查学安, 崔蓉, 周崇斌. 云南云县彝族、汉族地区幽门螺杆菌感染的流行病学调查. 中华流行病学杂志 1997; 18: 18-21
- 28 卢平, 周力, 张永宏. 贵阳市老年人幽门螺杆菌感染及影响因素分析. 中国公共卫生 2007; 23: 268-269
- 29 Egger M, Smith GD. Meta-Analysis. Potentials and promise. BMJ 1997; 315: 1371-1374

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会, 广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

### 1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结.

### 2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话. 截稿日期: 2009-07/30

### 3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合. 入选论文并参会者给予记I类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志. 参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分.

### 4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿. 无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班.

### 5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授  
南昌大学第一附属医院消化内科

曹秀峰 主任医师  
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院消化内科

程爱国 教授  
华北煤炭医学院临床医学系

杜群 副研究员  
广州中医药大学脾胃研究所药理室

范小玲 主任医师  
北京地坛医院综合科

高润平 教授  
吉林大学第一医院肝病科

巩鹏 教授  
大连医科大学附属第一医院普外二科

关玉盘 教授  
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

洪天配 教授  
北京大学第三医院内分泌科

蓝宇 教授  
北京积水潭医院消化科

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

李增山 副教授  
中国人民解放军第四军医大学病理教研室

刘改芳 主任医师  
河北医科大学第三医院消化内科

刘杞 教授  
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

吕宾 教授  
浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

倪润洲 教授  
南通大学附属医院消化内科

潘秀珍 教授  
福建省立医院消化内科

钱睿哲 教授  
复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室

田晓峰 教授  
大连医科大学附属第二医院普通外科

汪思应 教授  
安徽医科大学实验动物中心

王炳元 教授  
中国医科大学附属第一医院消化内科

王小众 教授  
福建医科大学附属协和医院消化内科

魏经国 教授  
中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

吴建国 教授  
武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

吴泰璜 教授  
山东省立医院肝胆外科

熊斌 教授  
武汉大学中南医院肿瘤科

殷正丰 教授  
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

赵平 副教授  
中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

周士胜 教授  
南通大学附属医院消化内科