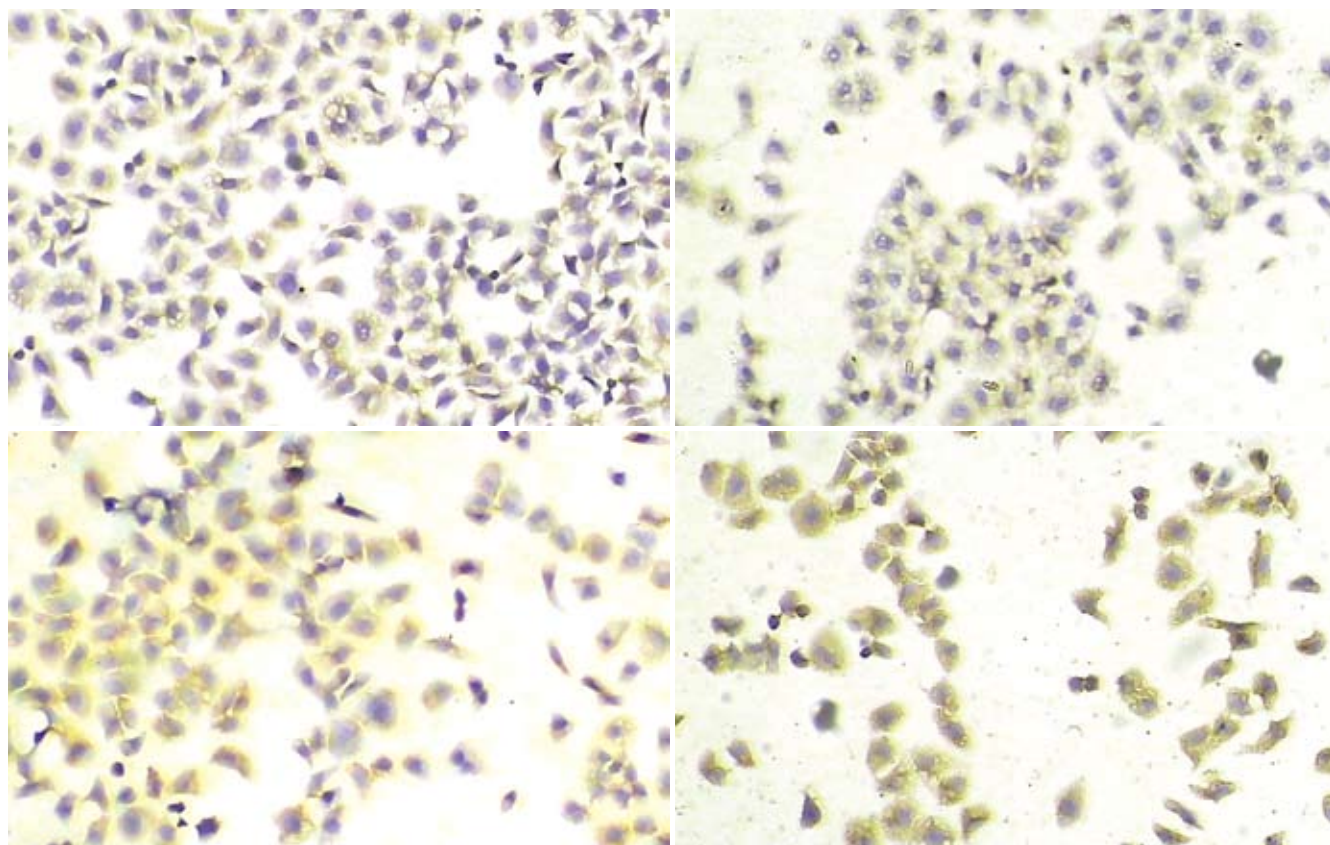


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 10 月 28 日 第 17 卷 第 30 期 (Volume 17 Number 30)



30 / 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
刘海峰主任医师
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
王承党副教授
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
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

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
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
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
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
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
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
李康副教授
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
李璠教授
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
黄园教授
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
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
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 10 月 28 日 第 17 卷 第 30 期 (总第290期)

述 评

3075 遗传性结直肠肿瘤研究进展

王石林, 顾国利

基 础 研 究

3086 $p15^{INK4B}$ 和 $p21^{WAF1}$ 基因联合转染对人食管鳞癌细胞系EC109的协同抑制作用

张学彦, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟, 刘铁夫, 刘冰熔

3092 Foxo3a对胃癌细胞SGC7901凋亡的促进作用

谭小平, 张庆, 朱燕妮, 何长华, 董卫国, 范文

3096 人源乳酸杆菌对幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞炎症反应的调节及可能通路

邓学杰, 马洪升, 余倩

3101 肝硬化时肝窦毛细血管瘤形成机制

杨照新, 韩德五, 邢桦云, 刘慧荣, 燕子

临 床 研 究

3109 内镜下单点注射组织胶治疗GEV1胃底静脉曲张

李坪, 毛羽, 李常青, 周安, 王捷, 李娜, 刘晶

3113 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3在肝癌组织中的表达及其临床病理学特征

董志珍, 姚登福, 张崇国, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 邱历伟

文 献 综 述

3118 炎症与非酒精性脂肪性肝病

谢伶俐, 周力, 李丽滨

3123 消化内镜诊疗相关性穿孔的内镜治疗现状

刘明

研 究 快 报

3128 靶向Pokemon基因shRNA重组质粒的构建及其对HepG2细胞生长的影响

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安

3134 白头翁醇提取物对大鼠结肠炎肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的保护作用

张文远, 姜伟炜

临 床 经 验

3140 幽门螺杆菌感染对老年人胃黏膜环氧化酶-2表达的影响及意义

王琳, 任美书, 王鸿博, 张蕴, 章明放

3144 RASSF1A基因启动子区甲基化在胃癌组织中的检测

刘培, 姜相君, 葛银林

3148 奥沙利铂、顺铂联合5-FU/LV治疗晚期胃癌的系统评价

王娜, 关泉林, 姜雷, 周欣, 高晨, 杨含腾

3155 胰腺实性-假乳头状瘤临床病理观察14例

易敏, 王嵘, 王建国, 周世英, 张淑坤, 刘红明

3160 不同胰肠吻合方式的临床效果比较

田夫, 向进见, 李明忠, 蒋雪峰, 邓清, 秦仁义

3164 嗜酸性粒细胞在溃疡性结肠炎患者中的临床及病理学意义

崔熠, 张洁, 李学锋, 陈琳琳, 赵鑫, 卢放根

	<p>3169 肠易激综合征患者肠黏膜SP、SPR和5-HT的变化 夏頔, 刘希双, 鞠辉</p> <p>3174 骨桥蛋白与缺氧诱导因子-1在大肠腺瘤及癌组织中的表达及意义 袁禧先, 马晓颖, 王凤荣, 王喆, 王晓, 王树鸿</p>
致 谢	3180 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3085 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729</p> <p>3108 <i>WJG</i>成功通过评审被PMC收录</p> <p>3117 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>3127 《世界华人消化杂志》被收录情况</p> <p>3133 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>3139 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p> <p>3143 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>3147 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>3154 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>3179 汤姆森-路透公布2008年<i>WJG</i>影响因子2.081</p>
封面故事	<p>邓学杰, 马洪升, 余倩. 人源乳酸杆菌对幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞炎症反应的调节及可能通路. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3096-3100 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3096.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李瑞敏; 审核编辑 李军亮 形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-10-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病防治中心</p>		<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2009年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>		<p>邮发代号 82-262</p> <p>国外代号 M 4481</p> <p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p>	<p>广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

October 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 30

EDITORIAL	3075 Advances in research on hereditary colorectal neoplasms <i>Wang SL, Gu GL</i>
BASIC RESEARCH	<p>3086 Cotransfection of the $p15^{\text{INK4B}}$ and $p21^{\text{WAF1}}$ genes synergistically inhibits proliferation and promotes apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109 <i>Zhang XY, Liu ZQ, Jing DH, Guan JM, Liu W, Liu TF, Liu BR</i></p> <p>3092 Apoptosis-promoting effects of forkhead box O3a in human gastric cancer SGC7901 cells <i>Tan XP, Zhang Q, Zhu YN, He CH, Dong WG, Fan W</i></p> <p>3096 Human-derived <i>Lactobacillus Lac15</i> inhibits <i>Helicobacter pylori</i>-induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and interleukin-8 secretion in human gastric cancer SGC7901 cells <i>Deng XJ, Ma HS, Yu Q</i></p> <p>3101 Pathogenesis of hepatic sinusoidal capillarization in hepatic cirrhosis <i>Yang ZX, Han DW, Xing HY, Liu HR, Yan Z</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3109 Single-site injection of tissue adhesive under endoscopic guidance for treatment of Type 1 gastric varices <i>Li P, Mao Y, Li CQ, Zhou A, Wang J, Li N, Liu J</i></p> <p>3113 Glypican-3 expression and its correlation with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma <i>Dong ZZ, Yao DF, Zhang CG, Qian J, Li SS, Bian YZ, Qiu LW</i></p>
REVIEW	<p>3118 Inflammation and nonalcoholic fatty liver disease <i>Xie LL, Zhou L, Li LB</i></p> <p>3123 Recent advances in endoscopic therapy for diagnostic and therapeutic endoscopy-associated perforations of the digestive tract <i>Liu M</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3128 Short hairpin RNA-mediated downregulation of the Pokemon gene suppresses proliferation and promotes apoptosis in HepG2 cells <i>Wang B, Zhang QL, Yan W, Xia LM, Liu M, Tian DA</i></p> <p>3134 Protective effects of radix pulsatillae alcohol extract on intestinal epithelial tight junctions in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis <i>Zhang WY, Jiang WW</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3140 Effects of <i>Helicobacter pylori</i> infection on cyclooxygenase-2 expression in gastric mucosal epithelium of elderly population <i>Wang L, Ren MS, Wang HB, Zhang Y, Zhang MF</i></p> <p>3144 Detection of RASSF1A promoter methylation in gastric cancer <i>Liu P, Jiang XJ, Ge YL</i></p> <p>3148 Cisplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin versus oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a systematic review <i>Wang N, Guan QL, Jiang L, Zhou X, Gao C, Yang HT</i></p>

	<p>3155 Clinicopathological features of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: an analysis of 14 cases <i>Yi M, Wang R, Wang JG, Zhou SY, Zhang SK, Liu HM</i></p> <p>3160 Comparison of the efficacy of different methods of pancreaticojejunostomy <i>Tian F, Xiang JJ, Li MZ, Jiang XF, Deng Q, Qin RY</i></p> <p>3164 Clinicopathological significance of eosinophil granulocyte infiltration in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis <i>Cui Y, Zhang J, Li XF, Chen LL, Zhao X, Lu FG</i></p> <p>3169 Changes in substance P, substance P receptor and 5-hydroxytryptamine expression in the ileocecal mucosa in patients with irritable bowel syndrome <i>Xia D, Liu XS, Ju H</i></p> <p>3174 Significance of osteopontin and hypoxia-inducible factor-α expression in colorectal carcinoma and adenoma <i>Yuan XX, Ma XY, Wang FR, Wang Z, Wang X, Wang SH</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3180 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Deng XJ, Ma HS, Yu Q.</i> Human-derived <i>Lactobacillus Lac15</i> inhibits <i>Helicobacter pylori</i>-induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and interleukin-8 secretion in human gastric cancer SGC7901 cells.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(30): 3096-3100 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3096.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Rui-Min Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i></p> <p>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 October 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: wjgd@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: wjgd@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. If you do not have web access please contact the editorial office.

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

遗传性结直肠肿瘤研究进展

王石林, 顾国利

王石林, 顾国利, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100142

王石林, 主任医师, 主要从事遗传性胃肠道肿瘤的临床和基础研究。

作者贡献分布: 本文由王石林与顾国利共同综述完成, 王石林审核。

通讯作者: 王石林, 主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院普通外科. wangshilin@medmail.com.cn

电话: 010-66928302

收稿日期: 2009-10-01 修回日期: 2009-10-26

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-10-28

Advances in research on hereditary colorectal neoplasms

Shi-Lin Wang, Guo-Li Gu

Shi-Lin Wang, Guo-Li Gu, Department of General Surgery, the General Hospital of the Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, the General Hospital of the Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142, China. wangshilin@medmail.com.cn

Received: 2009-10-01 Revised: 2009-10-26

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-10-28

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common digestive malignant tumors in China. Its incidence and mortality rates rank top among all malignant tumors. Previous studies show that nearly one-third of colorectal cancers are associated with hereditary colorectal tumors. Hereditary colorectal tumors are mainly divided into two categories: hereditary nonpolyposis colorectal cancer and hereditary colorectal polyposis. In this article, we will review the recent advances in research on hereditary colorectal neoplasms.

Key Words: Colorectal neoplasm; Hereditary disease; Advance

Wang SL, Gu GL. Advances in research on hereditary colorectal neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3075-3085

摘要

结直肠癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之

一, 其发病率和死亡率都居全部恶性肿瘤的前列。约有1/3的结直肠癌是由遗传性结直肠肿瘤引起。遗传性结直肠肿瘤包括遗传性非息肉病性结直肠癌和遗传性结肠息肉病两大类。本文简要总结了近年来国内外学者在遗传性结直肠肿瘤的研究中所取得的共识与进展, 并就其临床诊治进行讨论和展望, 以期加深人们对他的认识, 提高医务人员对上述疾病的临床诊治能力。

关键词: 结直肠肿瘤; 遗传性疾病; 进展

王石林, 顾国利. 遗传性结直肠肿瘤研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3075-3085

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3075.asp>

0 引言

结直肠癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率都居全部恶性肿瘤的前列, 且呈逐年上升的趋势^[1]。研究显示^[2], 约有1/3的结直肠癌是由遗传性结直肠肿瘤引起。遗传性结直肠肿瘤包括遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)和遗传性结肠息肉病(hereditary colorectal polyposis)两大类^[3]。后者又可分为腺瘤性息肉病综合征和错构瘤息肉病综合征两类, 包括家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)及其亚型、遗传性色素沉着-消化系息肉病综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)、家族性幼年性结肠息肉病(familial juvenile polyposis coli, FJPC)、PTEN错构瘤肿瘤综合征(PTEN hamartoma tumor syndrome, PHTS)、遗传性混合息肉病综合征(hereditary mixed polyposis syndrome, HMPS)等一系列疾病。由于遗传病因特殊、临床病理特点突出, 遗传性结直肠肿瘤是目前临床肿瘤学研究的热点^[4]。本文简要总结了近年来国内外学者在遗传性结直肠肿瘤研究中所取得的共识与进展, 并就其临床诊治进行展望。

1 HNPCC

HNPCC又称Lynch综合征, 是一种由错配修复基

■背景资料

遗传性结直肠肿瘤的种类繁多、遗传病因特殊、临床病理特点突出, 他是目前临床肿瘤学研究的热点。

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

■相关报道

目前针对EGFR、HER-2、VEGF及其受体的靶向抑制剂已经开始应用于结肠直肠癌的临床治疗,但关于他们在上述遗传性结肠直肠癌中的作用的研究很少。

因(mismatch repair gene, MMR)种系突变而引起的常染色体显性遗传病^[4]。HNPCC是遗传性结肠直肠癌的重要代表,约占全部大肠癌的5%-15%;也是被研究比较深入透彻的遗传性肿瘤。

1.1 遗传学基础 目前已证实,MMR的种系突变以及由突变而引起的微卫星序列不稳定(microsatellite instability, MSI)是HNPCC发生的遗传学基础^[5]。每个MMR基因(包括hMLH1、hMSH2、hPMS1、hPMS2、hMSH3和hMSH6等)都编码一个参与DNA错配修复的蛋白质。这些蛋白质组成一种杂聚多酶复合体系;通过识别、黏合、剪切、复制等功能纠正DNA复制的错误。HNPCC患者遗传性获得胚系突变的MMR基因,一旦其靶器官(大肠、子宫内膜、小肠、肾盂输尿管等)的黏膜上皮中另一条正常的等位基因发生体细胞突变或缺失,则使该基因失活,相应的编码蛋白的缺失将影响DNA错配修复功能,从而使细胞具有恶变的可能性。当MMR基因发生突变和功能缺陷时,DNA复制错误的增加将使基因组DNA的微卫星序列发生延长或缩短,从而出现明显的重复次数变化的不稳定性-即MSI。根据MSI表达的不同,大肠癌可分为微卫星高度不稳定(MSI-H)、微卫星低度不稳定(MSI-L)及微卫星稳定(MSS)3类。如选取贝斯塔遗传标记(bethesda markers): BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346和D17S250这5个位点作为标志,若有2个以上位点表现为MSI(+)即为MSI-H,若1个位点表现为MSI(+)则为MSI-L。如在以上5个位点基础上再选取BAT-40、BAT-34ca、TGF β R II、ACTC等作为检测位点,则大于30%-40%的标志物阳性为MSI-H,小于30%的标志物阳性为MSI-L,没有标志物阳性则为MSS。

1.2 临床病理特点 HNPCC的临床病理特点非常突出。这也是其被人们认识和深入研究的主要原因。目前国内外对于HNPCC的临床病理特征形成以下共识^[3-7]: (1)发病年龄早,中位年龄约44岁,较散发性大肠癌提前约20年; (2)肿瘤多位于近段结肠,约70%位于脾曲近侧; (3)同时或异时性多原发大肠癌明显增多,结肠不全切除后10年内约40%再发; (4)结直肠外恶性肿瘤发生率高,包括子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、小肠癌、肾盂输尿管癌等一系列相关肿瘤; (5)大肠癌具有特殊的病理特点:低分化腺癌和黏液腺癌常见;低分化腺癌常有一个清晰的边界,且伴有大量的淋巴细胞浸润或类似Crohn's反应的淋巴样细胞的聚集;肿瘤多呈膨胀性生长,而不是

浸润性生长; 90%的大肠癌细胞呈双倍体或近双倍体等; (6)呈现家族聚集和垂直遗传的常染色体显性遗传特征; (7)预后较好。HNPCC的上述临床病理特点可能与一些细胞信号通路参与其肿瘤的形成和发展过程有关^[8-10]。

1.3 临床诊治现状

1.3.1 临床诊断标准: 随着人们对HNPCC临床病理特点的认识逐步深入, HNPCC的临床诊断标准也在不断修正^[4,11]。目前国际上公认的是由HNPCC国际合作组织(HNPCC-ICG)于1998年制定的Amsterdam标准II^[4,11]: (1)亲属中3例以上患有组织学证实的HNPCC相关肿瘤(包括大肠癌、子宫内膜癌、小肠癌、肾盂输尿管癌),其中1例为另2例的一级亲属; (2)肿瘤累及连续的2代人; (3)其中至少1例发病年龄小于50岁。该标准肯定了大肠外恶性肿瘤在HNPCC中的诊断价值,但因欧美国家HNPCC家族成员发生胃癌和肝癌的危险度不高,故未将这两种肿瘤列入其中。然而在亚洲(特别是东亚地区), HNPCC患者中胃癌和肝癌的发病率较高^[12],而子宫内膜癌和小肠癌的发病率比较低。因此Amsterdam标准II可能更适合于欧美国家。

2003年全国遗传性大肠癌协作组在杭州会议上制定了中国人HNPCC家系筛检标准^[13]: 家系中至少有2例组织病理学明确诊断的大肠癌患者,其中的2例为父母与子女或同胞兄弟姐妹的关系,并且符合以下1条: (1)至少1例为多发性大肠癌患者(包括腺瘤); (2)至少1例大肠癌发病早于50岁; (3)家系中至少1人患HNPCC相关肠外恶性肿瘤(包括胃癌、子宫内膜癌、小肠癌、输尿管或肾盂癌、卵巢癌、肝胆系统癌)。同时,还制定了实验室筛检策略: HNPCC可疑家系均应进行hMLH1、hMSH2免疫组织化学和MSI检测。两项均阴性者无需进行突变检测分析; 两项之一阳性者,则需进行hMLH1和hMSH2基因种系突变检测分析。MSI的检测位点依国际统一要求采用贝斯塔遗传标记(bethesda markers): BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346和D17S250。免疫组织化学统一用Oncogene公司(hMSH2)和PharMingen公司(hMLH1, clone G618215)试剂盒。同时指出突变的初步筛查可采用PCR-SSCP或DHPLC的方法,或直接进行DNA序列测定。

中国人HNPCC家系筛检标准吸取了以前标准的优点,其临床诊断标准涵盖范围较广,同时也兼顾了小家系和我国肿瘤谱的特点,比较符合

临床需要. 同时, 其实验室筛检策略也将近年来对HNPCC的分子生物学的研究应用于临床诊断, 使HNPCC的诊断更具有科学性和实用价值^[4].

1.3.2 临床治疗现状: 手术治疗仍是目前临床治疗HNPCC的主要方式. 但分子靶向治疗将为HNPCC的治疗开辟新的途径. 目前, 临床上对于HNPCC的手术治疗方式仍有争论. 一部分学者认为^[14]: 由于HNPCC患者同时性和异时性多原发大肠癌的发生率较高, 如结肠切除不完全, 约有40%的患者会在10年内肿瘤再发. 因此, HNPCC患者在首次确诊时就应施行全结肠或次全结肠切除术. 这样可以避免或减少异时多原发结直肠癌的风险, 并且避免了HNPCC患者终生对残留结肠进行结肠镜检查以及漏诊的风险. 具体而言, 如癌灶位于结肠, 应行预防性全结肠切除+回肠直肠吻合, 术后终生对直肠行肿瘤筛检; 如癌灶位于直肠, 则行全结直肠切除+回肠肛管吻合. 然而, 另有一部分学者认为^[15], HNPCC肿瘤谱广泛, 即使切除了全部结直肠, 其他器官也可能患HNPCC相关肿瘤. 另外, HNPCC患者预后较好, 即使发生异时性多原发结直肠癌, 再次手术切除也能取得良好的预后, 如果能够进行密切的结肠镜随访, 及时对所发现早期癌或腺瘤进行处理, 也是一种治疗的选择. 因此, 对于初发结直肠癌的HNPCC患者应综合考虑其临床分期、预后、随访条件及个人意愿, 向患者提出预防性手术的建议供选择, 在患者知情同意的前提下才考虑行预防性手术切除治疗.

目前, NCCN指南对HNPCC初发大肠癌仅是建议考虑行全结肠或次全结肠切除术. 但就我们自身十余年来的临床经验而言, 我们更倾向于上述后一部分学者的意见. 理由: (1)国内家庭规模小型化使遗传传递规律变得不显著. 对于初次接触先证者, 临床医生如不重视家系调查和随访的话, 可能根本无法确诊其为HNPCC病例; (2)MMR和MSI的相关检测尚未在临床普及, 且其检测结果的稳定性、可靠性、权威性, 以及公众乃至学者对其在临床上应用的接受、认可的程度目前都尚未达成一致; (3)医学伦理学和基因歧视问题; (4)即使切除了所有大肠, 患者仍可患肠外肿瘤; (5)手术创伤大、并发症多、效果不确切, 术后患者生活质量严重下降, 医疗纠纷多.

2 FAP

临床上腺瘤性息肉综合征主要见于FAP. FAP的

发病率为1/22 000-1/7000. 依据遗传病因和临床表型的不同^[16], FAP又可分为经典型家族性腺瘤性息肉病(classical FAP, CFAP)、轻表型家族性腺瘤性息肉病(attenuated FAP, AFAP)、MYH相关性息肉病(MYH-associated polyposis, MAP)、Gardner综合征(Gardner syndrome, GS)、Turcot综合征(Turcot syndrome, TS)等亚型.

2.1 经典型家族性腺瘤性息肉病

2.1.1 遗传学基础: 目前已证实, CFAP是由APC(adenomatous polyposis coli)基因突变引起的常染色体显性遗传病^[16]. APC基因被定位于5q21-22, 包括15个转录外显子, 编码一个参与Wnt/ β -catenin细胞信号通路的APC蛋白. 研究发现: FAP中APC突变的位点众多且复杂. 已知的突变位点超过1400个, 且绝大多数是形成链终止密码子的移码突变^[17]. 从而形成一种无羧基的截断蛋白产物. 这种APC的功能性缺失将导致 β -连环素在细胞质内的异常积聚, 并与结构转录因子TCF家族蛋白结合后进入细胞核, 从而启动和调节Wnt/ β -catenin细胞信号通路的一系列下游靶基因(包括c-Myc、Cyclin D1、MMP-7和ITF-2)的表达^[9-10]. 研究发现: FAP的临床表型与APC基因的突变位点相关^[17], CFAP多见于密码子169-1393之间的突变. 其中密码子1255-1467间的突变结直肠息肉的表型最严重, 而密码子463-1578间的突变常伴发视网膜病变, 密码子1445-1578间的突变与伴发硬纤维瘤、骨瘤、表皮囊肿有关, 密码子279-1309间的突变十二指肠息肉发生率明显升高. 但也有基因型相同而临床表型存在显著差异的现象^[18].

2.1.2 临床病理特点: 2003年全国遗传性大肠癌协作组制定的FAP诊断标准为^[13]: (1)大肠内弥漫腺瘤性息肉, 100颗以上; (2)腺瘤性息肉不足100颗, 伴有家族史或先天性视网膜色素上皮肥厚; (3)被诊为FAP者应进行APC基因的突变检测. CFAP的临床病理特点非常突出^[16-19]: (1)息肉数目多(>100个, 甚至可多达5000个), 多分布于左半结肠(尤以乙状结肠和直肠最多), 其次为右半结肠, 再次为横结肠; (2)息肉发生年龄早(平均15岁)、恶变年龄早(平均39岁)、恶变率高(几乎100%), 且多灶性恶变、转移早、预后差. 如不治疗, 多在45岁之前死于大肠癌; (3)息肉以管状腺瘤、绒毛状腺瘤和管状绒毛腺瘤多见. 直径一般<1 cm, 多数是宽基底, >2 cm者通常有蒂; (4)可伴发结肠外表现(如: 胃息肉、十二指肠息肉、硬纤维瘤、先天性视网膜色素上皮增生等).

■创新盘点

本文系统总结了遗传性结直肠肿瘤的遗传学基础、临床病理特点和诊治现状, 并就其临床诊治进行展望, 提出了遗传性结直肠肿瘤的分子靶向治疗方向.

■名词解释

遗传性色素沉着-消化系息肉病综合征(PJS):又称黑斑息肉病,是一种由LKB1/STK11基因突变引起的常染色体显性遗传病。临床较少见,发病率约为1/25 000,以皮肤黏膜色素斑、胃肠道错构瘤息肉和家族遗传性为3大临床特征。PJS是错构瘤息肉病综合征的主要代表。

2.2 轻表型家族性腺瘤性息肉病

2.2.1 遗传学基础: AFAP也是一种由APC基因突变而引起的常染色体显性遗传病。只是由于突变位点的不同, AFAP显示出与CFAP明显不同的临床表现。研究发现^[20], AFAP相关的APC突变主要位于3个基因区: 5'端(5个外显子中的第一个)、9号外显子和3'远端。但关于AFAP患者及其APC基因突变定位的报道多是基于小样本或几个家系的基础研究, 尚未完全确定引起AFAP或与AFAP相似表型的基因突变谱问题^[21]。

2.2.2 临床病理特点: 与CFAP相比, AFAP具有其独特的临床病理表现^[20-22]。(1)息肉数目少(通常为10-100枚), 且呈右半结肠分布趋势;(2)息肉发生晚(平均34岁)、恶变晚(平均57岁)、恶变率稍低(60%), 如不治疗, 死于大肠癌时间晚(平均59岁);(3)息肉多呈扁平状。除CFAP常见病理类型外, AFAP还可表现为一种特殊形式-锯齿状腺瘤;(4)常伴胃及十二指肠腺瘤(50%-66%), 伴发硬纤维瘤较少(约为10%), 其余结肠外特征报道偶见, 尚未见到伴发先天性视网膜色素上皮增生的报道。

2.2.3 临床诊断标准: 目前, 临床尚无国际通用的AFAP诊断标准。较有影响力的是Nielsen *et al*提出AFAP的临床诊断标准^[23]: 至少2例患者结直肠腺瘤数目为10-99枚, 诊断年龄>30岁或者至少1例患者结直肠腺瘤数为10-99枚, 诊断年龄>30岁并且其一级亲属有伴发少量腺瘤的结直肠癌, 家族成员中没有1例30岁之前腺瘤总数超过100枚者。

确诊AFAP需要依据临床表现结合基因测序。但是, AFAP患者APC突变的检出率只有30%, 且基因测序耗资巨大、费时费力, 这都易导致AFAP在临床工作中的漏诊。

2.3 MYH相关性息肉病

2.3.1 遗传学基础: MYH相关性息肉病(MAP)是一种由MYH基因突变而引起的常染色体隐性遗传病^[24]。MYH被定位于1p34.3-p32.1, 共有16个外显子, 编码一个由535个氨基酸组成的基因产物。MYH蛋白是一种参与碱基切除修复(base excision repair, BER)的转葡萄糖基酶。可修复DNA复制中错误掺入的腺嘌呤, 防止G:C到T:A突变。研究发现^[24-25], MYH在不同人种的MAP中具有不同类型的突变(无义、错义、框移和剪切位点的突变, 或产生截短蛋白)。

2.3.2 临床病理特点: 与CFAP相比, MAP有其特殊的临床病理特点^[25-27]。(1)息肉数目少(一般

<100个), 左半结肠多发(尤以直肠为重), 其次为右半结肠;(2)息肉发生晚、恶变晚(平均46岁)、恶变率高(到65岁时几乎100%);(3)可伴有结肠外表现(如: 胃底十二指肠息肉、先天性视网膜色素上皮肥大、乳腺癌、胃癌、骨肉瘤、甲状腺癌等), 但较少见。

2.3.3 临床诊断标准: 目前尚无国际通用的MAP临床诊断标准。由于MAP的临床表现与AFAP非常相似, 因此, 其确诊主要依赖于基因检测。临床上对于无显性遗传家族史, 但息肉数目多于10个, 或具有一些相关肠外表现的患者, 即应考虑MAP; 对MYH基因突变位点比较明确的种族可进行常见突变位点的检测, 如果发现一个突变位点, 则应进行MYH全基因测序。因为MAP为常染色体隐性遗传, 患者同胞有1/4的患病风险, 所以对其亲属(尤其是一级亲属)应进行预防性基因检测。

2.4 GS GS是一种少见的常染色体显性遗传病, 其特征为结直肠息肉病合并多发性骨瘤和软组织肿瘤。

2.4.1 遗传学基础: 虽然目前仍有争议, 但绝大多数学者^[28-30]认为GS是FAP的一个特殊的临床亚型; 其遗传学基础仍是APC基因的突变(多为密码子1403和1578的截短突变)。

2.4.2 临床病理特点: GS的临床病理特点比较突出^[28-31], 表现为: (1)结直肠息肉数量多(>100个), 分布广泛;(2)胃和十二指肠息肉多见, 但小肠息肉少见;(3)息肉生长多年后在青壮年发病, 且恶变率高;(4)骨瘤合并牙齿畸形和软组织肿瘤(皮脂腺囊肿、硬纤维瘤、脂肪瘤等)为其合并症, 并可伴随其他瘤变(如甲状腺瘤、肾上腺瘤及肾上腺癌等)。

2.4.3 临床诊断: 具备结直肠多发息肉、骨瘤和软组织肿瘤这3大特征者即可确诊GS。但临床上尚有一些不典型患者, 可仅表现出结直肠息肉病而无肠外病变, 或仅有肠外病变而无结直肠息肉病。GS的肠外病变通常多为潜性存在, 需针对性地仔细诊察才能发现。另外, 如不重视家族史的调查也易造成漏诊。

2.5 TS TS又称胶质瘤息肉病综合征(glioma-polyposis syndrome, GPS)是一种临床罕见的FAP临床亚型^[32]。其特征为家族性多发性结肠腺瘤伴有中枢神经系统恶性肿瘤。

2.5.1 遗传学基础: 以往都把TS的遗传学基础完全归于APC基因的突变^[29,32], 但近来研究发现^[32-35]: MMR(已报道的有hMLH1、hPMS2、

hMSH6和hMSH2)也在TS中扮演着非常重要的角色. 甚至有学者^[32]开始建议将TS也划归HNPCC的范畴.

2.5.2 临床病理特点: TS的临床病理特点也比较突出^[32-35], 包括: (1)发病率低, 临床上非常罕见; (2)发病早(平均17岁), 预后不良(多在发病数年内死于脑肿瘤); (3)结肠腺瘤性息肉数目多(100个左右), 体积较大, 全结肠分布, 癌变率高且年龄较轻(20岁以前); (4)神经胶质瘤多发于大脑半球, 少数发于小脑、脑干部及脊髓. 其病理组织形态多种多样, 如: 成胶质细胞瘤(glioblastoma)、成神经管细胞瘤(medulloblastoma)、星形细胞瘤(astrocytoma)、多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme)等; (5)可有结肠外伴随病变, 如: 胃十二指肠及小肠肿瘤、脂肪瘤、甲状腺癌、卵巢囊肿等, 皮肤多见咖啡牛乳色斑及其他皮肤异常.

2.6 FAP结直肠息肉的临床治疗现状 上述各种FAP临床亚型的共同特征就是结直肠腺瘤性息肉, 由于其恶变率高. 因此, 目前临床上对于FAP的结直肠息肉仍主要采取外科手术治疗. 随着内窥镜技术的发展和内镜的广泛应用, 各种内镜下治疗成为FAP重要的临床治疗手段. 近来, 分子靶向治疗也成为FAP的辅助治疗手段.

FAP的手术方式大致有3类^[36-37]: (1)全结肠直肠切除+永久性回肠造口术: 适用于全结肠和直肠广泛息肉病, 并有结肠癌和距肛门6 cm内的直肠癌病例. 该术式并发症多、生活质量差, 除直肠中远段发生癌变或括约肌无功能外, 现已很少应用. 实际在临床上仅适用于已有直肠癌形成的患者; (2)全结肠直肠切除+回肠贮袋成形+直肠鞘内肛管吻合术: 适用于结肠和直肠内无癌变、括约肌完好的50岁以下的病例. 该手术盆腔感染率高, 功能常不理想; (3)结肠全切除+直肠黏膜剥除+回肠贮袋肛管吻合术(IPAA): 为较理想的术式, 因为切除全部大肠黏膜, 彻底消除腺瘤再发与癌变的可能性, 又不作永久性回肠造口, 所以成为近年来应用最普遍且发展较快的手术. 但手术复杂, 并发症较多.

3 错构瘤息肉病综合征

1904年Albrecht首次使用错构瘤(hamartoma)这一术语, 意指在发育中出现错误而形成的肿瘤^[38]. 此种息肉可以是以异常和紊乱方式排列的正常组织, 也可以是一种或几种组织的非肿瘤性、局限性的肿瘤样增生. 既往曾认为错构瘤

极少恶变, 但现在研究发现^[39]: 错构瘤的恶变比率较高. 临床常见的遗传性错构瘤息肉病综合征虽少见, 但种类繁多、临床病理特点突出.

3.1 PJS PJS又称黑斑息肉病, 是一种由LKB1/STK11基因突变引起的常染色体显性遗传病. 临床较少见, 发病率约为1/25 000, 以皮肤黏膜色素斑、胃肠道错构瘤息肉和家族遗传性为3大临床特征^[40-41]. PJS是错构瘤息肉病综合征的主要代表.

3.1.1 遗传学基础: 研究证实^[40-42]: PJS的遗传学基础是LKB1/STK11基因突变. LKB1/STK11被定位于19p13.3, 基因全长为2158 bp, 编码区长约1302 bp, 由9个外显子组成; 编码一种丝氨酸/苏氨酸激酶LKB1/STK11. 目前已发现^[42-43]的LKB1/STK11突变类型繁多, 有: 无义突变、错义突变、大小片段缺失、移码突变、剪接位点突变和碱基插入等. 几乎所有的突变都能引起LKB1/STK11基因异常剪接的位点突变, 造成mRNA剪接异常, 出现错误的翻译信息; 使STK11蛋白激酶功能发生异常. 无义突变和移码突变使蛋白翻译的终止信号提前出现, 产生截断蛋白导致STK11蛋白激酶失活. 但并非所有PJS患者都有LKB1/STK11基因的突变, LKB1/STK11基因的胚系突变仅可在60%家族性和50%散发性PJS患者中检测出^[44-45]. 因此, 有学者认为^[44-45]: LKB1/STK11基因突变位点和形式的多样性不仅与遗传背景有关, 也可能与PJS患者生存的环境有关.

3.1.2 临床病理特点: PJS以皮肤黏膜色素斑、胃肠道错构瘤息肉和家族遗传性为3大临床特征. PJS息肉的特点如下^[40,45]: (1)息肉数目多, 大小不一, 全消化系分布, 最好发于空肠上段; (2)息肉可引起急慢性腹痛、肠套叠、肠扭转、肠梗阻、胃肠道出血等并发症; 以肠套叠最常见, 肠套叠发生和STK11状态无关; (3)约有60%患者有明确或可疑家族史, 部分可出现隔代遗传, 真正散发性PJS非常罕见; (4)随着患者年龄的增长, 息肉恶变的风险增加; (5)可伴发肠外肿瘤, 如: 乳腺癌、女性生殖系统肿瘤、睾丸支持细胞瘤、神经节神经胶质瘤等.

3.1.3 临床诊治现状: (1)诊断标准: 2003年全国遗传性大肠癌协作组制定的PJS的诊断标准为^[13]: 消化系多发错构瘤性息肉伴皮肤、黏膜色素沉着, 可有或无家族史. 被诊断为PJS者应进行行LKB1/STK11和(或)FHIT基因的检测. 典型PJS病例诊断不难, 但临床医生如不熟悉PJS临床病

■同行评价

本文全面总结了近年来国内外学者在遗传性结直肠肿瘤研究中所取得的共识与进展, 并就其临床诊治进行展望, 有助于加深人们对遗传性结直肠肿瘤的认识, 提高临床医生对遗传性结直肠肿瘤的诊治能力.

理特点、不重视家族史的调查,仍可造成漏诊。

临床上PJS需要注意与Cronkhite-Canada综合征相鉴别,后者也可表现为消化系息肉和黏膜色素沉着,但其还有脱发、指(趾)甲萎缩脱落的特征性临床表现。Cronkhite-Canada综合征发病晚,是一种获得性、非遗传性疾病,可能与感染、缺乏生长因子、砷中毒有关,精神紧张、过度劳累也是其高危因素;(2)治疗:由息肉而引起的各种并发症是PJS患者反复住院治疗的主要原因。目前,手术配合内镜治疗是PJS息肉的主要治疗方式^[46]。但分子靶向治疗^[47]则将是PJS息肉治疗的方向。对于小息肉、细蒂息肉可采用内镜下电灼烧除或圈套摘除,但由于PJS最好发于空肠上段,而该区域是传统胃镜、结肠镜的检查盲区,因此,双气囊电子小肠镜对于PJS息肉的诊断和治疗具有非常大的优势^[48-49]。另外,内镜也可以在术前、术中和术后3个阶段对手术进行辅助配合。术前内镜检查有助于了解息肉的范围、大小以及对是否需要外科处理做出初步评价。术中内镜检查可了解外科手术探查的“盲区”(如十二指肠水平部)有无息肉、是否梗阻、有无癌变(通过肉眼观察和活检);同时可对确定肠管切开部位进行指导;对小息肉进行镜下处理(但可能延长手术时间)。术后内镜检查一般在术后3-6 mo内进行,对小息肉进一步处理、了解有无新发病灶并及时处理。手术主要是针对由息肉引起的肠梗阻、套叠、出血、癌变等并发症^[46]。处理肠套叠时注意不能强拉硬拽,为防止肠管破裂,应逐步将套叠的肠管从套叠的鞘中挤出,这样可以减少肠管的切除,最大限度保留肠管。针对小肠息肉多发的特点,手术时应要有计划的做切口,小肠切口要小,尽可能减少肠道切口,摘除息肉后应及时修补切口,以免遗漏而造成医源性肠痿。由于小肠息肉大多有蒂,距离切口10-15 cm的范围的息肉,都可从一个切口中拉出。较大的息肉完全可以从小切口中挤出。较大的息肉有其独立的滋养血管,在进行摘除时应注意在基底部彻底缝扎止血,以免术后继发出血。对于病变密集的肠段,可选择小肠部分切除。已经发生恶变的肿瘤,按照恶性肿瘤的原则进行处理。

3.2 FJPC FJPC是一种由BMPRI1A和SMAD4基因突变而引起的常染色体显性遗传^[39,50],发病率约为1/100 000,以结直肠多发幼年性息肉为特征。“幼年性”一词指的是息肉的形态,而不是发病年龄。多数FJPC息肉呈典型的错构瘤特征,但

少数可合并腺瘤性息肉。

3.2.1 遗传学基础:研究证实^[39,50-52],FJPC的遗传学基础是BMPRI1A和SMAD4基因突变。其中BMPRI1A突变约占30%。BMPRI1A被定位于10q22.3,其突变生成的无功能产物可造成TGF β /SMAD细胞信号通路中SMAD蛋白复合物失活,从而影响其下游基因的表达,导致肿瘤形成。目前已知的FJPC中BMPRI1A的突变主要有以下4种:(1)第1外显子中44-47的TGTT片段缺失,导致35-36密码子的终止;(2)第7外显子中G-C的交换导致Gln239终止;(3)第7外显子G-A的交换导致Trp271终止;(4)第8外显子中961的C碱基的丢失。

另有60%多的FJPS患者是由SMAD4的突变引起。SMAD4是一种抑癌基因,被定位于18q21.1,共有15个外显子,其突变主要位于8个外显子中。其突变类型主要包括丢失、插入、替换等。这些突变都可引起SMAD4蛋白的功能缺失,从而影响TGF β /SMAD细胞信号通路下游基因的表达,导致肿瘤的发生。

3.2.2 临床病理特点:根据其临床表现的不同,FJPS可以分为3型:婴儿型、结肠型和胃肠道弥漫型,各型FJPS有其特殊的临床病理特点^[39,51-54]。

(1)婴儿型:较少见,多在出生后数周内出现黏液性腹泻、呕吐、便血等症状,从而继发贫血和营养不良;也可出现肠梗阻、直肠脱垂和肠套叠。如不手术,常死于因消化系出血、肠梗阻及腹泻引起的营养不良;(2)结肠型:最常见,息肉数目多在50-200个,多位于乙状结肠和直肠,右半结肠较少。以便血、黏液便及结肠息肉脱垂为主要症状。发病年龄早(平均6岁),恶变率较高;(3)胃肠道弥漫型:息肉分布于全消化系,以反复上消化道出血为主要症状;多在儿童和青少年发病,恶变率较高。

约有11%-15%的FJPS患者可并发先天性畸形^[51,54],如:杵状指(趾)、肥大性肺性骨关节病、脑积水、唇裂、腭裂、先天性心脏病、肠旋转不良、脐疝、隐睾和美克尔憩室等。另外,FJPS也可伴发结直肠外肿瘤,如:胃癌、十二指肠癌、胰腺癌等。

3.2.3 临床诊治现状:(1)诊断标准:目前尚无通用的FJPS诊断标准,临床上多采用Jass诊断标准^[53]:结直肠幼年性息肉数目 ≥ 5 枚;全胃肠道有幼年性息肉;不论幼年性息肉数目,有家庭史者;(2)临床治疗:FJPS治疗的关键是清除胃肠道息肉、防止并发症发生。和PJS的治疗一样,手

术结合内镜治疗是目前主要的临床治疗手段。对于小的、带蒂息肉应尽可能行内镜下切除或圈套, 对于反复便血、严重贫血或者营养不良、息肉出现严重并发症, 无法用内镜摘除时, 需考虑手术治疗。手术原则是切除全部病变肠管, 但应尽可能保留肛门括约肌功能。

3.3 PHTS PHTS是一组由PTEN基因突变而引起的常染色体显性遗传病^[55]。其中具有结直肠息肉病表现的有: Cowden综合征(Cowden syndrome, CS)又称多发性错构瘤综合征(multiply hamartoma syndrome, MHS)和Bannayan-Riley-Ruvalcaba综合征(BRRS)。

3.3.1 CS: (1)遗传学基础: 研究证实^[56-58]: CS是一种少见的常染色体显性遗传病, 发病率约为1/200 000, 其遗传学基础是PTEN基因突变。PTEN被定位于10q23.3, 含9个外显子和8个内含子。正常情况下, PTEN作为肿瘤抑制基因参与细胞的凋亡调控。而PTEN的突变将造成其蛋白产物丧失对于细胞生长和凋亡的调控功能, 从而导致肿瘤的发生。目前已知的CS中PTEN的突变有100多种, 包括: 点突变、移码突变、错义突变、无义突变、碱基替换等类型; (2)临床病理特点: CS是一种包括结直肠多发性错构瘤息肉病、面部小丘疹、肢端角化病和口腔黏膜乳头状瘤的综合征。具有鲜明的临床病理特点^[50,55-59]: 息肉主要分布于左半结肠, 多呈半球形、群生状, 可与其他类型息肉并存。食管、胃、小肠可伴发丘疹样息肉。面、颈部多发性扁平隆起性小丘疹。口腔黏膜、牙龈多见细小的圆石样丘疹、疣状小丘疹。70%-80%的病例伴有甲状腺和乳腺病变, 如: 甲状腺肿、甲状腺炎、非髓性甲状腺癌、乳腺纤维腺瘤、乳头乳晕畸形、双侧性乳腺癌等。累计所有源自3个胚层的器官, 全身各系统都可出现性质各异、程度不等的病变, 如: 卵巢囊肿、子宫肌瘤、膀胱癌、骨囊肿、病理性骨折、手指畸形、意向震颤、运动协调障碍、思维迟钝、动静脉畸形、房间隔缺损、二尖瓣闭锁不全、视网膜神经胶质瘤、白内障、耳聋、急性骨髓性白血病、糖尿病、甲状旁腺瘤、肾上腺囊肿、自身免疫性溶血、重症肌无力、T淋巴细胞系统免疫不全等; (3)临床诊断: 根据本征的特征: 结直肠多发性错构瘤息肉伴面部小丘疹、肢端角化病和口腔黏膜乳头状瘤, CS不难确诊。国际Cowden协会于1996年首次提出了一套CS诊断操作指标, 并于2000年进行了修订, 这套方案已被美国NCCN采纳^[60-61]。

3.3.2 BRRS: BRRS是一种由PTEN突变引起的、罕见的常染色体显性遗传病^[62], 以结直肠息肉病、大头畸形、脂肪瘤病、血管瘤病和生殖器着色斑病为主要的临床特征。过去认为BRRS与CS不同, 但现在越来越多的证据^[62-64]表明BRRS与CS有等位基因, 约有60%的BRRS家族和孤立性病例存在PTEN的胚系突变。因此, BRRS和CS可能是同一种疾病的不同表现。

3.4 HMPS HMPS是一种罕见的常染色体显性遗传病^[65], 其特征是腺瘤性息肉和幼年性息肉混合存在。于1997年才被首次报道, 且病例数很少。所以, 该病目前的相关资料较少。

3.4.1 遗传学基础: 关于HMPS的遗传学基础目前尚未明确, 曾有学者^[65]将其致病基因定位于6q, 15q14-22, 15q13-14等位置, 但越来越多的学者^[50,65-68]将HMPS的遗传学基础确定为BMPRI1A的胚系突变。由于BMPRI1A的胚系突变也是FJPS的遗传学基础, 因此, 有学者认为HMPS应属于FJPS的变异亚型。

3.4.2 临床病理特点: HMPS也有其特殊的临床病理特点^[65-68], 息肉数目少(<15枚), 全结直肠分布。具有腺瘤性息肉和增生性息肉相重叠的混合性组织学特点。主要病理类型有管状腺瘤、绒毛状腺瘤、扁平息肉、增生性息肉和不典型幼稚息肉。患者患结直肠癌的风险增加, 但并不增加患结肠外肿瘤的概率。

4 诊断及分子靶向治疗

4.1 诊断 目前上述疾病的诊断都是沿用临床诊断标准, 如不认识上述疾病的临床病理特点、不重视家族史的调查, 临床上很容易造成误诊漏诊。特别是那些轻表型病例和息肉数目少的病例更是如此。目前, 临床上确定息肉的类型仍依赖于病理检查, 但是, 部分疾病的息肉在组织学上也无特异性表现, 如不熟悉上述疾病的临床病理特点, 即使是病理医生也可能误诊漏诊。因此, 上述遗传性结直肠肿瘤的诊断终将过渡到基因诊断才能使其临床诊断更准确, 但是目前基因诊断尚处于实验室研究阶段, 受制于其自身的费用大、费时、结果不稳定等缺点, 基因检测尚无法在临床广泛开展。目前, 国内家庭规模的小型化使得遗传性疾病在家族中传递的表现不是那么突出。另外, 上述遗传性结直肠肿瘤很多都伴有结直肠外的病变, 可能涉及多个专业学科。各相关专业科室的临床医生在工作中如不熟悉上述遗传性结直肠肿瘤的临床病理

特点也易造成漏诊。

4.2 分子靶向治疗 随着对肿瘤细胞信号传导途径研究的不断深入,人们对肿瘤细胞内部的癌基因和抑癌基因相互作用已越来越清楚;针对肿瘤的特异性分子靶点而设计的肿瘤治疗方案具有治疗特异性强、效果显著、基本不损伤正常组织的优点^[69]。针对上述遗传性结直肠肿瘤分子靶向药物也逐渐开始应用于临床。其中有代表性的有以下几类。

4.2.1 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)选择性抑制剂: 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成过程中的一个重要限速酶,催化花生四烯酸最终生成一系列内源性前列腺素。人体中环氧合酶-1(cyclooxygenase-1, COX-1)在正常组织中表达,而COX-2在炎症细胞因子、肿瘤促进因子、生长因子和癌基因的诱导下表达,参与多种病理生理过程(包括肿瘤的发生和发展)。COX-2抑制剂用于结直肠息肉和结直肠癌的预防和治疗是目前肿瘤学研究的热点。研究显示^[10,47,70-72]: COX-2在上述所有遗传性结直肠肿瘤中均有高表达。因此,应用COX-2抑制剂将可以抑制上述结直肠肿瘤的发展。美国FDA于1999年批准了选择性COX-2抑制剂用于FAP的辅助治疗。而将COX-2抑制剂应用于上述其他结直肠肿瘤的研究正在进行中。选择性COX-2抑制剂于20世纪90年代开始上市,第1代有尼美舒利、美洛昔康、塞来昔布、罗非昔布等,第2代有伐地昔布(Valdecoxib)、帕瑞昔布(Parecoxib)、依托昔布(Etoricoxib)等。经临床应用已证明第2代COX-2抑制剂对疼痛和炎症是有效的,溃疡的发生率与安慰剂相同。将COX-2作为上述遗传性结直肠肿瘤治疗的新靶点具有广阔的应用前景。原因: (1)COX-2在肿瘤细胞中高表达而在正常细胞中不表达,是良好的肿瘤治疗靶点。化学抑制剂、反义RNA、RNAi等都可阻断COX-2表达而不影响正常组织功能; (2)筛选COX-2相关抗肿瘤药物相对容易。大量的COX-2抑制剂被作为消炎止痛药,传统药物更是巨大的资源宝库,从中筛选具有抗肿瘤活性的COX-2抑制剂会更有针对性; (3)COX-2抑制剂作为消炎止痛一线药物已使用多年,筛选的药物不必再进行临床试验; (4)可根据COX-2延伸寻找和前列腺素合成相关的新的治疗靶点。我们相信,随着研究的深入,COX-2选择性抑制剂将在遗传性结直肠肿瘤的治疗中发挥越来越重要的作用。

4.2.2 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian

target of rapamycin, mTOR)信号通路抑制剂: mTOR是PI3K/Akt通路的下游分子,可接受生长因子、营养、能量等多种信号,是细胞生长和增殖的关键调节分子;被认为是一个调节细胞周期进程和细胞生长的信号汇聚点。研究发现^[73-75]: mTOR信号通路参与了HNPCC、腺瘤性息肉病和错构瘤息肉病的发生、发展等过程。因此,抑制mTOR信号通路将可以抑制上述疾病的发生和发展。雷帕霉素(Rapamycin, 也称西罗莫司, Sirolimus)是mTOR信号通路的第1代抑制剂^[76],由加拿大Ayerst研究所从放线菌培养液中分离出来的是三烯大环内酯类新型强效免疫抑制剂,并具有抗淋巴细胞增殖、抗肿瘤和抗真菌的作用。新一代的mTOR信号通路抑制剂特癌适(Temsirolimus)、依维莫司(Everolimus)已经开始应用于临床。目前上述mTOR信号通路抑制剂主要用于防治肾、肝等移植物的排异反应,尤适用于并发肾功能不良、震颤、高血压的患者;其用于治疗遗传性结直肠肿瘤尚在研究中。由于其不良反应要高于选择性COX-2抑制剂,这可能限制其在遗传性结直肠肿瘤治疗中临床应用。

4.2.3 EGFR、HER-2、VEGF及其受体的抑制剂: 目前针对EGFR、HER-2、VEGF及其受体的靶向抑制剂已经开始应用于结直肠癌的临床治疗^[69]。但关于他们在上述遗传性结直肠肿瘤中的作用的研究很少^[77-80]。能否将针对EGFR、HER-2、VEGF及其受体的靶向抑制剂应用于遗传性结直肠肿瘤尚需进一步研究。

4.2.4 关于遗传性结直肠肿瘤进行分子靶向治疗的思考: 对于遗传性结直肠肿瘤的靶向治疗,我们认为尚需解决以下问题: (1)指标筛查方法问题。目前临床上对于COX-2、mTOR、EGFR、HER-2和VEGF表达的检测多是采用免疫组织化学方法,虽简便易行,但结果易受试剂质量、操作水平等因素的影响,且无法定量检测;表达阳性率差异非常大。能否采用更稳定的筛查方法(如: 荧光原位杂交技术、定量PCR等)或统一试剂标准(如: 固定厂商、固定克隆系)来预防上述问题值得学者探讨; (2)如何依据COX-2、mTOR、EGFR、HER-2和VEGF的表达情况来制定统一的标准以作为遗传性结直肠肿瘤靶向治疗的适应证? 这需要进一步明确遗传性结直肠肿瘤靶向药物治疗与COX-2、mTOR、EGFR、HER-2和VEGF表达之间的关系; (3)确定靶向治疗用药的最佳时机、方案和剂量,如何将其与手术、放化疗联合应用? 多种靶向药

物能否联合应用?

5 结论

目前, 上述遗传性结直肠肿瘤的主要临床治疗手段仍是手术为主, 配合内镜治疗辅助。但上述疾病的病因都是基因突变, 手术和内镜只能毁损这些致病基因和疾病的靶器官, 都只是一种被动和局部的治疗手段。而无法达到病因治疗。如何能达到提前预防、延缓息肉和癌肿生长、甚至消灭息肉这是今后临床科研努力的主要方向和目标。临床目前虽无法进行基因治疗, 但上述疾病中息肉和癌肿的形成和发展需要很长的时间, 多种细胞因子、酶等参与其中。如果能在其发生、发展途径中的关键环节加以阻断或抑制, 那么也可以达到抑制息肉和癌肿的形成、延缓其发展的作用。这将为上述疾病患者开辟一个新的辅助治疗途径, 分子靶向治疗就是其中的代表。

6 参考文献

- Kim JC, Kim SY, Roh SA, Cho DH, Kim DD, Kim JH, Kim YS. Gene expression profiling: canonical molecular changes and clinicopathological features in sporadic colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6662-6672
- 陈明清, 珠珠, 戴莉萍, 魏万里, 杨军, 张洪斌, 董坚. 云南省遗传性大肠癌组织库的建立及管理. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3122-3125
- 韩英. 遗传性大肠癌的临床研究现状及进展. *临床内科杂志* 2007; 24: 519-520
- 顾国利, 周晓武, 王石林. 遗传性非息肉病性大肠癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3115-3121
- Castells A, Balaguer F, Castellví-Bel S, Gonzalo V, Ocaña T. Identification of Lynch syndrome: how should we proceed in the 21st century? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4413-4416
- Shen XS, Zhao B, Wang ZJ. Clinical features and hMSH2/hMLH1 germ-line mutations in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1265-1268
- Meyer LA, Broadus RR, Lu KH. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control* 2009; 16: 14-22
- 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 胡益云, 李德昌. 遗传性非息肉病性大肠癌中hMSH2, hMLH1, T β R II, MMP-7及TIMP-2的表达和其特殊生物学行为间的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1738-1744
- 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 周晓武, 李德昌, 胡益云. 遗传性非息肉病性大肠癌组织E-cad, β -cat和MMP-7表达在侵袭转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2031-2036
- 顾国利, 王石林, 魏学明, 任力, 熊梅, 胡益云, 李德昌, 邹福先, 成健. COX-2, β -cat, MMP-7表达与遗传性非息肉病性大肠癌特殊侵袭转移行为的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 151-157
- Jass JR. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4943-4950
- Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Järvinen HJ, Mecklin JP, Aarnio M, Peltomäki P. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007; 56: 926-933
- 全国遗传性大肠癌协作组. 中国人遗传性大肠癌筛查标准的实施方案. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 191-192
- Herráiz M, Muñoz-Navas M. Recognition and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 125-132
- Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol* 2009; 10: 400-408
- Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A, Engwall Y, Hallberg B, Bergman A, Meuller J, Grönberg H, Karlsson P, Björk J, Nordling M. Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med* 2008; 6: 10
- 冯莉芳, 赖仁胜, 刘丽, 谢玲, 吴晓斌, 张树鹏, 唐翔, 耿建祥. APC基因MCR区突变与大肠肿瘤患者临床发病的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 532-537
- Wachsmannova-Matelova L, Stevurkova V, Adamcikova Z, Holec V, Zajac V. Different phenotype manifestation of familial adenomatous polyposis in families with APC mutation at codon 1309. *Neoplasma* 2009; 56: 486-489
- Cai SR, Zhang SZ, Zheng S. Clinical features of familial adenomas polyps in Chinese and establishment of its immortal lymphocyte cell lines. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2858-2861
- 苏芳, 王涛, 王邦茂. 衰减型家族性腺瘤性息肉病. *中国消化内镜杂志* 2008; 2: 20-26
- Sieber OM, Segditsas S, Knudsen AL, Zhang J, Luz J, Rowan AJ, Spain SL, Thirlwell C, Howarth KM, Jaeger EE, Robinson J, Volikos E, Silver A, Kelly G, Aretz S, Frayling I, Hutter P, Dunlop M, Guenther T, Neale K, Phillips R, Heinemann K, Tomlinson IP. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut* 2006; 55: 1440-1448
- 杨邵瑜, 蔡善荣, 张苏展. 家族性腺瘤性息肉病及其亚型的临床及遗传表现. *实用肿瘤杂志* 2007; 22: 270-273
- Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, Breuning MH, Wijnen JT, Tops CM, Vasen HF. Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet* 2007; 71: 427-433
- Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C, Balaguer F, Muñoz J, Madrigal I, Milà M, Graña B, Vega A, Castells A, Carracedo A, Ruiz-Ponte C. Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* 2009; 10: 57
- Poulsen ML, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* 2008; 9: 420-435
- 周卉卉, 吕炳建, 来茂德. 遗传性MUTYH基因突变与结直肠癌. *浙江大学学报(医学版)* 2007; 34: 406-411
- Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N, Vogt S, Tops CM, Vasen HF, Sampson JR, Aretz S, Hes FJ. Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated

- polyposis. *Gastroenterology* 2009; 136: 471-476
- 28 Smud D, Augustin G, Kekez T, Kinda E, Majerovic M, Jelincic Z. Gardner's syndrome: genetic testing and colonoscopy are indicated in adolescents and young adults with cranial osteomas: a case report. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3900-3903
- 29 Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 2006; 5: 221-226
- 30 Fotiadis C, Tsekouras DK, Antonakis P, Sfiniadakis J, Genetzakis M, Zografos GC. Gardner's syndrome: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5408-5411
- 31 Gu GL, Wang SL, Wei XM, Bai L. Diagnosis and treatment of Gardner syndrome with gastric polyposis: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2121-2123
- 32 Reuss D, von Deimling A. Hereditary tumor syndromes and gliomas. *Recent Results Cancer Res* 2009; 171: 83-102
- 33 Lebrun C, Olschwang S, Jeannin S, Vandenbos F, Sobol H, Frenay M. Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur J Neurol* 2007; 14: 470-472
- 34 Sjursen W, Bjørnevoll I, Engebretsen LF, Fjelland K, Halvorsen T, Myrvold HE. A homozygote splice site PMS2 mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer* 2009; 8: 179-186
- 35 Sarin S, Bernath A. Turcot syndrome (glioma polyposis): a case report. *South Med J* 2008; 101: 1273-1274
- 36 Wuthrich P, Gervaz P, Ambrosetti P, Soravia C, Morel P. Functional outcome and quality of life after restorative proctocolectomy and ileo-anal pouch anastomosis. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 193-197
- 37 Edlich R, Cross CL, Wack CA, Chase ME, Gubler K, Long WB 3rd. Revolutionary advances in the diagnosis and treatment of Familial Adenomatous Polyposis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2009; 28: 47-52
- 38 Filho OG, Gordan AN, Mello Rde A, Neto CS, Heinke T. Myoid hamartomas of the breast: report of 3 cases and review of the literature. *Int J Surg Pathol* 2004; 12: 151-153
- 39 Calva D, Howe JR. Hamartomatous polyposis syndromes. *Surg Clin North Am* 2008; 88: 779-817, vii
- 40 王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和问题. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2385-2389
- 41 Li LJ, Wang ZQ, Wu BP. Peutz-Jeghers syndrome with small intestinal malignancy and cervical carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7397-7399
- 42 Hezel AF, Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression. *Oncogene* 2008; 27: 6908-6919
- 43 Fan D, Ma C, Zhang H. The molecular mechanisms that underlie the tumor suppressor function of LKB1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 97-107
- 44 Vasovcák P, Puchmajerová A, Roubalík J, Krepelová A. Mutations in STK11 gene in Czech Peutz-Jeghers patients. *BMC Med Genet* 2009; 10: 69
- 45 Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M, Wei C, McGarrity TJ, Seldin MF, Nations L, Lynch PM, Fidler HH, Friedman E, Frazier ML. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: 327-333
- 46 王石林, 毛高平, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征胃肠道息肉的36例诊治经验. *中华胃肠外科杂志* 2009; 12: 428
- 47 王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征胃肠道息肉的药物干预性治疗的进展. *中国普外基础与临床杂志* 2009; 16: 333-335
- 48 宁守斌, 毛高平, 曹传平, 白莉, 唐杰, 杨春敏, 周平, 陈英, 杜斌. 双气囊小肠镜对Peutz-Jeghers综合征患者小肠息肉的治疗价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1588-1591
- 49 毛高平, 宁守斌, 白莉, 唐杰, 曹传平, 杨春敏, 陈英, 周平, 杜斌. 双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断中的应用价值. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3049-3053
- 50 Chen HM, Fang JY. Genetics of the hamartomatous polyposis syndromes: a molecular review. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 865-874
- 51 Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1634-1640
- 52 姚蓝, 宋家武. 肠息肉发生的细胞和分子生物学研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2958-2961
- 53 刘剑, 李群, 陈丽荣, 斯诚, 吴善水. 家族性幼年性息肉病的家系研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 553-556
- 54 王丽君, 宁建文, 季峰, 厉有名. 成人胃幼年性息肉和幼年性息肉病临床病理特征及癌变趋势探讨. *中华消化杂志* 2005; 25: 43-44
- 55 Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 1289-1300
- 56 Umemura K, Takagi S, Ishigaki Y, Iwabuchi M, Kuroki S, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Gastrointestinal polyposis with esophageal polyposis is useful for early diagnosis of Cowden's disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5755-5759
- 57 李季, 田素礼, 李巍, 李福蕴. 结直肠癌中PTEN的缺失表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2771-2775
- 58 刘玉环, 王锡智, 蔡在龙, 俞超芹, 崔英, 沙金燕. PTEN基因突变与遗传性癌症综合征及其相关疾病的研究进展. *第二军医大学学报* 2005; 26: 90-92
- 59 Blanco V, Keochgerián V. Cowden's syndrome. Case report, with reference to an affected family. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E12-E16
- 60 Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* 2009; 18: 13-27
- 61 Leão JC, Batista V, Guimarães PB, Belo J, Porter SR. Cowden's syndrome affecting the mouth, gastrointestinal, and central nervous system: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 569-572
- 62 Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene* 2008; 27: 5387-5397
- 63 Lachlan KL, Lucassen AM, Bunyan D, Temple IK. Cowden syndrome and Bannayan Riley Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers. *J Med Genet* 2007; 44: 579-585
- 64 Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA, Eng C. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1141-1149
- 65 彭慧, 曹霞, 余光荣, 汪建平. 华人遗传性混合息肉病综合征BMPRI A基因种系突变检测. *中山大学学报(医学科学版)* 2005; 26: 316-320
- 66 Cao X, Eu KW, Kumarasinghe MP, Li HH, Loi

- C, Cheah PY. Mapping of hereditary mixed polyposis syndrome (HMPs) to chromosome 10q23 by genomewide high-density single nucleotide polymorphism (SNP) scan and identification of BMPR1A loss of function. *J Med Genet* 2006; 43: e13
- 67 Sweet K, Willis J, Zhou XP, Gallione C, Sawada T, Alhopuro P, Khoo SK, Patocs A, Martin C, Bridgeman S, Heinz J, Pilarski R, Lehtonen R, Prior TW, Frebourg T, Teh BT, Marchuk DA, Aaltonen LA, Eng C. Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis. *JAMA* 2005; 294: 2465-2473
- 68 彭慧, 曹霞, 李慧华, 黎桃, 余光荣, 汪建平. 华人遗传性混合息肉病综合征患者单倍型及遗传连锁分析. *中华胃肠外科杂志* 2005; 8: 316-319, 324
- 69 魏学明, 顾国利, 任力, 熊梅, 王石林, 李德昌. 大肠癌EGFR、HER-2、VEGF表达特点及其对分子靶向治疗的指导意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1836-1841
- 70 Takeda H, Miyoshi H, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Simultaneous expression of COX-2 and mPGES-1 in mouse gastrointestinal hamartomas. *Br J Cancer* 2004; 90: 701-704
- 71 Brazowski E, Misonzhnick-Bedny F, Rozen P. Cyclooxygenase-2 expression in the hereditary mixed polyposis syndrome. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1906-1911
- 72 van Hattem WA, Brosens LA, Marks SY, Milne AN, van Eeden S, Iacobuzio-Donahue CA, Ristimäki A, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Increased cyclooxygenase-2 expression in juvenile polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 93-97
- 73 Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschräger M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat Res* 2008; 659: 284-292
- 74 Wei C, Amos CI, Zhang N, Wang X, Rashid A, Walker CL, Behringer RR, Frazier ML. Suppression of Peutz-Jeghers polyposis by targeting mammalian target of rapamycin signaling. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1167-1171
- 75 Fujishita T, Aoki K, Lane HA, Aoki M, Taketo MM. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13544-13549
- 76 Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1-14
- 77 Roberts RB, Min L, Washington MK, Olsen SJ, Settle SH, Coffey RJ, Threadgill DW. Importance of epidermal growth factor receptor signaling in establishment of adenomas and maintenance of carcinomas during intestinal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1521-1526
- 78 Brugarolas J, Kaelin WG Jr. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell* 2004; 6: 7-10
- 79 McGarrity TJ, Peiffer LP, Billingsley ML. Overexpression of epidermal growth factor receptor in Peutz-Jeghers syndrome. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1136-1141
- 80 Ylikorkala A, Rossi DJ, Korsisaari N, Luukko K, Alitalo K, Henkemeyer M, Mäkelä TP. Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* 2001; 293: 1323-1326

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 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(科学编辑:李军亮 2009-10-28)

$p15^{INK4B}$ 和 $p21^{WAF1}$ 基因联合转染对人食管鳞癌细胞系EC109的协同抑制作用

张学彦, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟, 刘铁夫, 刘冰熔

■背景资料

$p15$ 和 $p21$ 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CIK)家族成员,是食管鳞状细胞癌(ESCC)中经常失活的基因,与ESCC的发生,发展密切相关,二者通过不同机制使增殖细胞在 G_1 期向S期的过渡受阻。

张学彦, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属二院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

刘伟, 哈尔滨医科大学附属二院分子实验中心, 黑龙江省哈尔滨市 150086

刘铁夫, 哈尔滨医科大学附属四院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150000

张学彦, 副主任医师, 医学博士, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。

黑龙江省科技计划攻关重点项目基金资助项目, No. GB05C401-09

黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 11521191

黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2007-304

作者贡献分布: 此课题由张学彦与关景明设计; 研究过程由张学彦、刘志强、景德怀、刘伟、刘铁夫及刘冰熔操作完成; 研究所用试剂及分析工具部分由刘伟提供; 数据分析与论文写作由张学彦完成。

通讯作者: 张学彦, 副主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院消化科。

zxyxw@sina.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2009-08-22 修回日期: 2009-09-26

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-28

China. zxyxw@sina.com

Received: 2009-08-22 Revised: 2009-09-26

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the synergistic effects of $p15^{INK4B}$ ($p15$) and $p21^{WAF1}$ ($p21$) gene cotransfection on the proliferation and apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma EC109 cells.

METHODS: The recombinant plasmids pcDNA3.1(+)- $p15$ and pcDNA3.1(+)- $p21$ were introduced into EC109 cells by liposome-mediated transfection. The expression of $p15$ and $p21$ mRNA and protein was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Cell proliferation was measured by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. Apoptotic cells were observed using a transmission electron microscope. Cell cycle distribution and apoptosis rate were measured by flow cytometry.

RESULTS: The proliferation of EC109 cells transfected with either of the two recombinant plasmids was significantly inhibited when compared with untransfected cells or cells transfected with empty plasmid. The proliferation of cotransfected cells was more significantly inhibited than that of cells transfected with either of the two recombinant plasmids. The percentages of cells in G_1 phase were significantly higher in cells transfected with either of the two recombinant plasmids than in cells transfected with empty plasmid and untransfected cells ($60.52\% \pm 3.75\%$ and $63.12\% \pm 2.89\%$ vs $42.17\% \pm 5.30\%$ and $41.38\% \pm 6.54\%$, respectively; all $P < 0.01$), while the percentages of cells in S phase were significantly lower in cells transfected with either of the two recombinant plasmids than in cells transfected with empty plasmid and untransfected cells ($22.67\% \pm 1.25\%$ and $17.96\% \pm 2.03\%$ vs $30.96\% \pm 3.33\%$ and $36.05\% \pm 1.78\%$, respectively; all $P < 0.01$). In cotransfected cells, the percentage of cells in G_1 phase significantly increased ($72.83\% \pm 2.31\%$ vs $60.52\% \pm 3.75\%$ and

Cotransfection of the $p15^{INK4B}$ and $p21^{WAF1}$ genes synergistically inhibits proliferation and promotes apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109

Xue-Yan Zhang, Zhi-Qiang Liu, De-Huai Jing, Jing-Ming Guan, Wei Liu, Tie-Fu Liu, Bing-Rong Liu

Xue-Yan Zhang, Zhi-Qiang Liu, De-Huai Jing, Jing-Ming Guan, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Wei Liu, Molecular Biology Experimental Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Key Project of Heilongjiang Provincial Science and Technology Program, No. GB05C401-09; the Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department, No. 11521191; and the Scientific Research Foundation of Heilongjiang Provincial Health Department, No. 2007-304

Correspondence to: Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province,

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

63.12% ± 2.89%, respectively; both $P < 0.05$), the percentage of cells in S phase significantly decreased (13.59% ± 2.59% vs 22.67% ± 1.25% and 17.96% ± 2.03%, respectively; both $P < 0.05$), and apoptosis rate was significantly elevated (21.21% ± 1.78% vs 4.32% ± 1.74% and 10.83% ± 2.40%, respectively; both $P < 0.01$) when compared with cells transfected with either of the two recombinant plasmids.

CONCLUSION: Cotransfection of the *p15* and *p21* genes synergistically inhibits proliferation and promotes apoptosis in EC109 cells.

Key Words: *p15^{INK4B}*; *p21^{WAF1}*; Gene transfection; Esophageal squamous cell carcinoma

Zhang XY, Liu ZQ, Jing DH, Guan JM, Liu W, Liu TF, Liu BR. Cotransfection of the *p15^{INK4B}* and *p21^{WAF1}* genes synergistically inhibits proliferation and promotes apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3086-3091

摘要

目的: 探讨*p15^{INK4B}*(*p15*)和*p21^{WAF1}*(*p21*)基因联合转染对人食管鳞癌细胞系EC109细胞增殖和凋亡的影响。

方法: 脂质体介导pcDNA3.1(+)-*p15*和pcDNA3.1(+)-*p21*转染EC109细胞, 稳定筛选后用RT-PCR检测转染细胞*p15*与*p21*基因mRNA表达, Western blot检测转染细胞P15和P21蛋白的表达。用MTT法和透射电镜检测*p15*和*p21*基因分别及联合转染对EC109细胞增殖与凋亡的影响, 流式细胞仪检测EC109细胞周期分布与凋亡率。

结果: *p15*和*p21*转染组EC109细胞生长速度低于空载体组与未转染组, 联合转染组与二者单独转染组相比, 亦明显抑制EC109细胞体外生长速度。*p15*和*p21*转染组EC109细胞发生G₁/S阻滞, G₁期细胞比例显著高于空载体组和未转染组, S期则显著降低(G₁期: 60.52% ± 3.75%, 63.12% ± 2.89% vs 42.17% ± 5.30%, 41.38% ± 6.54%; S期: 22.67% ± 1.25%, 17.96% ± 2.03% vs 30.96% ± 3.33%, 36.05% ± 1.78%, 均 $P < 0.01$), 并出现凋亡峰, 透射电镜亦发现*p15*和*p21*转染组发生细胞凋亡, 联合转染组发生更为明显的G₁/S阻滞, G₁期比例显著升高、S期比例明显降低(G₁期: 72.83% ± 2.31% vs 60.52% ± 3.75%, 63.12% ± 2.89%; S期: 13.59% ± 2.59% vs 22.67% ± 1.25%, 17.96% ± 2.03%, 均 $P < 0.05$), 凋亡率明显升高(21.21% ± 1.78% vs 4.32% ± 1.74%, 10.83% ± 2.40%, 均 $P < 0.01$)。

结论: *p15*和*p21*基因联合转染在体外可以进一步增强对人食管鳞癌EC109细胞的抑制与诱导凋亡作用。

关键词: *p15^{INK4B}*; *p21^{WAF1}*; 基因转染; 食管鳞癌

张学彦, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟, 刘铁夫, 刘冰熔. *p15^{INK4B}*和*p21^{WAF1}*基因联合转染对人食管鳞癌细胞系EC109的协同抑制作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3086-3091
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3086.asp>

0 引言

p15^{INK4B}(简称*p15*)和*p21^{WAF1}*(简称*p21*)是近年来发现的重要的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI), 都是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中经常失活的抑癌基因。二者作用机制不同, *p15*属于INK4家族, 能特异性地直接作用于CyclinD1/CDK4复合物, 负调细胞周期过程, *p21*属于Cip/Kip家族, 对所有的Cyclin-CDK复合体都有一定的抑制作用。与细胞周期特异性和非特异性化疗药物联合应用增强抗癌效应的机制相似, 共转染此二基因可能有协同作用而增强对ESCC治疗效果。因而我们采用脂质体介导, 将*p15*和*p21*基因分别及联合转染人ESCC细胞株EC109细胞, 探讨*p15*和*p21*联合转染提高抑癌疗效的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达质粒pCMV5-*p15*由北京师范大学生命科学院-教育部细胞增殖与调控重点实验室柳惠图教授惠赠, 我实验室将其亚克隆至有真核筛选标志新霉素抗性基因(neo)的pCDNA3.1(+)上, 称为pCDNA3.1(+)-*p15*, 经测序鉴定^[1]。委托上海生工公司全基因合成*p21*的插入片段, 克隆构建*p21*真核表达质粒pcDNA3.1(+)-*p21*, 经测序鉴定^[2]。EC109细胞株购自中国科学院上海细胞所。Taq酶购自上海生工公司, 逆转录试剂盒、限制性内切酶、质粒中提试剂盒是Promega公司产品, *p15*、*p21*小鼠抗人单抗是Neo Markers公司产品, 辣根酶标山羊抗小鼠IgG为北京中杉公司产品, 脂质体Lipofectamine2000购于Invitrogen公司。引物由上海生工公司合成。上海生工公司进行质粒测序。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人ESCC EC109细胞在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下, 用含100 mL/L胎牛

■ 研发前沿

针对细胞周期进行的抗肿瘤治疗是研究热点, 基因治疗是抗肿瘤治疗的发展方向, 亟待研究的问题是选择何种恰当、有效的基因, 以何种安全、方便、有效的方式导入受体。

■创新盘点

本研究将作用机制不同的2种CKI, 即*p15*和*p21*转染到人ESCC细胞系EC109中, 研究其对ESCC细胞生长的影响, 探讨共转染此2基因是否有协同作用, 而增强对ESCC治疗效果, 这可能是ESCC基因治疗的一种新途径。

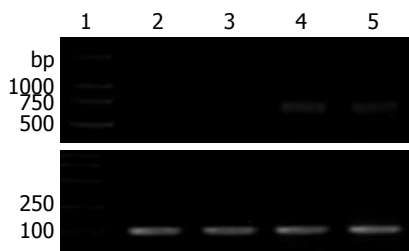


图1 EC109转染细胞*p15* mRNA的表达. 1: Marker; 2: 未转染组; 3: 空载体转染组; 4: *p15*转染组; 5: *p15*、*p21*共转染组。

血清的DMEM高糖培养基培养。

1.2.2 RT-PCR检测: 用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA. 逆转录cDNA第一链合成后行PCR, *p15*引物(退火58℃, 产物753 bp): 上游5'-CCAGAAGC AATCCAGGCGCG-3', 下游: 5'-CGTTGGCAG CCTTCATCG-3'. *p21*引物(退火56℃, 产物218 bp): 上游5'-TGTCCTCAGAACCCATG-3', 下游: 5'-GTGGGAAGGTAGAGCTTGG-3'. β -actin引物(退火56℃, 产物100 bp): 上游: 5'-CCCAGC ACAATGAAGATCAAGATCAT-3', 下游: 5'-ATC TGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'. 反应35个循环, 产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, 照相。

1.2.3 基因转染:

1.2.3.1 分组: 根据转染质粒的不同和是否进行质粒转染分为5组. (1)未转染组: 不进行转染的同期培养的EC109细胞; (2)空载体转染组: 用pCDNA3.1(+)-neo质粒转染EC109细胞; (3)*p15*转染组: 用pCDNA3.1(+)-*p15*真核表达质粒转染; (4)*p21*转染组: 用pCDNA3.1(+)-*p21*真核表达质粒转染; (5)*p15*和*p21*共转染组: 用等量pCDNA3.1(+)-*p15*、pCDNA3.1(+)-*p21*共转染EC109细胞。

1.2.3.2 转染方法: 按照Lipofectamine2000说明书进行. 转染48 h后加入终浓度为400 mg/L G418的选择培养基. 每2-4 d更换培养基, 4 wk后挑选阳性克隆扩大培养。

1.2.3.3 Western blot检测外源P15、P21蛋白: 提取细胞总蛋白, Bradford法定量. 5%积层胶、120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 进行一抗、酶标二抗孵育和显色, 照相。

1.2.4 生长曲线(MTT法): 取对数生长期细胞按 3×10^3 个细胞/孔接种96孔板, 每孔加5 g/L MTT溶液20 μ L, 37℃孵育4 h, 每孔加180 μ L二甲亚砜, 振荡10 min, 选490 nm波长测定吸光度值, 每隔24 h测定1次, 连续测定7 d, 绘制细胞生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测: 每组取 1×10^6 个细胞, 加入700 mL/L冷乙醇4℃固定24 h, 用50 mg/L RNA

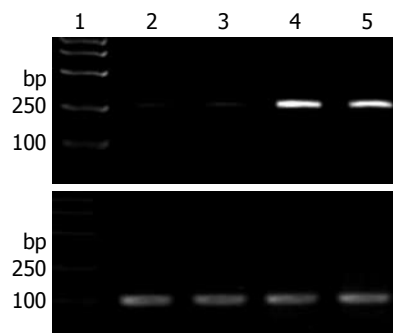


图2 EC109转染细胞*p21* mRNA的表达. 1: Marker; 2: 未转染组; 3: 空载体转染组; 4: *p21*转染组; 5: *p15*、*p21*共转染组。

酶37℃处理30 min, 加100 mg/L碘化丙啶染色, 避光30 min, 进行测定。

1.2.6 透射电镜: 取各组细胞, 每组 1×10^6 个细胞, 1500 r/min离心10 min, 加入3%戊二醛固定1 wk, 送透射电镜检测。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 用SPSS11.0统计软件, 采用单因素方差分析进行统计分析。

2 结果

2.1 EC109细胞*p15*、*p21* mRNA表达 RT-PCR发现EC109细胞*p15*基因mRNA无表达, 证明其*p15*表达缺失, *p15*转染细胞和*p15*、*p21*共转染组有*p15* mRNA高表达(图1); EC109细胞*p21*基因mRNA低表达, *p21*转染细胞和*p15*、*p21*共转染组有*p21* mRNA高表达(图2)。

2.2 转染细胞外源性P15、P21蛋白检测 Western blot证实空载体转染和未转染组无相对分子质量为15 kDa的P15蛋白目的条带, *p15*转染组和*p15*、*p21*共转染组的EC109细胞中有强的15 kDa目的条带, 可证明转染的pCDNA3.1(+)-*p15*质粒后, P15蛋白在EC109细胞中高表达(图3); 空载体转染和未转染组EC109细胞中有相对分子质量为21 kDa弱的P21蛋白目的条带, *p21*转染组和*p15*、*p21*共转染组有强的21 kDa目的条带, 可证明转染的pCDNA3.1(+)-*p21*质粒后, P21蛋白在EC109细胞中由弱表达变为高表达(图4)。

2.3 生长曲线(MTT法) 自第3天开始*p15*、*p21*联合转染与二者单独转染对EC109细胞均有生长抑制作用, 联合转染的抑制作用则明显强于二者单独转染(图5)。

2.4 细胞周期分析 *p15*和*p21*转染组EC109细胞发生G₁/S阻滞, G₁期细胞比例显著高于空载体组和未转染组(60.52% \pm 3.75%, 63.12% \pm 2.89%

表 1 *p15*、*p21*转染对EC109细胞周期的影响 (% , $n = 3$, mean \pm SD)

分组	细胞周期			凋亡率
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	
未转染组	41.38 \pm 6.54	22.57 \pm 5.46	36.05 \pm 1.78	0.18 \pm 0.09
空载体转染组	42.17 \pm 5.30	26.87 \pm 2.92	30.96 \pm 3.33	0.18 \pm 0.10
<i>p15</i> 转染组	60.52 \pm 3.75 ^a	16.80 \pm 4.97	22.67 \pm 1.25 ^a	4.32 \pm 1.74 ^a
<i>p21</i> 转染组	63.12 \pm 2.89 ^a	18.92 \pm 3.08	17.96 \pm 2.03 ^a	10.83 \pm 2.40 ^a
<i>p15</i> 、 <i>p21</i> 共转染组	72.83 \pm 2.31 ^c	13.58 \pm 4.18	13.59 \pm 2.59 ^c	21.21 \pm 1.78 ^d

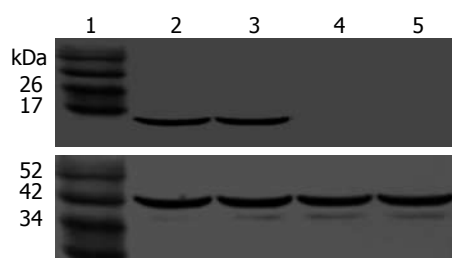
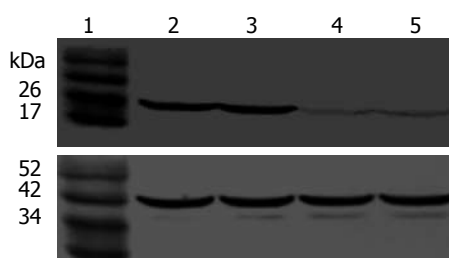
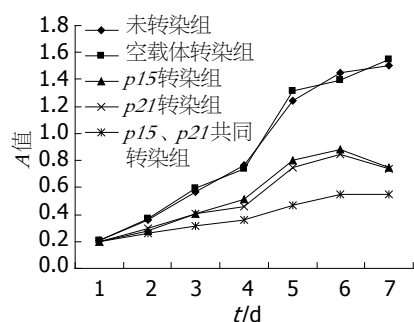
^a $P < 0.05$ vs 空载体转染组和未转染组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 其余各组.图 3 EC109转染细胞P15蛋白的表达. 1: Marker; 2: *p15*、*p21*共转染组; 3: *p15*转染组; 4: 空载体转染组; 5: 未转染组.图 4 EC109转染细胞P21蛋白的表达. 1: Marker; 2: *p15*、*p21*共转染组; 3: *p21*转染组; 4: 空载体转染组; 5: 未转染组.

图 5 各组转染EC109细胞生长曲线.

vs 42.17% \pm 5.30%, 41.38% \pm 6.54%, 均 $P < 0.01$), S期比例显著低于空载体组和未转染组(22.67% \pm 1.25%, 17.96% \pm 2.03% vs 30.96% \pm 3.33%, 36.05% \pm 1.78%, 均 $P < 0.01$), 并出现凋亡峰, 透射电镜亦发现*p15*和*p21*转染组发生细胞凋亡. *p15*和*p21*联合转染组发生更为明显G₁/S阻滞, G₁期比例显著升高(72.83% \pm 2.31% vs 60.52% \pm 3.75%, 63.12% \pm 2.89%, 均 $P < 0.05$), S期比例明显降低(13.59 \pm 2.59 vs 22.67% \pm 1.25%, 17.96% \pm 2.03%, 均 $P < 0.05$), 凋亡率明显升高(21.21% \pm 1.78% vs 4.32% \pm 1.74%, 10.83 \pm 2.40%, 均 $P < 0.01$, 图6, 表1).

2.5 细胞形态学变化 倒置显微镜可见细胞生长受到抑制, 细胞传代时间延长, 核分裂相对减少, 细胞数量相对较少, 可见部分细胞缩小、变圆,

自瓶壁脱落, 悬浮于培养液中, 未转染组和空载体转染组细胞相比无明显差别, 生长旺盛, 贴壁良好, 细胞密度相对较大. 透射电镜可见空白对照及空载体转染组细胞生长状态较好, 未见凋亡形态学改变, 核浆比例大, 圆形核仁多, 细胞表面绒毛密集排列, 双层核膜结构清晰, 胞质内有丰富的游离核蛋白体. *p15*、*p21*单独转染组: 可见部分细胞发生凋亡, 细胞表面绒毛消失, 细胞体积变小, 细胞核染色质形成高密度斑块, 染色质边集, 细胞质有大量脂滴堆积, 线粒体发生髓样变, 游离核糖体减少. *p15*、*p21*联合转染细胞: 凋亡细胞数量明显增多, 形态特征同上(图7).

3 讨论

食管癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 我国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家. 随着对肿瘤发病机制的深入研究, 人们逐渐认识到肿瘤是一类细胞周期异常性疾病. 在细胞周期中发挥重要作用的细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinase, CDK)、CDK抑制因子(CKI)等越来越受到重视. 在肿瘤细胞中常伴随CKI的突变、缺失或表达降低现象, 因此CKI被看成一类抑癌基因.

*p15*是近年来发现的一类CKI分子, 定位于9号染色体9p21区, 这一区域易发生缺失、突变和甲基化, 从而导致恶性肿瘤发生^[3]. *p15*的

应用要点

*p15*和*p21*二基因有协同作用而增强对ESCC的抑制效果, 这是ESCC治疗的一种新的思路 and 模式, 且*p15*和*p21*转染的优点是其片段长度小, 克隆和转染操作比较方便, 是基因治疗很好的靶基因.

同行评价

本文研究了 $p15^{INK4B}$ 和 $p21^{WAF1}$ 基因联合转染对人食管鳞癌细胞系 EC109 的协同作用, 设计严谨, 方法科学, 具有一定的可读性。

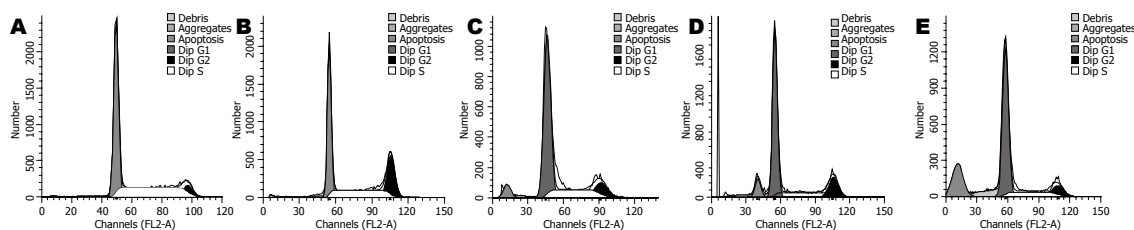


图6 $p15$ 、 $p21$ 转染对EC109细胞周期的影响。A: 未转染组; B: 空载体转染组; C: $p15$ 转染组; D: $p21$ 转染组; E: $p15$ 、 $p21$ 共转染组。

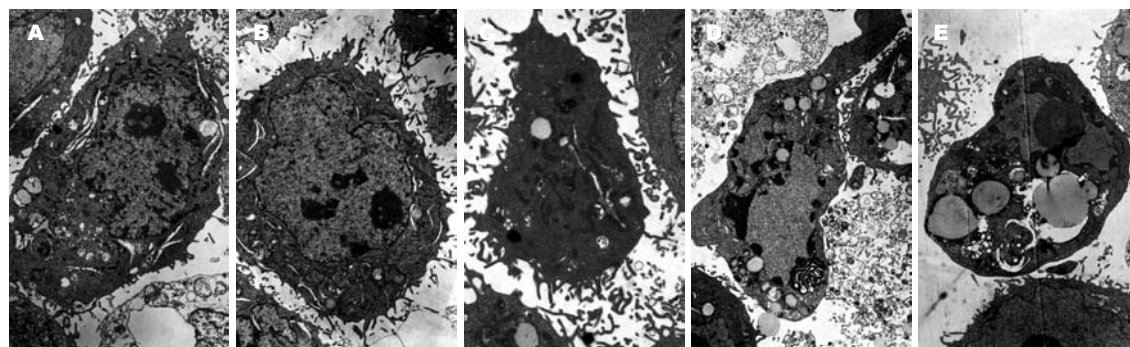


图7 $p15$ 、 $p21$ 共转染EC109细胞电镜表现。A: 未转染组; B: 空载体转染组; C: $p15$ 转染组; D: $p21$ 转染组; E: $p15$ 、 $p21$ 共转染组。

抑癌机制与细胞周期调控密切相关, 能特异地通过直接作用于CyclinD1/CDK4复合物中的CyclinD1, 从而影响CDK4激酶的活性, 并导致pRb磷酸化水平下降, 使细胞被阻滞在G₁期, 负调细胞周期过程。此外, $p15$ 是TGF- β 诱导产生细胞生长阻滞的关键^[4]。TGF- β 对上皮细胞有生长抑制作用, $p15$ 失活可能使细胞对胞外信号不敏感而导致癌症发生。

$p15$ 基因在多种肿瘤存在表达缺失, 他是ESCC发生过程中经常失活的靶基因^[5], 是引发ESCC的重要因素, 有关 $p15$ 转染对ESCC乃至其他鳞癌引起增殖抑制的报道较少, 我们发现转染 $p15$ 基因后, 食管癌EC109细胞增殖明显受抑制, 流式细胞仪检测发现亚G₁凋亡峰, 透射电镜亦发现细胞凋亡^[1]。

$p21$ 也是近年来发现的一类CKI分子, 编码由164个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量为21 kDa, 是非常重要的抑癌基因。 $p21$ 结合并抑制CDK, 受 $p53$ 调控, 可防止衰老细胞进入细胞周期。P21蛋白抑制DNA复制必需因子-增殖细胞核抗原(proliferating-cell nuclear antigen, PCNA), 并能广泛地抑制各种Cyclin-CDK复合物, 如CyclinD-CDK4、CyclinE-CDK2和CyclinA-CDK2, P21蛋白和PCNA结合形成 $p21$ 。CyclinE.cdk2.PCNA四联复合物, 通过对CDK和PCNA的双重抑制作用, 使细胞有足够的时间进

行DNA修复, 维持细胞遗传信息的稳定性^[6], 使得增殖细胞在G₁向S期过渡受阻, 抑制DNA的复制, 修复受损的DNA或最终导致细胞的凋亡。

$p21$ 表达降低在食管癌中多见^[7], 食管癌局部浸润肿瘤中 $p21$ 表达下调能反映肿瘤的进展^[8]。食管癌中 $p21$ 高表达者预后较好^[9]。P21蛋白的异常表达与ESCC的发生、发展及组织学类型、淋巴结转移TNM分期密切相关, 说明 $p21$ 基因在食管癌的调控机制中起负性调控作用^[10]。食管癌患者总生存率与 $p21$ 阳性表达呈正相关^[11]。 $p21$ 基因与化疗敏感性密切相关, $p21$ 阳性表达的食管癌高温化学放射治疗效果较好^[12]。通过改变 $p21$ 基因的表达可以起到调节肿瘤生长的作用, 如有报道发现肿瘤抑制基因ECRG1通过调节 $p21$ 表达可促进食管癌细胞NIH3T3发生细胞周期阻滞^[13], 此外有人发现抑制食管癌T-型通道后可通过 $p53$ 依赖的 $p21$ 途径抑制细胞增殖, 食管癌TE8细胞增殖抑制与 $p21$ 表达上调有关^[14]。这些发现都提示可以考虑用 $p21$ 基因转染抑制食管癌。我们发现转染 $p21$ 基因后, 食管癌EC109细胞增殖明显受抑制, 流式细胞仪检测发现亚G₁凋亡峰, 透射电镜亦发现细胞凋亡。

恶性肿瘤的发生是一个多因素、多阶段的复杂过程, 单一基因治疗靶点比较单一, 效果有限, 为解决此问题, 我们采用抑癌基因 $p15$ 、 $p21$ 联合转染联合抑制ESCC, 一方面增加抑癌作用

靶点, 另一方面二者作用机制不同, *p15*能特异地作用于CyclinD1/CDK4复合物, 导致pRb磷酸化水平下降, 使细胞阻滞在G₁期. *p21*则对所有的Cyclin-CDK复合体都有一定的抑制作用, 共转染此二基因可能有协同作用而增强对ESCC的抑制效果. Quereda *et al*^[15]描述*p21*和INK4通路的失活协同抑制体外细胞的老化过程. 二者均有突变的细胞具有不死性而且显示出对致癌基因细胞转化的高敏感性. INK4和*p21*通路均有突变的老鼠模型发生肉瘤的几率升高, 说明这两个细胞周期抑制剂家族在肿瘤抑制中有明显的协同作用^[15]. Wall *et al*^[16]证实*p15*和*p21*联合作用明显增强与纤维状胶原(fibrillar collagen, FC)接触生长的肿瘤细胞的细胞周期阻滞.

我们发现分别转染*p15*和*p21*基因后EC109细胞增殖受抑制, 流式细胞仪检测发现亚G₁凋亡峰, 透射电镜亦发现细胞凋亡. 二者联合转染后, 生长抑制作用明显增强, 细胞周期阻滞作用更加明显, 并诱导更多细胞发生凋亡, 这证明*p15*和*p21*二基因有协同作用而增强对ESCC的抑制效果. 本实验是ESCC治疗的一种新的思路和模式.

4 参考文献

- 1 张学彦, 刘铁夫, 于畅, 刘伟, 崔希威. *p15^{INK4B}*基因转染对人食管鳞癌细胞EC109增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1945-1950
- 2 张学彦, 景德怀, 刘志强, 关景明, 刘伟. *p21^{WAF1}*基因对人食管鳞癌细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1384-1389
- 3 Cheung AL, Si HX, Wang LD, An JY, Tsao SW. Loss of heterozygosity analyses of esophageal squamous cell carcinoma and precursor lesions from a high incidence area in China. *Cancer Lett* 2005 May 6. [Epub ahead of print]
- 4 Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000; 19: 5178-5193
- 5 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Hölscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004; 27: 200-206
- 6 Datta K, Babbar P, Srivastava T, Sinha S, Chattopadhyay P. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 148-157
- 7 Zhang H, Jin Y, Chen X, Jin C, Law S, Tsao SW, Kwong YL. Papillomavirus type 16 E6/E7 and human telomerase reverse transcriptase in esophageal cell immortalization and early transformation. *Cancer Lett* 2007; 245: 184-194
- 8 Masuda N, Kato H, Nakajima T, Sano T, Kashiwabara K, Oyama T, Kuwano H. Synergistic decline in expressions of p73 and p21 with invasion in esophageal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 612-617
- 9 Güner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dörken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 2003; 103: 445-454
- 10 王言飞, 刘玉芝, 李蓬娜. P21蛋白在食管鳞癌中表达的临床意义. 实用诊断与治疗杂志 2008; 22: 108-111
- 11 Bahnassy AA, Zekri AR, Abdallah S, El-Shehaby AM, Sherif GM. Human papillomavirus infection in Egyptian esophageal carcinoma: correlation with p53, p21, mdm2, C-erbB2 and impact on survival. *Pathol Int* 2005; 55: 53-62
- 12 Ishida M, Morita M, Saeki H, Ohga T, Sadanaga N, Watanabe M, Kakeji Y, Maehara Y. Expression of p53 and p21 and the clinical response for hyperthermochemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res* 2007; 27: 3501-3506
- 13 Zhao N, Huang G, Guo L, Lu SH. ECRG1, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, triggers a senescent program in NIH3T3 cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006; 231: 84-90
- 14 Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. T-type Ca²⁺ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium* 2008; 43: 49-58
- 15 Quereda V, Martinalbo J, Dubus P, Carnero A, Malumbres M. Genetic cooperation between p21Cip1 and INK4 inhibitors in cellular senescence and tumor suppression. *Oncogene* 2007; 26: 7665-7674
- 16 Wall SJ, Zhong ZD, DeClerck YA. The cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4B and p21CIP1 are critical regulators of fibrillar collagen-induced tumor cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2007; 282: 24471-24476

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Foxo3a对胃癌细胞SGC7901凋亡的促进作用

谭小平, 张庆, 朱燕妮, 何长华, 董卫国, 范文

■背景资料

Foxo3a是一种肿瘤抑制因子, 可通过增强GADD45和DDB1的表达, 促使损伤后DNA修复。最近有学者发现在食管癌中, Foxo3a表达水平低的患者对放射治疗的敏感性和预后都很差。

谭小平, 张庆, 朱燕妮, 何长华, 范文, 长江大学附属第一医院消化科 湖北省荆州市 434002

董卫国, 武汉大学人民医院消化科 湖北省武汉市 430060
谭小平, 副主任医师, 主要从事胃癌的基础研究以及胆胰疾病的内镜治疗等方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由谭小平与张庆设计; 研究过程谭小平、张庆及朱燕妮操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由谭小平与何长华提供; 数据分析由范文完成; 本论文写作由谭小平、董卫国及张庆完成。

通讯作者: 董卫国, 主任医师, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化科。dongwg66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-08-04 修回日期: 2009-09-09

接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-10-28

Apoptosis-promoting effects of forkhead box O3a in human gastric cancer SGC7901 cells

Xiao-Ping Tan, Qing Zhang, Yan-Ni Zhu, Chang-Hua He, Wei-Guo Dong, Wen Fan

Xiao-Ping Tan, Qing Zhang, Yan-Ni Zhu, Chang-Hua He, Wen Fan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434002, Hubei Province, China

Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dongwg66@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-04 Revised: 2009-09-09

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the apoptosis-promoting effects of forkhead box O3a (Foxo3a) in human gastric cancer SGC7901 cells and explore molecular mechanisms involved.

METHODS: Foxo3a expression plasmid was introduced into SGC7901 cells via liposome-mediated transfection. Eight hours after transfected cells were cultured in culture medium containing 0.1% fetal bovine serum, apoptosis was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. The expression levels of cleaved caspase-3 and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) were detected by Western blot.

RESULTS: The recombinant Foxo3a expres-

sion plasmid was constructed successfully. The apoptotic rates of SGC7901 cells transfected with 1 and 2 μ g of Foxo3a expression plasmid were $5.8\% \pm 2.3\%$ and $11.1\% \pm 3.4\%$, respectively, significantly higher than those of control cells. The activity of caspase-3 and PARP was significantly higher in transfected cells than in control cells.

CONCLUSION: Foxo3a can promote apoptosis and inhibit proliferation in SGC7901 cells perhaps via upregulation of caspase-3 and PARP activity.

Key Words: Foxo3a; Gastric cancer cell; Apoptosis; Signaling pathway

Tan XP, Zhang Q, Zhu YN, He CH, Dong WG, Fan W. Apoptosis-promoting effects of forkhead box O3a in human gastric cancer SGC7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3092-3095

摘要

目的: 观察转录因子Foxo3a对胃癌细胞SGC7901凋亡的影响, 并初步探讨其促进凋亡的分子机制。

方法: 构建Foxo3a真核表达质粒, 转染培养的胃癌细胞系SGC7901 4-6 h, 在FBS完全培养基培养24 h后, 换成0.1%无血清的培养基中培养8 h, TUNEL染色观察对胃癌细胞凋亡的影响, Western blot检测切割的caspase-3和PARP水平。

结果: 成功构建了Foxo3a真核表达质粒。转染胃癌细胞后, 与对照组相比, 1和2 μ g Foxo3a处理组胃癌细胞凋亡率达到了 $5.8\% \pm 2.3\%$ 和 $11.1\% \pm 3.4\%$, 是对照组的近2和4倍。caspase-3和PARP活性明显增高。

结论: Foxo3a是一种肿瘤抑制因子, 可通过促进caspase-3和PARP的活性来诱导癌细胞凋亡, 从而抑制肿瘤细胞的生长。

关键词: Foxo3a; 胃癌细胞; 细胞凋亡; 信号通路

谭小平, 张庆, 朱燕妮, 何长华, 董卫国, 范文。Foxo3a对胃癌细胞SGC7901凋亡的促进作用。世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3092-3095

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3092.asp>

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

0 引言

Forkhead(Fox)转录因子是2000年才发布统一命名的一个新的蛋白质家族,主要通过转录调控和信号转导途径在动物的生长发育、代谢、细胞周期、凋亡等方面起重要作用。该家族的共同特征是具有一个长110个氨基酸的保守的DNA结合结构域,称为Fox结构域(Forkhead box),折叠成3个 α -螺旋和2个翅膀状的大环结构。Forkhead转录因子目前被分为17个亚家族,他们功能多样,有的目前尚不清楚。其中研究最深入的是O亚家族(FoxO)^[1-2]。目前已知哺乳动物中Foxo蛋白家族有4个成员,即Foxo1, Foxo3a, Foxo4, Foxo6。他们分别由不同的基因编码,并定位于不同的染色体上^[3]。他是一类重要的转录因子,参与细胞周期、DNA损伤后修复、凋亡等多种细胞生物学过程的信号转导及其调控。其中, Foxo3a与肿瘤发生关系密切,如最近有学者发现在食管癌中, Foxo3a表达水平低的患者对放射性治疗的敏感性和预后都很差^[4]。为了研究Foxo3a在肿瘤发生发展中的作用,我们构建了Foxo3a真核表达质粒,并转染胃癌细胞,观察他对胃癌细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 293T, 胃癌细胞SGC7901均用含100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素和50 mg/L链霉素的DMEM培养液中培养, 在50 mL/L CO₂的培养箱中传代生长, 取对数生长期的细胞用于本实验研究。Xho I, BamH I 限制性内切酶购自Promega公司; DNA连接酶购自TaKaRa大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒购自百泰克生物技术公司; 脂质体Lipofectamine 2000[®]购自Invitrogen公司, TUNEL试剂盒购自碧云天公司; BCA蛋白浓度检测试剂盒、ECL发光试剂盒购自Thermo Scientific公司; 所用抗体: Flag抗体, 切割的caspase-3、PARP、 β -actin均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞总RNA的提取和RT-PCR扩增: 常规293T细胞培养, 采用TRIzol试剂, 按说明书提取细胞总RNA。用紫外分光光度计测定其浓度和纯度。以总RNA为模板, 用M-MLV逆转录酶反转录成cDNA再以cDNA为模板PCR扩增人Foxo3a的基因。引物序列为: 上游: 5'-CCGGATATCGG CAGAGGCACCGGCTT-3', 下游: 5'-CGCGGAT CCTCAGCCTGGCACCCA-3'。此引物去掉了基因前的ATG, 可与载体上的Flag融合表达, 并引

入Xho I, BamH I 酶切位点。RCR产物在琼脂糖凝胶中电泳, 在紫外线下切下含目的条带的凝胶, 用DNA回收纯化试剂盒回收。

1.2.2 重组克隆载体的构建和鉴定: 用限制性内切酶Xho I, BamH I 对PCR产物和载体3 \times FLAG-CMV7.0分别进行双酶切反应, 各自获得带有黏性末端的DNA片段, 再分别在琼脂糖凝胶中电泳, 用DNA凝胶回收纯化试剂盒回收纯化并测定浓度。将上述纯化的酶切PCR产物和酶切载体在T4连接酶的作用下作连接反应。连接反应混合物转化*E.coli* DH5 α 感受态细菌, 在含有氨苄青霉素LB平板上生长过夜, 进行抗性筛选。次日挑选阳性克隆菌, 在含有氨苄青霉素液体培养基中培养过夜后, 用质粒小抽试剂盒按说明书操作进行质粒小量提取。然后用内切酶Xho I, BamH I 进行双酶切反应, 琼脂糖凝胶电泳行酶切鉴定。通过鉴定后的菌液由上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.3 细胞转染: 在转染前1 d将1-1.5 $\times 10^6$ 细胞铺于6孔板中, 在37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂、100 mL/L胎牛血清的完全培养基条件下, 培养20 h至细胞完全贴壁, 待细胞生长至占据培养皿底面积的80%以上时, 吸去部分培养基, 留下1 mL。取适量的待转染的质粒, 加入适量无血清OPTI-DMEM培养基使其终体积达200 μ L, 在另一Eppendorf管中加入5 μ L Lipofectamine 2000并用上述DMEM培养基将体积补足至200 μ L, 放置5 min, 将质粒溶液与Lipofectamine 2000溶液轻柔混匀, 于室温放置20 min。将质粒和脂质体混合液400 μ L加入6孔板中, 转染6 h后, 加入培养基1 mL, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养24 h。转染分为3组, 即3 \times Flag空载体组, 1 μ g Foxo3a组和2 μ g Foxo3a组。转染胃癌细胞6 h后, 在100 mL/L胎牛血清完全培养基中继续培养24 h后, 换成1 mL/L胎牛血清培养基培养8 h, 然后进行TUNEL染色或Western blot检测。

1.2.4 细胞凋亡实验: 培养的肿瘤细胞经过适当处理后, 弃去培养基, PBS洗2遍, 加入3%甲醛固定5-10 min, PBS洗2遍。根据TUNEL试剂盒操作说明书检测细胞凋亡。在荧光显微镜下观察照相, 计数凋亡细胞和正常细胞数, 计算凋亡细胞阳性百分率。

1.2.5 Western blot: 肿瘤细胞经过适当处理后, 弃去培养基, 用PBS冲洗细胞2遍, 然后每孔加入适量细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L NaF₃, 1 mmol/L PMSF和Cocktail蛋白酶混合抑制剂), 冰上裂解细胞并收集蛋白。采用BCA法测定细胞裂解液中蛋白的浓度。

■相关报道

Foxo3a可通过多种信号途径引起肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤的发生。在造血细胞中, Foxo3a可以诱导FasL和Fas的表达, 激活FADD-caspase-8凋亡酶体, 活化的caspase-8可依次激活其他胱冬酶。

■创新盘点

本研究成功构建了Foxo3a真核表达质粒,并转染了胃癌细胞SGC7901,发现Foxo3a通过增强caspase-3和PARP活性而促进了肿瘤细胞的凋亡,而Foxo3a促进肿瘤细胞凋亡更深入的分子机制有待于进一步的研究。

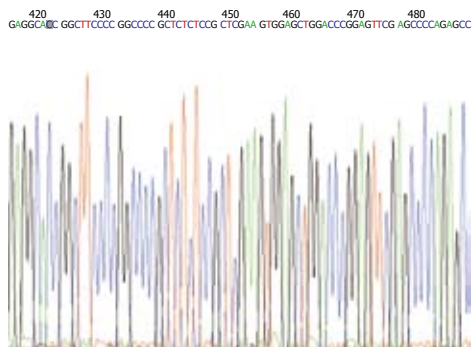


图1 重组质粒Flag-Foxo3a测序的结果。

每个样本取等量的总蛋白,加入适量的 $5\times$ 上样缓冲液,进行10% SDS-PAGE电泳,将蛋白转印到PVDF膜上,然后用合适的一抗和二抗杂交,ECL发光法检测,暗室曝光,图像用蛋白凝胶成像仪分析。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件,计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组克隆载体的鉴定 将重组体和空载体分别进行双酶切反应,经琼脂糖凝胶电泳,并与DNA Marker相比,重组体电泳后显示2条带,相对分子质量较小的条带为预期分子量大小,表明Foxo3a基因已正确克隆到载体。DNA测序结果经与GenBank人Foxo3a基因(序列号:AF032886)比对,序列一致(图1)。

2.2 重组克隆载体在真核细胞中的表达 胃癌细胞转染 $3\times$ Flag空载体无Flag蛋白表达;而转染Foxo3a 1和2 μ g后,有Flag融合蛋白的表达,且随着转染量的增加,蛋白表达也逐渐增加(图2,一抗为Flag抗体)。

2.3 Foxo3a对胃癌细胞凋亡的影响 对照组胃癌细胞凋亡率较低,而转染了Flag-Foxo3a的细胞凋亡明显增加(1和2 μ g处理组胃癌细胞凋亡率达到了 $5.8\%\pm 2.3\%$ 和 $11.1\%\pm 3.4\%$,是对照组的近2倍和4倍),与转染空质粒组相比具有显著性差异($P<0.01$,图3),提示Foxo3a可增强胃癌细胞凋亡。

2.4 Foxo3a对caspase-3和PARP表达的影响 与对照组相比,1和2 μ g 2组细胞中切割的caspase-3和PARP水平呈增高趋势,特别是切割的PARP变化更为明显($P<0.01$,图4)。表明Flag-Foxo3a增高了caspase-3和PARP的活性而促进胃癌细胞凋亡。

3 讨论

Foxo3a是一个重要的转录因子,在肿瘤的发生、发展中起重要作用。最近报道,在吸烟引起

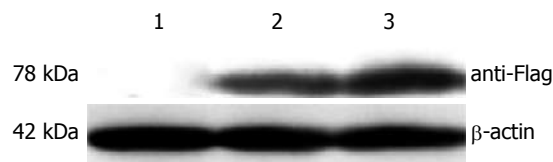


图2 转染Flag-Foxo3a后的蛋白表达。1: $3\times$ Flag空载体组; 2: 1 μ g Foxo3a组; 3: 2 μ g Foxo3a组。

的肺腺癌小鼠模型中,50.7%的小鼠可以检测到Foxo3a的纯合子缺失,说明Foxo3a的丢失促进了吸烟引起的肺腺癌的发生发展^[5]。Foxo3a是一个肿瘤抑制因子,可通过增强GADD45和DDB1的表达,促使损伤后DNA修复^[6]。在急性白血病中往往有混合谱系白血病(mixed lineage leukemia, MLL)基因的重排,包括易位、缺失和重复。MLL基因最容易易位到Foxo3a基因的附近,获得强的Foxo3a蛋白转录激活域,使其控制的基因表达明显增强,而正常的Foxo3a蛋白不能表达,导致其肿瘤抑制作用丧失^[7]。Foxo3a蛋白可通过上调P27Kip1和下调Cyclin D抑制细胞周期,在一些肿瘤中,PTEN肿瘤抑制因子失活,使PI3K/Akt活性增强而抑制Foxo3a的活性,从而使其抑制细胞周期的作用减弱,有助于肿瘤的发展^[8]。

Foxo3a可通过多种信号途径引起肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤的发生。在造血细胞中,Foxo3a可以诱导FasL和Fas的表达,激活FADD-caspase-8凋亡酶体,活化的caspase-8可依次激活其他胱冬酶^[9]。在吸烟导致的肺腺癌中,Foxo3a活性常常丢失。在用尼古丁衍生物NNK诱导细胞癌变前,Foxo3a活性往往增强,使SMAD4, KLF-4, LEF-1等54种与凋亡有关的基因的表达增加^[10]。在紫杉醇敏感的乳腺癌中,抗癌药紫杉醇增强JNK的活性,导致AKT抑制,Foxo3a的活性增强,诱导凋亡促进因子Bim的表达^[11]。而这些都是与凋亡有关的因子含量增加或活性增强,一般是通过激活死亡受体依赖性信号通路和线粒体依赖性信号通路诱发caspase级联反应,最终激活caspase-3和PARP。caspase-3和PARP是发挥凋亡的最终执行者,进而抑制DNA的修复并启动DNA的降解,导致细胞凋亡^[12]。

Foxo3a转录因子活性在多种水平上受到调节,包括基因表达水平、翻译后修饰、蛋白质稳定性等多个层次^[13]。其中磷酸化和去磷酸化修饰在调节Foxo3a蛋白的亚细胞定位及其转录活性中起重要作用。如10%的血清可激活AKT等多个信号途径,使Foxo3a磷酸化而出细胞核,抑制其转录活性^[14]。为了使其以活性形式存在,我们

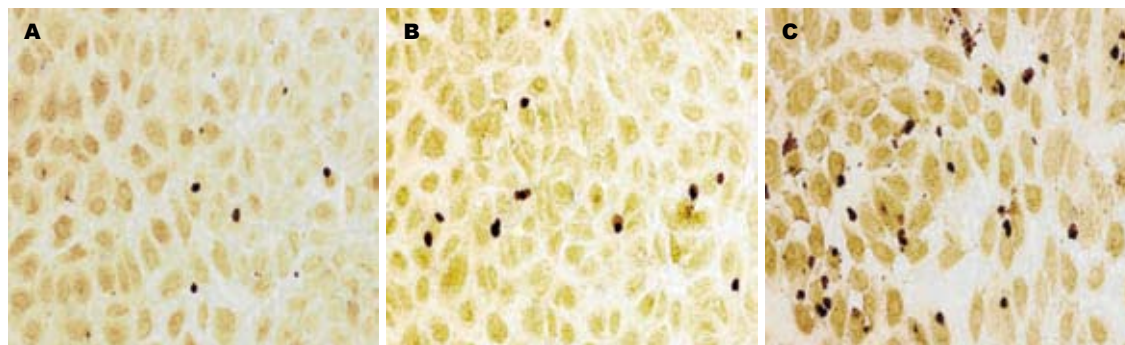


图 3 转染Flag-Foxo3a后的细胞凋亡. A: 3 × Flag空载体组; B: 1 μg Foxo3a组; C: 2 μg Foxo3a组.

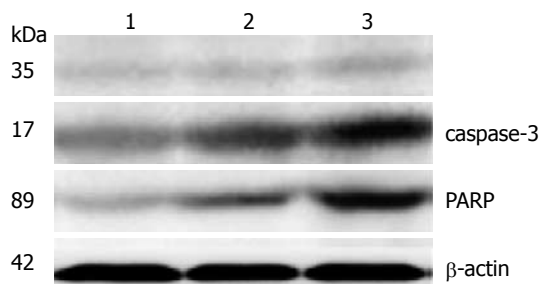


图 4 转染Flag-Foxo3a后, 活性的caspase-3和PARP表达. 1: 3 × Flag空载体组; 2: 1 μg Foxo3a组; 3: 2 μg Foxo3a组.

在胃癌细胞转染了Foxo3a后, 换成0.1% FBS的培养基中培养. 结果表明活性形式的Foxo3a可使caspase-3和PARP活性增强, 胃癌细胞凋亡率明显增加, 说明Foxo3a可通过caspase-3和PARP活性增强而引起肿瘤细胞凋亡^[15]. Radisavljevic报道一氧化氮合酶抑制剂可以使人乳腺癌细胞株T47D凋亡明显增加, 其具体机制可能是一氧化氮合酶抑制剂使Foxo3a 32位上的苏氨酸发生磷酸化, 激活了Rho激酶而导致细胞凋亡^[16].

总之, 我们成功构建了Foxo3a真核表达质粒, 并转染了胃癌细胞SGC7901, 发现Foxo3a通过增强caspase-3和PARP活性而促进了肿瘤细胞的凋亡, 而Foxo3a促进肿瘤细胞凋亡更深入的分子机制有待于进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000; 14: 142-146
- 2 Arden KC, Biggs WH 3rd. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch Biochem Biophys* 2002; 403: 292-298
- 3 Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117: 421-426
- 4 Chen MF, Fang FM, Lu CH, Lu MS, Chen WC, Lee KD, Lin PY. Significance of nuclear accumulation of

- 5 Foxo3a in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71: 1220-1229
- 6 Herzog CR, Blake DC Jr, Mikse OR, Grigoryeva LS, Gundermann EL. FoxO3a gene is a target of deletion in mouse lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2009; 22: 837-843
- 7 Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24: 7410-7425
- 8 Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 352-360
- 9 Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 292-297
- 10 Behzad H, Jamil S, Denny TA, Duronio V. Cytokine-mediated FOXO3a phosphorylation suppresses FasL expression in hemopoietic cell lines: investigations of the role of Fas in apoptosis due to cytokine starvation. *Cytokine* 2007; 38: 74-83
- 11 Blake DC Jr, Mikse OR, Freeman WM, Herzog CR. FOXO3a elicits a pro-apoptotic transcription program and cellular response to human lung carcinogen nicotine-derived nitrosaminoketone (NNK). *Lung Cancer* 2009 Apr 18. [Epub ahead of print]
- 12 Sinters A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, Burgering BM, Coombes RC, Lam EW. Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res* 2006; 66: 212-220
- 13 Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Stromberg PE, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med* 2002; 30: 195-201
- 14 韩向晖, 季光. 肝脏糖异生的分子机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3659-3665
- 15 Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 360-368
- 16 龙辉, 吴清明, 马松林. Midkine和Caspase-3在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 4015-4019
- 17 Radisavljevic Z. Nitric oxide suppression triggers apoptosis through the FKHL1 (FOXO3A)/ROCK kinase pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer* 2003; 97: 1358-1363

同行评价

本研究通过观察转录因子Foxo3a对胃癌细胞SGC7901的凋亡作用, 证实Foxo3a是一种肿瘤抑制因子, 设计合理, 有一定临床应用价值.

人源乳酸杆菌对幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞炎症反应的调节及可能通路

邓学杰, 马洪升, 余倩

■背景资料

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤以及胃癌的发生密切相关, 他与上皮细胞黏附后, 通过一系列信号转导, 引起细胞骨架重排及细胞内信号传导系统变化, 导致一系列炎症反应。长期以来, 乳酸杆菌被认为是维持胃内生态的主要承担者。目前对于乳酸杆菌作用机制的研究主要集中在其对 *H. pylori* 的黏附抑制、体外抑制和免疫调节等宏观水平上, 深入到细胞和分子水平阐述其作用机制的研究很少。

邓学杰, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

余倩, 四川大学华西公共卫生学院 四川省成都市 610041
邓学杰, 2007年四川大学华西医院消化内科硕士, 主要从事胃内微生态方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由邓学杰与马洪升共同设计; 研究过程由邓学杰、马洪升及余倩操作完成; 数据分析由邓学杰、马洪升及余倩共同完成; 本论文写作由邓学杰与马洪升共同完成。

通讯作者: 马洪升, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科. mahongsheng63@163.com

电话: 028-85422296

收稿日期: 2009-08-04 修回日期: 2009-09-21

接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-28

Human-derived *Lactobacillus Lac15* inhibits *Helicobacter pylori*-induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and interleukin-8 secretion in human gastric cancer SGC7901 cells

Xue-Jie Deng, Hong-Sheng Ma, Qian Yu

Xue-Jie Deng, Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Qian Yu, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mahongsheng63@163.com

Received: 2009-08-04 Revised: 2009-09-21

Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-28

Abstract

Aim: To investigate the effects of human-derived *Lactobacillus Lac15* on p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation and interleukin-8 (IL-8) secretion in human gastric cancer SGC7901 cells infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

METHODS: SGC7901 cells were divided into four groups: normal control group, *H. pylori* infection group, SB203580 intervention group, and *Lactobacillus* intervention group. The phos-

phorylation level of p38 MAPK in SGC7901 cells infected with *H. pylori* was evaluated by immunocytochemistry. The release of IL-8 in SGC7901 cells was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The phosphorylation level of p38 MAPK (IA: 1.90 ± 0.36 vs 14.01 ± 1.12 , $P < 0.01$) and IL-8 secretion (27.2616 ± 0.27 ng/L vs 46.3691 ± 0.33 ng/L, $P < 0.01$) were significantly higher in SGC7901 cells infected with *H. pylori* than in normal control cells. After intervention with *Lactobacillus Lac15* at doses of 3×10^{11} , 3×10^{10} and 3×10^9 cfu/L, both the phosphorylation level of p38 MAPK (IA: 4.61 ± 1.13 , 6.11 ± 0.19 and 8.25 ± 0.56 vs 14.01 ± 1.12 , respectively; all $P < 0.01$) and IL-8 secretion (42.3209 ± 0.24 ng/L, 42.1046 ± 0.23 ng/L and 43.4636 ± 0.25 ng/L vs 46.3691 ± 0.33 ng/L, respectively; all $P < 0.05$ or $P < 0.01$) decreased significantly in SGC7901 cells infected with *H. pylori*.

CONCLUSION: *H. pylori* infection can induce IL-8 secretion perhaps via a mechanism associated with promoting p38MAPK phosphorylation. Human-derived *Lactobacillus Lac15* can inhibit p38MAPK phosphorylation and thus decrease IL-8 secretion.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *Lactobacillus*; Inflammation; p38 mitogen-activated protein kinase; Interleukin-8

Deng XJ, Ma HS, Yu Q. Human-derived *Lactobacillus Lac15* inhibits *Helicobacter pylori*-induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and interleukin-8 secretion in human gastric cancer SGC7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3096-3100

摘要

目的: 探讨人源乳酸杆菌对 *H. pylori* 诱导 SGC7901 细胞分泌 IL-8 及 p38MAPK 磷酸化水平的影响。

方法: 实验分为空白对照组、*H. pylori* 刺激组、SB203580 干预 *H. pylori* 刺激组和 *Lac15* 干

■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; 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

预 $H. pylori$ 刺激组. 采用免疫细胞化学法观察该人源乳酸杆菌 $Lac15$ 对 $H. pylori$ 致SGC7901细胞p38MAPK磷酸化的影响. ELISA法观察该人源乳酸杆菌对 $H. pylori$ 致SGC7901细胞分泌IL-8的影响.

结果: $H. pylori$ 能诱导细胞的p38MAPK磷酸化水平增高($IA: 1.90 \pm 0.36$ vs 14.01 ± 1.12 , $P < 0.01$)以及IL-8分泌量明显增高(27.2616 ± 0.27 ng/L vs 46.3691 ± 0.33 ng/L, $P < 0.01$). 预先使用一定浓度(3.0×10^{11} cfu/L, 3.0×10^{10} cfu/L, 3.0×10^9 cfu/L)的人源乳酸杆菌 $Lac15$ 干预后, p38MAPK磷酸化水平明显降低($IA: 4.61 \pm 1.13$, 6.11 ± 0.19 , 8.25 ± 0.56 vs 14.01 ± 1.12 , 均 $P < 0.01$), IL-8分泌量明显降低(42.3209 ± 0.24 ng/L, 42.1046 ± 0.23 ng/L, 43.4636 ± 0.25 ng/L vs 46.3691 ± 0.33 ng/L, 均 $P < 0.05$ 或 0.01), 与 $H. pylori$ 刺激组比较, 具有统计学意义.

结论: p38MAPK磷酸化参与 $H. pylori$ 诱导的SGC7901细胞分泌IL-8, 人源乳酸杆菌 $Lac15$ 可能通过抑制p38MAPK磷酸化途径抑制IL-8的分泌, 从而抑制炎症反应.

关键词: 幽门螺杆菌; 乳酸杆菌; 炎症; p38MAPK; 白介素-8

邓学杰, 马洪升, 余倩. 人源乳酸杆菌对幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞炎症反应的调节及可能通路. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3096-3100

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3096.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, $H. pylori$)与慢性胃炎, 消化性溃疡, 胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤以及胃癌的发生密切相关^[1]. $H. pylori$ 与上皮细胞黏附后, 然后通过发生一系列信号转导机制, 进而引起细胞骨架重排及细胞内信号传导系统变化, 引发IL-8的分泌, 使中性粒细胞持续激活和进入胃黏膜, 进而导致一系列炎症反应. 长期以来, 乳酸杆菌作为胃内的优势菌群, 被认为是维持胃内微生态的主要承担者. 目前对于乳酸杆菌作用机制的研究主要集中在对 $H. pylori$ 的黏附抑制、体外抑杀和免疫调节等宏观水平上, 深入到细胞和分子水平阐述其作用机制的研究很少. 针对人体所获取的乳酸杆菌具有安全性和黏附性好等特点, 研究筛选出的具有较强抑制 $H. pylori$ 黏附细胞能力的一株人源乳酸杆菌 $Lac15$ 对 $H. pylori$ 诱导SGC7901细胞炎症的

调节作用, 通过观察该人源乳酸杆菌对 $H. pylori$ 诱导SGC7901细胞p38MAPK磷酸化水平及IL-8分泌的影响来探讨其可能的作用机制, 从而筛选出可用于治疗的菌株.

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌SGC7901细胞、 $H. pylori$ 悉尼株SS1(VacA+, CagA+), 冻存品由四川大学公共卫生学院医检教研室提供. 人源乳酸杆菌 $Lac15$ (唾液乳酸杆菌, 取自人胃肠道并经一定筛选后的实验菌株, 经法国梅里埃公司API50CHL鉴定培养基的鉴定), 由四川大学公共卫生学院医检教研室提供. 抗P-p38MAPK抗体, 购自武汉博士德生物工程有限公司. p38MAPK通路阻断剂SB203580母液, 购自晶美生物(Alexis公司). 免疫组织化学染色SP Kit-9707超敏试剂盒, 购自福州迈新生物技术开发有限公司. 人IL-8定量ELISA试剂盒, 购自上海森雄科技实业有限公司.

1.2 方法 $H. pylori$ SS1解冻后涂于布氏平板, 置于厌氧培养箱中微需氧和37℃环境培养, 72 h后观察细菌生长情况, 经革兰染色光镜下观察菌体形态、染色特点和尿素酶试验鉴定证实为 $H. pylori$, 分光光度计调浓度为 1.0×10^{11} cfu/L. 人源乳酸杆菌 $Lac15$ 厌氧培养, 在对数生长期分别调浓度为 3.0×10^{12} 、 3.0×10^{11} 、 3.0×10^{10} 、 3.0×10^9 cfu/L, 分别以纯1640重悬, 使用前配制. SGC7901细胞培养调浓度为 2.5×10^8 /L并种植6孔板, 每孔2 mL, 分为SGC7901空白对照组、 $H. pylori$ 刺激组、SB203580干预 $H. pylori$ 刺激组和 $Lac15$ 干预 $H. pylori$ 刺激组. 37℃ CO₂温箱孵育24 h后PBS洗3次, 空白对照组加2 mL纯1640培养液, $H. pylori$ 刺激组加SS1悬液0.3 mL(3.0×10^7 cfu/孔), SB203580干预 $H. pylori$ 刺激组加入SB203580 1 mL作用1 h后, 再加入SS1悬液0.3 mL, $Lac15$ 干预组分别加细菌悬液1 mL, 37℃ CO₂温箱孵育1 h后, 再加入SS1悬液0.3 mL, 各组以纯1640培养液补充使体积均至2 mL. $H. pylori$ 作用3 h后收集上清, 离心, -70℃冰箱冻存, 以备检测IL-8水平. 各组爬片PBS洗3次后用40 g/L多聚甲醛固定, 然后用SP(Streptavidin)免疫组织化学染色法检测p38MAPK磷酸化水平的表达. 取出上述冻存的上清液, 用ELISA检测试剂盒检测各组上清液内的IL-8含量. 采用双抗体夹心ABC-ELISA法. 以标准品1000、500、250、125、62.5、32、16、0 ng/L的吸光度(A)值在半对数纸上作图, 画出标准曲线. 根据样品A值在

■ 研发前沿

传统的 $H. pylori$ 根治法主要为质子泵抑制剂加两种抗生素的三联疗法, 但随之产生的耐药菌株增多, 使疗效下降, 且药物的一些不良反应患者不能耐受, 并可能出现抗生素相关疾病. 从微生态角度出发, 在体外筛选出具有较强抑制 $H. pylori$ 黏附胃上皮细胞能力的人源乳酸杆菌, 可以开发相关的微生态制剂及保健食品, 从而开辟新的治疗领域.

■创新盘点

本文主要采用体外筛选出的人源乳酸杆菌*Lac15*, 通过其对*H pylori*诱导SGC7901细胞p38MAPK磷酸化水平及IL-8分泌的影响来探讨其可能的作用机制及阻断通路, 从而筛选出可用于治疗的菌株。

表 1 各组细胞p38MAPK阳性水平及IL-8分泌量 ($\times 10^3$)

分组	p38MAPK磷酸化水平(I4值)	IL-8浓度($\mu\text{g/L}$)
空白对照组	1.90 \pm 0.36	27.2616 \pm 0.27
<i>H pylori</i> 刺激组	14.01 \pm 1.12 ^b	46.3691 \pm 0.33 ^b
SB203580干预组	13.81 \pm 2.10 ^b	40.7577 \pm 0.28 ^b
<i>Lac15</i> (3.0×10^{12} cfu/L)干预组	12.81 \pm 0.99 ^b	46.5894 \pm 1.83 ^b
<i>Lac15</i> (3.0×10^{11} cfu/L)干预组	4.61 \pm 1.13 ^{ad}	42.3209 \pm 0.24 ^{ad}
<i>Lac15</i> (3.0×10^{10} cfu/L)干预组	6.11 \pm 0.19 ^{bd}	42.1046 \pm 0.23 ^{bd}
<i>Lac15</i> (3.0×10^9 cfu/L)干预组	8.25 \pm 0.56 ^{bd}	43.4636 \pm 0.25 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs *H pylori*刺激组。

该曲线图上查出相应人IL-8含量。

统计学处理 用SPSS12.0软件进行统计分析。数据以mean \pm SD表示, 计量资料主要用 t 检验, 3组以上资料比较用单因素方差分析(One-way ANOVA法), 两两比较采用SNK法, 与对照组比较采用Dunnett法。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 时, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学检测各组p38MAPK阳性水平 各组每张爬片随机选取3个视野照相, 每张照片使用Image-Pro Plus 5.0软件测量积分吸光度(I4)值, 以照片I4值表示各组P-p38MAPK阳性水平。 *H pylori*刺激组I4值明显高于空白对照组 (I4: 14.01 \pm 1.12 vs 1.90 \pm 0.36, $P < 0.01$), 具有统计学意义。 *Lac15*(3.0×10^{12} cfu/L)干预组与 *H pylori*刺激组I4值比较(12.81 \pm 0.99 vs 14.01 \pm 1.12, $P > 0.05$), 无统计学意义。 *Lac15*(3.0×10^{11} cfu/L)、 *Lac15*(3.0×10^{10} cfu/L)、 *Lac15*(3.0×10^9 cfu/L)干预组与 *H pylori*刺激组比较I4值明显降低(I4: 14.01 \pm 1.12 vs 4.61 \pm 1.13, 14.01 \pm 1.12 vs 6.11 \pm 0.19, 14.01 \pm 1.12 vs 8.25 \pm 0.56, $P < 0.01$)具有统计学意义。 *Lac15*(3.0×10^{11} cfu/L)干预组与 *Lac15*(3.0×10^9 cfu/L)干预组比较, I4值降低(4.61 \pm 1.13 vs 8.25 \pm 0.56, $P < 0.05$)具有统计学意义(图1, 表1)。

2.2 ELISA法检测IL-8分泌量结果 与空白对照组相比较, *H pylori*刺激后, SGC7901细胞IL-8分泌量明显增加(46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$ vs 27.2616 \pm 0.27 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), 具有统计学意义。预先使用p38MAPK通路阻断剂SB203580的细胞在 *H pylori*刺激后, IL-8分泌量较 *H pylori*刺激组明显减少(40.7577 \pm 0.28 $\mu\text{g/L}$ vs 46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)具有统计学意义。预先与浓度为 3.0×10^{11}

cfu/L, 3.0×10^{10} cfu/L, 3.0×10^9 cfu/L的 *Lac15* 乳酸杆菌共育的SGC7901细胞在 *H pylori*刺激后, IL-8的分泌量较 *H pylori*刺激组减少(46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$ vs 42.3209 \pm 0.24 $\mu\text{g/L}$, 46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$ vs 42.1046 \pm 0.23 $\mu\text{g/L}$, 46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$ vs 43.4636 \pm 0.25 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$ 或0.01), 具有统计学意义。预先与浓度为 3.0×10^{12} cfu/L的 *Lac15* 共育的细胞在 *H pylori*刺激后, IL-8分泌量与 *H pylori*刺激组相比较(46.3691 \pm 0.33 $\mu\text{g/L}$ vs 46.5894 \pm 1.83 $\mu\text{g/L}$, $P > 0.05$), 无统计学意义(图2, 表1)。

3 讨论

*H pylori*是慢性胃炎, 消化性溃疡, 胃癌, MALT淋巴瘤等疾病的重要致病因素。世界卫生组织和抗癌协会已肯定 *H pylori*为致癌物^[2]。 *H pylori*感染后可导致胃黏膜细胞变性、坏死, 炎细胞浸润, 进而造成胃黏膜屏障损害。 *H pylori*感染的先决条件是黏附, *H pylori*与胃黏膜上皮的接触黏附是活动性炎症反应的细胞学机制的关键一步。然后胃上皮细胞发生细胞骨架重组、酪氨酸磷酸化, 进而激活MAPK, 诱导前炎性细胞因子如IL-8的生成。 *H pylori*感染引起胃黏膜强烈的中性粒细胞反应造成组织损伤被认为是相关疾病的机制之一, 其中IL-8对特异性和非特异性的免疫反应细胞具有强烈的趋化作用, IL-8为一种多源性的细胞因子, 在宿主免疫防御系统及炎症反应中起重要作用, 尤其是对中性粒细胞的趋化和激活作用, 并参与中性粒细胞与内皮细胞黏附过程的调节, 诱导细胞发生变形、脱颗粒, 释放氧自由基、白三烯和各种蛋白酶, 从而导致细胞膜变性坏死, 溶酶体破裂, 进一步导致细胞组织损伤。IL-8在 *H pylori*感染的胃黏膜中强烈表达, 使中性粒细胞持续激活和进入胃黏膜^[3]。Keates *et al*^[4]发现一株临床分离培养

■应用要点

本文通过探讨人源乳酸杆菌*Lac15*可能的作用机制, 可以开发相关的微生态制剂及保健食品, 从而开辟新的治疗领域。

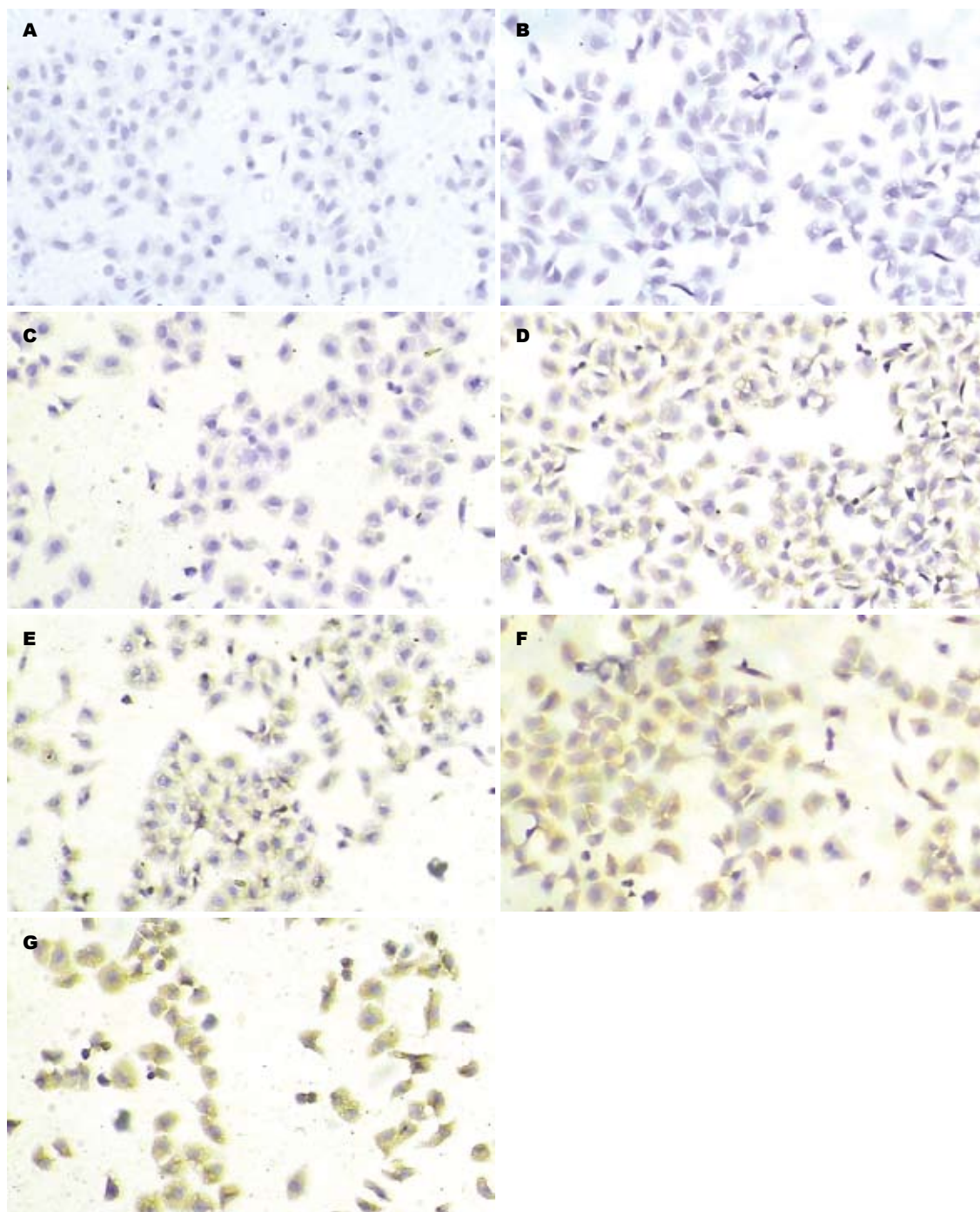


图 1 各组细胞p38MAPK阳性水平. A: 空白对照组; B: *Lac15*(3.0×10^{11} cfu/L)干预组; C: *Lac15*(3.0×10^{10} cfu/L)干预组($\times 400$); D: *Lac15*(3.0×10^9 cfu/L)干预组($\times 400$); E: *Lac15*(3.0×10^{12} cfu/L)干预组; F: *H. pylori*刺激组; G: SB203580干预组($\times 400$).

■名词解释

胃内微生态: 微生态系统是指在一定结构的空间内, 人体正常微生物群与人体组织、细胞及其基因相互交流的同一生物系统, 主要包括口腔、胃肠道、泌尿、皮肤等系统. 人体胃肠道中生活的细菌大约有 10^{14} 个, 由厌氧菌、兼性厌氧菌、需氧菌等300-500种微生物组成, 他们形成一个复杂的微生态系统, 对人的健康有重要影响.

的*H. pylori*菌株显著增强了p38MAPK在AGS胃上皮细胞的活性, 因此认为p38MAPK可能与*H. pylori*刺激IL-8分泌的机制相关. Yamada *et al*^[5]对胃上皮细胞MKN28的研究也表明, p38MAPK抑制剂可以明显降低*H. pylori*诱导其分泌IL-8水平. 国内也有报道得出, *H. pylori*依赖p38MAPK信号通路诱导胃上皮细胞IL-8的分泌^[6]. 具体有关*H. pylori*诱导胃上皮细胞表达分泌IL-8的细胞内信号转导通路尚未达成共识,

究竟何种通路起主要作用, 还需进一步研究.

乳酸杆菌除通过抑制*H. pylori*黏附上皮细胞, 分泌乳酸及抗菌肽类物质等, 尚可以通过调节细胞因子来抑制*H. pylori*的致病作用. 乳酸杆菌能改善胃肠道的炎症, Kabir *et al*^[7]发现*L. salivarius* WB 1004株不仅能抑制*H. pylori*与动物和人胃上皮细胞黏附而且能减少IL-8的分泌, 从而降低胃黏膜的炎症反应. 但乳酸杆菌自身几乎不引起上皮细胞分泌IL-8, 也不引起胃内病理改

■同行评价

本文研究了体外人源乳酸杆菌对 *H pylori* 诱导胃上皮细胞炎症反应的调节及可能通路, 方法合理, 设计科学, 具有较好的可读性。

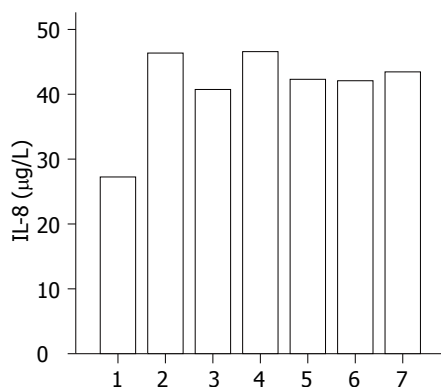


图2 各组细胞IL-8分泌量的比较. 1: 空白对照组; 2: *H pylori* 刺激组; 3: SB203580干预组; 4: *Lac15* (3.0×10^{12} cfu/L) 干预组; 5: *Lac15* (3.0×10^{11} cfu/L) 干预组; 6: *Lac15* (3.0×10^{10} cfu/L) 干预组; 7: *Lac15* (3.0×10^9 cfu/L) 干预组。

变. 但目前尚很难确定特定的乳酸杆菌株在炎症反应中的作用地位, 文献报道尚有分歧^[8]. Blaster 于1998^[9]和2000^[10]年报道认为无论从生物进化、致病性还是与机体的相互关系上, *H pylori* 都可以称得上是胃内的原籍菌. *H pylori* 在胃内诱发相关疾病, 不可避免地要受到胃内微环境的影响. 当胃窦部的 *H pylori* 密度小于 10^5 时, 并不能导致胃及十二指肠溃疡的形成, *H pylori* 并不具有严格的致病性与非致病性的区别, 胃炎的严重程度和活跃度与胃内细菌数量具有相关性^[11]. 我们通过采用p38MAPK通路阻断剂SB203580, 阻断p38MAPK磷酸化途径, 观察其对 *H pylori* 刺激后细胞IL-8分泌的影响, 在预先使用SB203580干预后, IL-8分泌量有减少, 与 *H pylori* 刺激组相比之下具有统计学差异. 同样, 我们选取筛选出的人源乳酸杆菌 *Lac15* 的不同浓度进行干预, IL-8的分泌量根据浓度的不同而有所变化, 其中, *Lac15* (3.0×10^{11} cfu/L) 干预组及 *Lac15* (3.0×10^{10} cfu/L) 干预组的IL-8分泌量明显减少, 与 *H pylori* 刺激组相比有统计学意义.

H pylori 可能通过激活p38MAPK磷酸化途径进而导致IL-8分泌, 致炎症反应的发生. SB203580能阻断p38MAPK通路从而减少IL-8的分泌. 浓度为 3.0×10^{11} cfu/L 和 3.0×10^{10} cfu/L 的人源乳酸杆菌 *Lac15* 可能通过抑制这一通路进而

减少 *H pylori* 刺激细胞引起的IL-8分泌, 从而减少炎症反应. 值得注意的是, 我们运用较高浓度的人源乳酸杆菌 *Lac15* (3.0×10^{12} cfu/L) 预先干预刺激后, p38MAPK磷酸化水平与 *H pylori* 刺激组比较无明显降低, 且IL-8的分泌量与 *H pylori* 刺激组比较也无明显减少. 一方面说明p38MAPK通路与IL-8分泌的相关性, 另一方面也说明乳酸杆菌作为胃内常驻菌保持适当的比例以维持胃内微生态的平衡才能起到保护作用, 过多或过少都会影响菌群平衡.

4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干临床方面的共识意见. 中华内科杂志 2004; 43: 316-317
- Vandenplas Y. Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol 2000; 6: 20-31
- 王继恒, 刘文忠. 细胞因子基因多态性和幽门螺杆菌相关性疾病. 中华消化杂志 2003; 23: 685-687
- Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997; 113: 1099-1109
- Yamada H, Aihara T, Okabe S. Mechanism for Helicobacter pylori stimulation of interleukin-8 production in a gastric epithelial cell line (MKN 28): roles of mitogen-activated protein kinase and interleukin-1beta. Biochem Pharmacol 2001; 61: 1595-1604
- 徐灿, 李兆申, 许国铭, 屠振兴, 龚燕芳. 幽门螺杆菌依赖丝裂原活化蛋白激酶信号通路诱导SGC7901细胞表达分泌白介素-8. 胃肠病学 2004; 9: 68-72
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. Gut 1997; 41: 49-55
- Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol 2002; 20: 508-515
- Blaser MJ. Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. Gut 1998; 43: 721-727
- Rothenbacher D, Blaser MJ, Bode G, Brenner H. Inverse relationship between gastric colonization of Helicobacter pylori and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. J Infect Dis 2000; 182: 1446-1449
- Khulusi S, Mendall MA, Patel P, Levy J, Badve S, Northfield TC. Helicobacter pylori infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. Gut 1995; 37: 319-324

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

肝硬化时肝窦毛细血管化形成机制

杨照新, 韩德五, 邢桦云, 刘慧荣, 燕子

杨照新, 海南医学院药物安全性评价研究中心 海南省海口市 571101

韩德五, 邢桦云, 刘慧荣, 燕子, 山西医科大学 山西省太原市 030001

杨照新, 硕士, 助理研究员, 主要从事肝纤维化形成机制的研究。
作者贡献分布: 杨照新、韩德五及邢桦云对此文所作贡献均等;
此课题由杨照新与韩德五设计; 研究过程由杨照新与邢桦云操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由邢桦云提供; 数据分析由杨照新完成; 本论文写作由杨照新、燕子及刘慧荣完成。

通讯作者: 杨照新, 助理研究员, 571101, 海南省海口市, 海南医学院药物安全性评价研究中心。 yangzhaoxinchang@yahoo.com.cn
电话: 0898-66961102

收稿日期: 2009-09-08 修回日期: 2009-10-08

接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-10-28

Pathogenesis of hepatic sinusoidal capillarization in hepatic cirrhosis

Zhao-Xin Yang, De-Wu Han, Hua-Yun Xing, Hui-Rong Liu, Zi Yan

Zhao-Xin Yang, Center for Drug Safety Evaluation and Research, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China

De-Wu Han, Hua-Yun Xing, Hui-Rong Liu, Zi Yan, Institute of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Zhao-Xin Yang, Center for Drug Safety Evaluation and Research, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China. yangzhaoxinchang@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-08 Revised: 2009-10-08

Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the role of intestinal endotoxemia in the pathogenesis of hepatic sinusoidal capillarization in hepatic cirrhosis and explore possible mechanisms involved.

METHODS: Forty male Wistar rats were randomly divided into two groups: control group ($n = 8$) and experimental group ($n = 32$). Hepatic cirrhosis was induced in rats using carbon tetrachloride (CCl_4) and alcohol. Rats in the experimental group were killed at weeks 2, 4, 6 and 8, respectively, while those in the control group were executed at the beginning of the experiment. The portal venous pressure (PVP) was measured by cranial mesenteric vein cannulation. The degree of hepatic cirrhosis was

evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining and Van Gieson's (VG) staining. The expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), laminin (LN) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the liver was detected by immunohistochemistry. The dynamic changes in the levels of endotoxin, alanine transferase (ALT) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in plasma were monitored using various kits. The defenestration of liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) was observed using a scanning electron microscope.

RESULTS: In the experimental group, plasma ALT level reached its peak at week 2 (57.84 ± 7.57 IU/L) and thereafter decreased. Plasma endotoxemia level gradually increased from week 2 to 6, but slightly decreased at week 8. Plasma TNF- α level increased from week 2 to 4, slightly decreased at week 6, and increased again at week 8. At all time points, the values of the above parameters were significant higher in the experimental group than in the control group (all $P < 0.05$). PVP showed the same tendency as TNF- α level, increasing from week 2 to 4, slightly decreasing at week 6, and increasing again at week 8. LSEC fenestration gradually shrank, lessened and disappeared from week 0 to 8. The expression levels of LN and TGF- β 1 increased from week 0 to 8, significantly higher than those in the control group or at the previous time points in the same group (all $P < 0.05$). The expression level of α -SMA increased from week 0 to 6, but slightly decreased at week 8.

CONCLUSION: Intestinal endotoxemia occurs in hepatic cirrhosis rats, which can increase the synthesis of TNF- α , TGF- β 1 and LN and promote LSEC defenestration. Intestinal endotoxemia may be indirectly involved in the development of hepatic sinusoidal capillarization.

Key Words: Intestinal endotoxemia; Hepatic sinusoidal capillarization; Portal hypertension

Yang ZX, Han DW, Xing HY, Liu HR, Yan Z. Pathogenesis of hepatic sinusoidal capillarization in hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3101-3108

■背景资料

肝窦毛细血管化是肝纤维化及硬化过程中的一个特征性病变, 而肝硬化又往往伴有内毒素血症, 这种肠源性内毒素血症对肝窦毛细血管化形成有何影响, 有待深入研究。

■同行评议者

陈耀凯, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

■研究前沿

肠源性内毒素血症是肝硬化进一步发生发展的重要促进因素,如何有效地控制肠源性内毒素血症的发生是今后研究的重点。

摘要

目的: 探讨肠源性内毒素血症在肝窦毛细血管化形成中的作用及其可能机制。

方法: δ Wistar大鼠40只,完全随机分为模型组($n = 32$)与正常对照组($n = 8$),采用复合因素致肝硬化大鼠模型。模型组分别在饲养第2、4、6、8周末,正常对照组在实验开始时,经肠系膜上静脉末端穿刺测PVP,肝脏HE、VG染色,肝脏免疫组织化学染色观察 α -SMA、LN、TGF- β 1的动态表达,测定外周血中的内毒素、TNF- α 、ALT的动态变化,采用扫描电镜观察肝窦内皮细胞失窗孔情况。

结果: 模型组ALT在第2周末达到高峰(57.84 ± 7.57 IU/L),随后逐渐下降;内毒素在第2、4、6周末,各点呈递增趋势,到第8周末时略有下降;TNF- α 在第2、4周末呈递增趋势,到第6周末时略有下降,第8周末时又逐渐升高,但各点组均较对照组明显升高(均 $P < 0.05$);模型组PVP在第2、4周末,各点呈递增趋势,到第6周末时略有下降,第8周末时又逐渐升高;肝窦内皮细胞扫描电镜结果示随着肝纤维化及硬化程度的加重,窗孔逐渐变小、变少至消失;LN、TGF- β 1免疫组织化学染色结果示随着病变的发展,与对照组和同指标前一时间组相比阳性表达逐渐增强(均 $P < 0.05$)。 α -SMA免疫组织化学染色在第2、4、6周末,阳性表达逐渐增强,到第8周末时略有下降。

结论: 肝硬化大鼠发生了肠源性内毒素血症,其可使TGF- β 1、TNF- α 、LN等合成增多,促进肝窦内皮细胞去窗孔化,间接参与肝窦毛细血管化的形成。

关键词: 肠源性内毒素血症;肝窦毛细血管化;门静脉高压

杨照新, 韩德五, 邢桦云, 刘慧荣, 燕子. 肝硬化时肝窦毛细血管化形成机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3101-3108
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3101.asp>

0 引言

肝窦毛细血管化(hepatic sinusoid capillarization)是肝纤维化(hepatic fibrosis)及肝硬化(hepatic cirrhosis)过程中的一个特征性病变,他的主要特征包括:肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)的去窗孔化、表型的改变和内皮下基底膜的形成,他可以使肝脏微循环的功能发生改变并促进肝纤维化的形成,并且与门静脉高压的形成有密切关系。近年来,肠

源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM)与肝病的关系日益受到重视,有大量的实验证实,在实验性大鼠肝硬化形成过程中往往都伴有IETM,后者又通过过度或持续激活枯否细胞(Kupffer cell, KC)所释放的细胞因子、炎性介质、自由基等,又造成了肝脏“第二次打击”,进一步加重了肝纤维化及硬化的发生^[1]。本研究探讨IETM对肝窦毛细血管化形成的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠40只,体质量200-250 g,由山西医科大学实验动物中心提供。兔抗大鼠层粘连蛋白(laminin, LN),小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),SABC法免疫组织化学试剂盒及DAB显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。兔抗大鼠转化生长因子(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1),购自北京中杉金桥生物技术有限公司。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)放免药盒购自上海海研医学生物技术中心。内毒素(Endotoxin)鲎试剂定量检测试剂盒,购自上海伊华临床医学科技公司。胶原纤维(VG)染色液,购自恒太百盛生物(北京)科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的复制及常规标本的制作: δ Wistar大鼠40只,完全随机分为2组:正常对照组8只,模型组32只。采用复合因素致肝硬化模型的造模方法^[2],实验第1天,皮下注射CCl₄原液,按0.5 mL/100 g体质量计算,以后每隔3 d,皮下注射40%的CCl₄油溶液,按0.3 mL/100 g体质量计算。饲料喂养前2 wk为79.5%玉米面,20%猪油,0.5%胆固醇,从第3周起为99.5%玉米面,0.5%胆固醇,10%-30%饮用乙醇为其唯一饮料。正常对照组在实验开始时,模型组分别于饲养第2、4、6、8周末,各取6只,空腹12 h后称质量,按0.3-0.4 mL/100 g,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,在肠系膜上静脉末端穿刺,并连接U型管,管内注有无菌无热源生理盐水,测定门静脉压力(PVP)。无菌无热源污染条件下经腹主动脉取血,分离血清待检。取部分肝左叶于固定液中固定,石蜡包埋,5 μ m切片,分别行HE、VG、免疫组织化学染色。

1.2.2 肝脏组织形态学观察: 肝组织切片常规HE和VG染色,确定肝纤维化及硬化程度。免疫组织化学染色观察LN、TGF- β 1和 α -SMA动态变

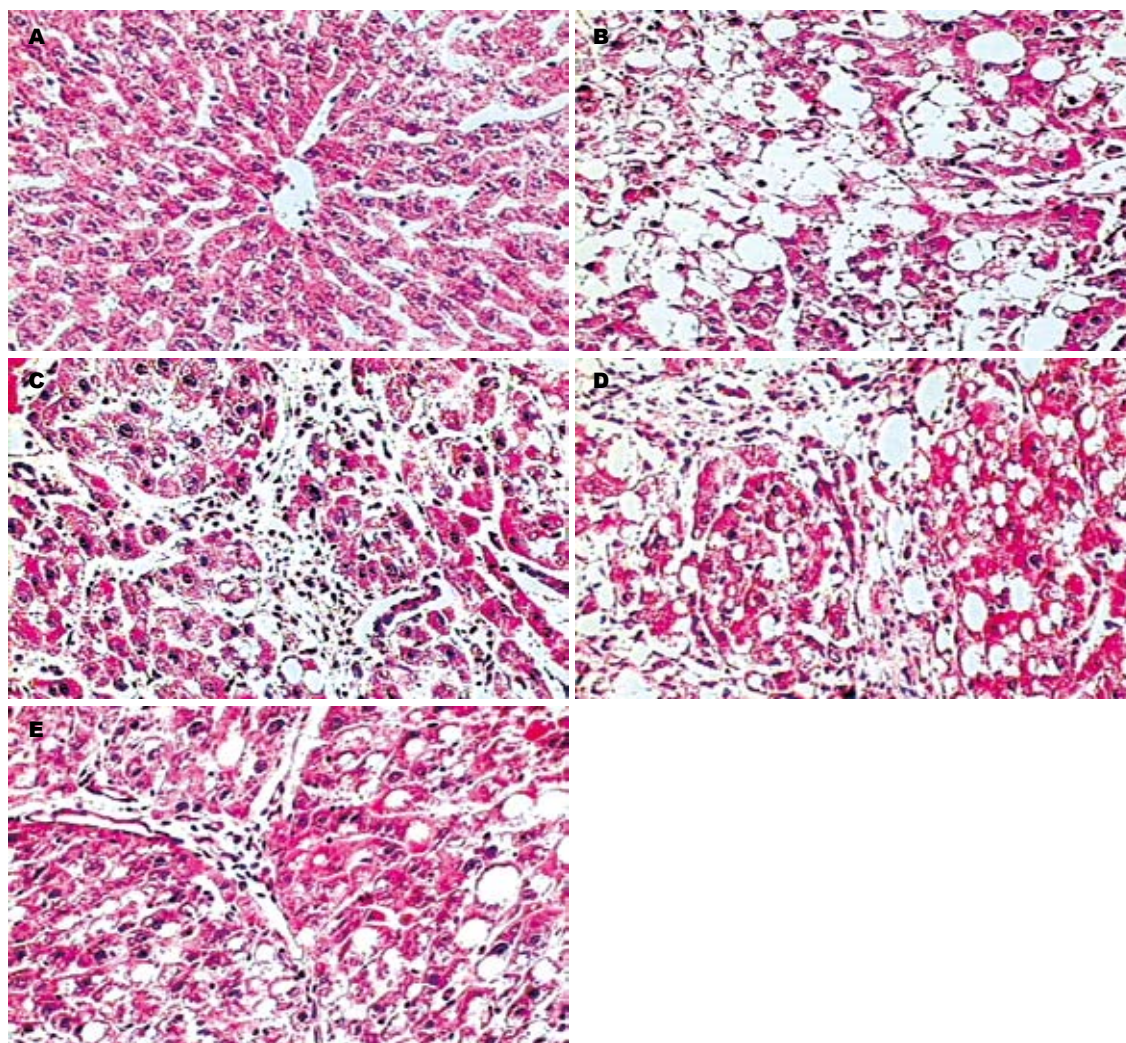


图1 肝组织HE染色(原始 $\times 200$)。A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组。

■相关报道

韩德五证实, 在肝硬化形成过程中, 往往都伴有IETM, 从肠道吸收的内毒素, 可以激活KC, 使其产生一些重要的细胞因子, 如TNF- α 、TGF- β 1等, 这些细胞因子可以刺激HSC活化。

化, 采用免疫组织化学SABC法, 以PBS缓冲液替代一抗做空白对照。一抗浓度: LN, 1 : 50稀释; α -SMA, 1 : 100稀释; TGF- β 1, 1 : 200稀释。应用Image Pro Plus 5.0图像分析系统分析LN、TGF- β 1和 α -SMA免疫组织化学染色切片, 阳性染色为棕黄色, 每个标本各取1张, 在同一放大倍率下随机选择3个不同视野, 测量窗口区域内的积分吸光度值(IA值), 取平均值。LSEC窗口扫描电镜标本制作方法: 正常组及模型组各时间点随机取2只, 采用门静脉插管灌流, 再经2%-3%戊二醛固定液和1%锇酸固定后, 梯度乙醇脱水, 真空干燥, 金属镀膜, 上镜观察。

1.2.3 主要血液生化指标的检测: 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量测定, 采用赖氏法; 血清内毒素(endotoxin)含量测定, 采用鲎试剂定量检测法; 血清TNF- α 含量测定采用放射免疫法。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件, 进行单因素ANOVA方差分析, 两两比较采用SNK法,

相关分析采用Pearson相关分析, 实验数据均以mean \pm SD表示。

2 结果

2.1 大鼠肝硬化模型的建立 肝组织HE染色和VG染色示(图1-2): 第2周末为脂肪病变期, 第4周末为肝纤维化病变期, 第6周末, 为早期肝硬化, 第8周末, 为肝硬化期。

2.2 肝窦毛细血管化形成 LN免疫组织化学染色(图3): 正常肝脏内仅在汇管区血管壁有少量LN阳性表达, 肝窦间隙内无LN分布。随着病变的发展, 在纤维间隔及肝窦间隙逐渐出现阳性表达, 到第8周末, 在肝窦间隙内已呈连续的线状分布。肝窦内皮细胞窗口扫描电镜观察的结果(图4): 正常LSEC上存在直径在100 nm左右, 大小不等的窗孔, 随着肝脏病变程度的加重, 窗孔逐渐变小, 变少直至消失, 到8 wk末时, 已完全消失, 类似于毛细血管内皮细胞, 形成肝窦毛细血管化。

■创新盘点

由于肠源性内毒素血症对肝脏会产生更直接的损害作用,本文采用免疫组织化学法检测细胞因子、炎症介质、自由基等来研究肠源性内毒素血症对肝窦毛细血管化形成的影响。

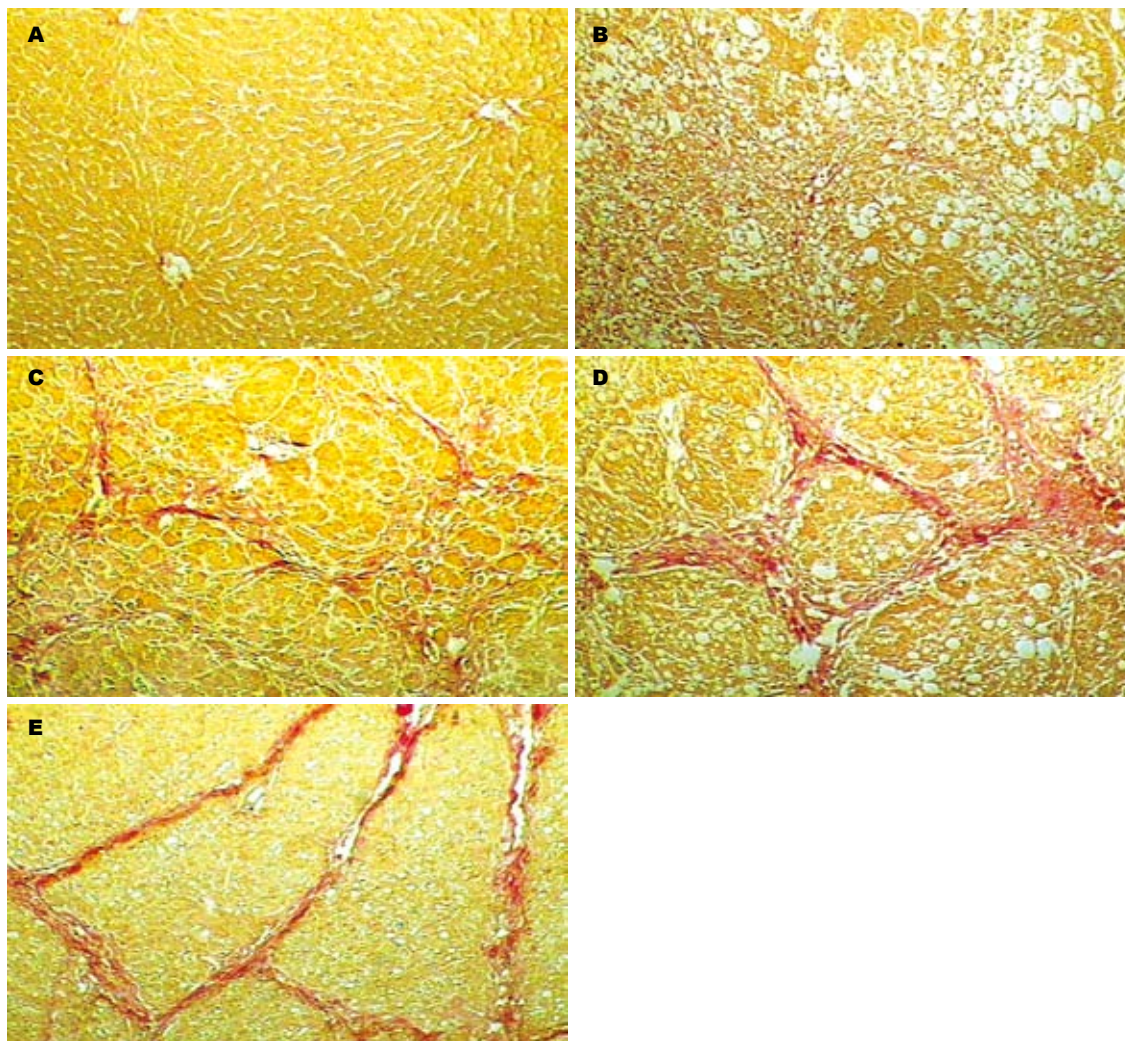


图2 肝组织VG染色(原始×60). A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组.

表1 ALT、内毒素和TNF- α 结果 ($n=6$)

分组	ALT(IU/L)	内毒素(EU/mL)	TNF- α (μ g/L)
对照组	21.43 \pm 9.96	0.138 \pm 0.022	0.54 \pm 0.07
2 wk组	114.91 \pm 8.84 ^{ac}	0.405 \pm 0.055 ^{ac}	0.65 \pm 0.06 ^{ac}
4 wk组	57.84 \pm 7.57 ^{ac}	0.506 \pm 0.036 ^{ac}	0.82 \pm 0.08 ^{ac}
6 wk组	51.97 \pm 10.32 ^a	0.580 \pm 0.055 ^{ac}	0.75 \pm 0.10 ^{ac}
8 wk组	30.08 \pm 15.39 ^{ac}	0.528 \pm 0.025 ^a	0.86 \pm 0.06 ^{ac}

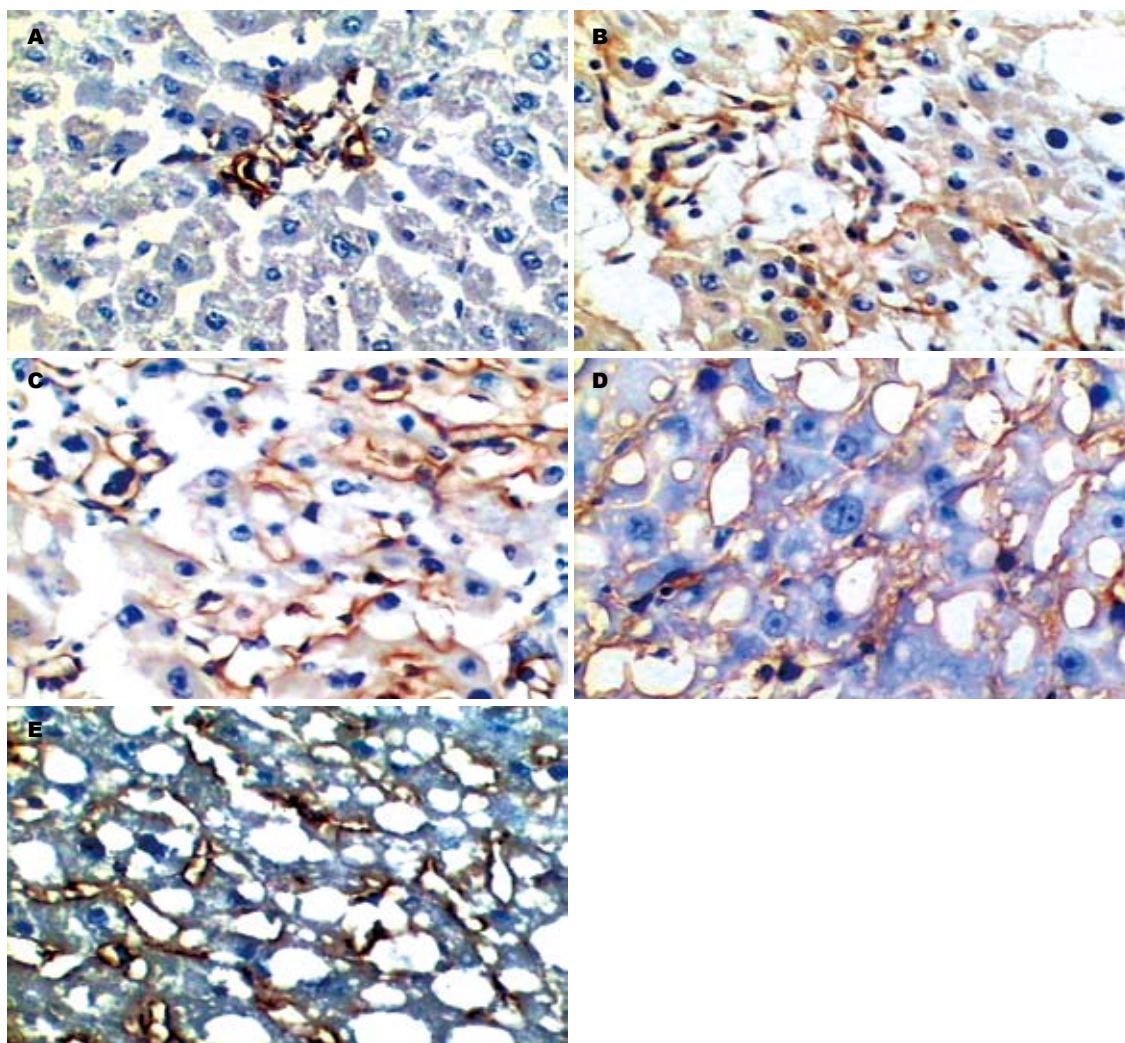
^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs 同指标前一时间点组.

2.3 血清生化指标 血清ALT在第2周末达到高峰,随后下降,到第8周末仍然较正常对照组有统计学差异;外周血清内毒素水平在第2、4、6周末,各点呈递增趋势,到第8周末时略有下降;外周血清TNF- α 水平在第2、4周末,各时间点呈递增趋势,而到第6周末时略有下降,第8周末时又升高(表1).

2.4 PVP的动态变化 PVP在第2、4周末,各点呈

递增趋势(从 14.88 ± 2.81 到 17.54 ± 1.84),到第6周末时略有下降(15.44 ± 3.11),第8周末时又逐渐升高(18.38 ± 2.53),考虑第6周末时PVP降低可能与侧支循环的建立有关.

2.5 α -SMA、TGF- β 1免疫组织化学染色结果 α -SMA免疫组织化学染色(图5):正常肝脏内除汇管区血管壁有阳性表达外,小叶内未见阳性表达,随着病变的发展,在纤维间隔及肝窦间隙



■同行评价

本研究从一个侧面阐明了肝硬化的形成机制, 设计合理, 统计学方法应用恰当, 具有较好的学术价值。

图 3 肝组织LN免疫组织化学染色(原始×400). A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组.

表 2 LN、 α -SMA和TGF- β 1免疫组织化学图像分析结果 ($n = 6, 14$)

分组	LN	α -SMA	TGF- β 1
对照组	366.6 \pm 10.8	1185.2 \pm 230.7	47.1 \pm 42.3
2 wk组	1025.5 \pm 69.1 ^{ac}	8507.8 \pm 788.4 ^{ac}	821.1 \pm 151.5 ^{ac}
4 wk组	1603.1 \pm 332.2 ^{ac}	17 038.8 \pm 6523.1 ^{ac}	1363.3 \pm 217.4 ^{ac}
6 wk组	2112.0 \pm 618.1 ^{ac}	21 956.2 \pm 5776.1 ^{ac}	2552.0 \pm 426.8 ^{ac}
8 wk组	3622.6 \pm 664.9 ^{ac}	20 798.4 \pm 4220.9 ^c	3674.7 \pm 887.2 ^{ac}

* $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 同指标前一时间点组.

逐渐出现阳性表达, 到第8周末, 阳性表达主要分布在假小叶周围的纤维间隔区域内, 小叶内也有少量的阳性细胞表达. TGF- β 1免疫组织化学染色(图6): 正常肝脏阳性表达仅见于少部分KC、肝形状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 且着色较浅、范围较小. 随着病变的发展, 在脂肪病变区和纤维间隔区域内, 出现许多含棕黄色颗粒状的细胞, 范围广, 主要为活化的HSC和

KC.

2.6 肝脏免疫组织化学图像分析 LN、TGF- β 1免疫组织化学染色在第2、4、6、8周末, 阳性表达逐渐增强. α -SMA免疫组织化学染色在第2、4、6周末, 阳性表达逐渐增强, 到第8周末时略有下降, 下降原因与肝小叶再生有关(表2).

2.7 相关性分析 血清TNF- α 与血清内毒素、PVP、 α -SMA、TGF- β 1及LN呈显著正相关

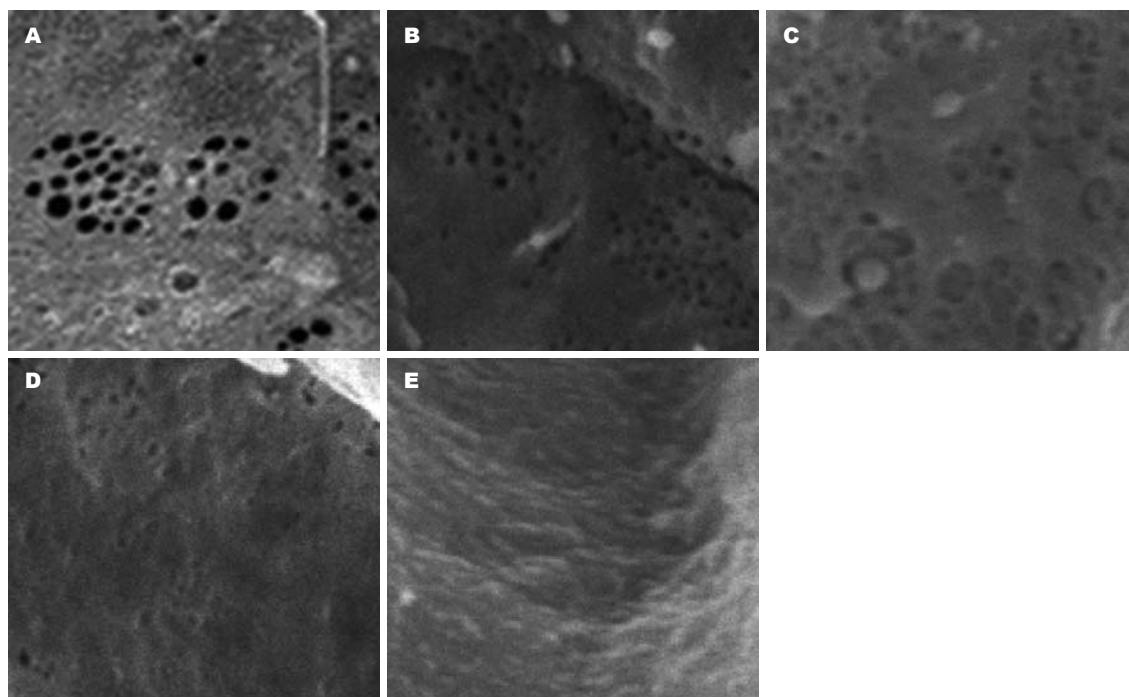


图 4 肝组织扫描电镜(原始 $\times 5000$). A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组.

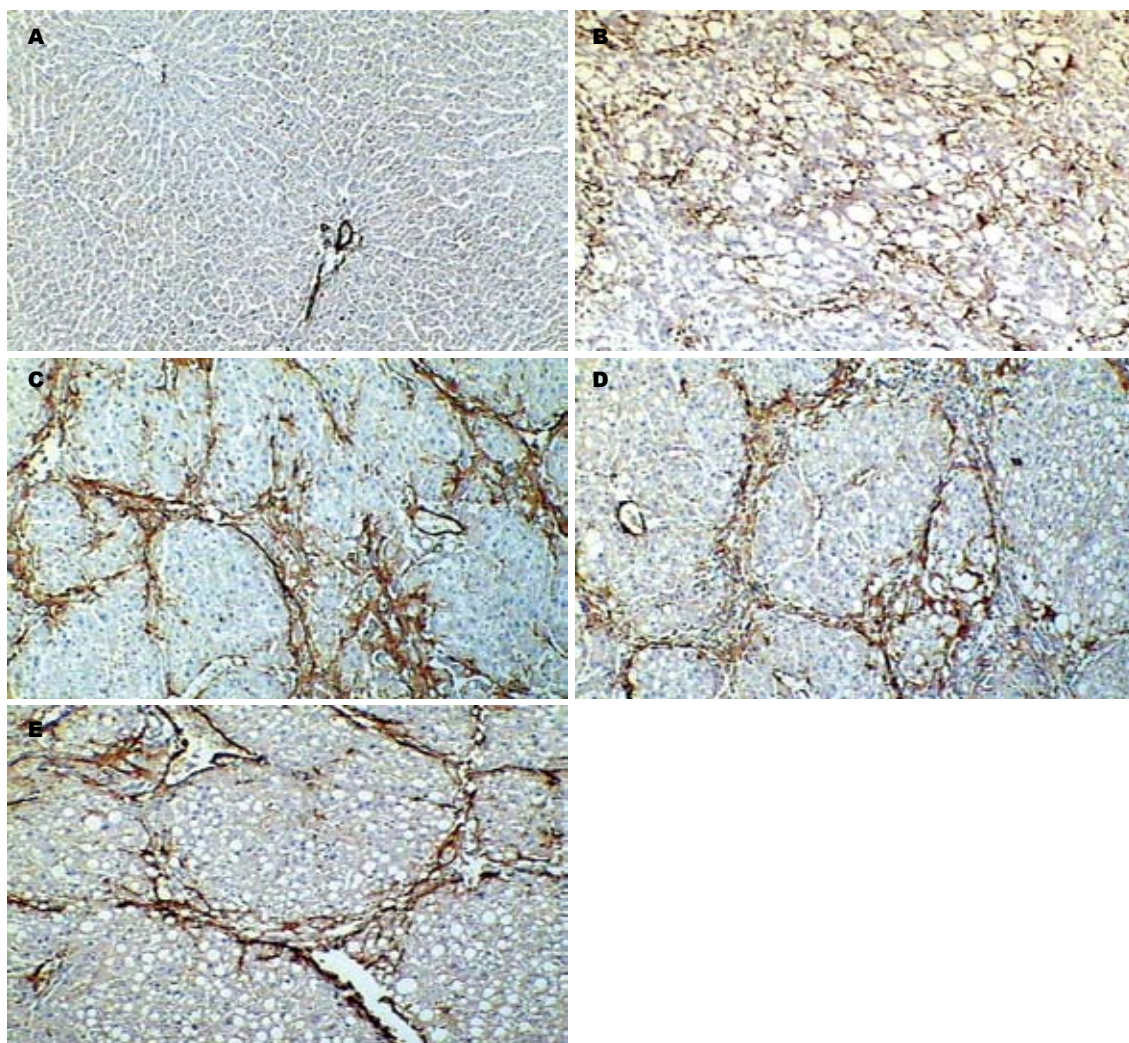


图 5 肝组织 α -SMA免疫组织化学染色(原始 $\times 100$). A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组.

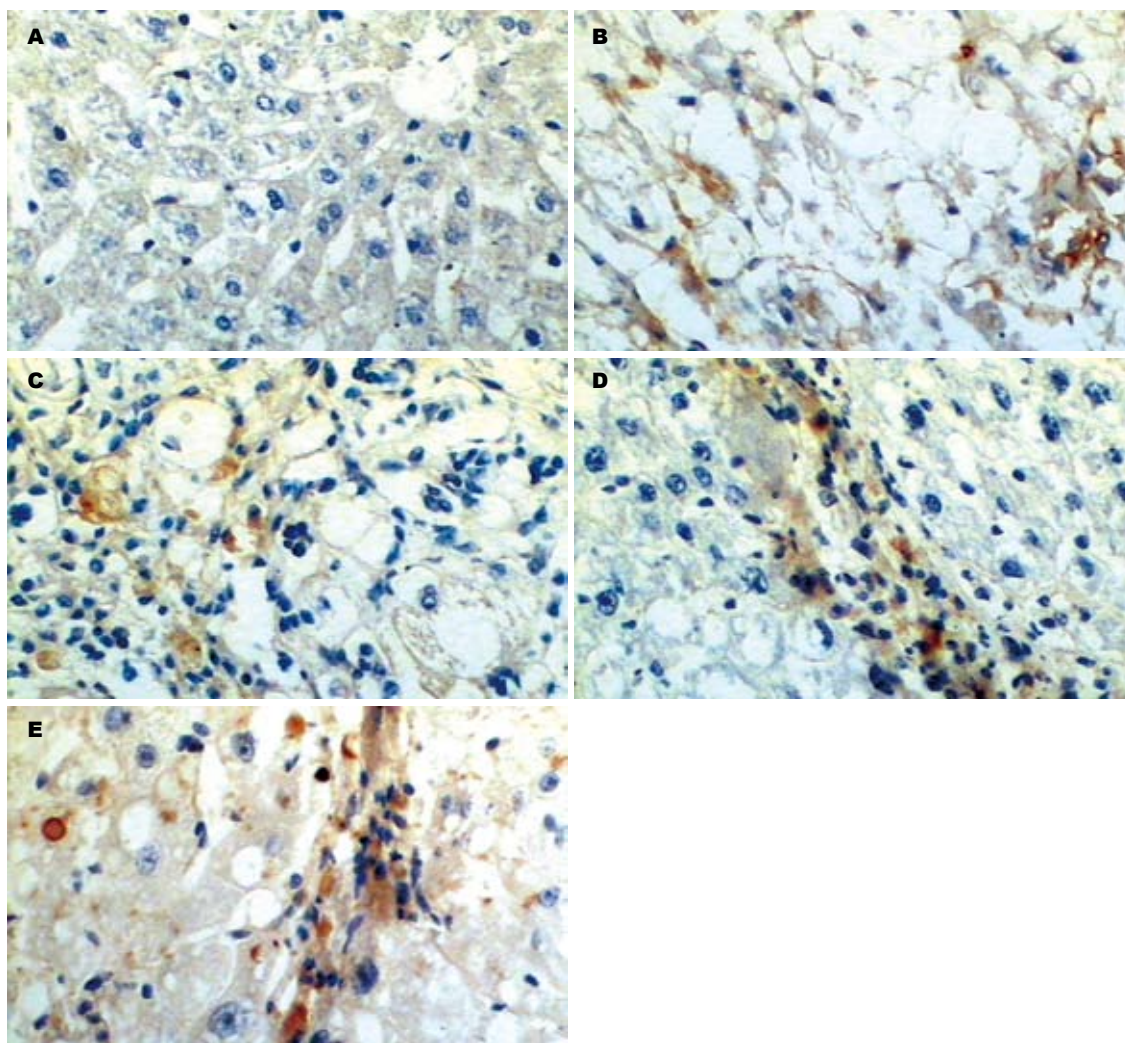


图 6 肝组织TGF- β 1免疫组织化学染色(原始 $\times 400$). A: 对照组; B: 2 wk组; C: 4 wk组; D: 6 wk组; E: 8 wk组.

($r = 0.8282, 0.8722, 0.7360, 0.7220, 0.8690$, 均 $P < 0.01$), 肝脏TGF- β 1与肝脏LN也呈显著正相关 ($r = 0.9080, P < 0.01$).

3 讨论

肝脏免疫组织化学及扫描电镜结果表明, 肝窦毛细血管化是肝纤维化及硬化过程中的一个特征性病变. 通过测定外周血内毒素及TNF- α 的动态水平, 说明在肝硬化形成过程中同时伴随有IETM的形成^[1]. 外周血TNF- α 水平与肝脏免疫组织化学指标LN、TGF- β 1、 α -SMA的相关分析结果都呈高度正性相关, 说明IETM对肝窦毛细血管化的形成可能有重要影响.

在肝硬化形成过程中, 往往都伴有IETM, 从肠道吸收的内毒素, 可以激活KC, 使其产生一些重要的细胞因子, 如TNF- α 、TGF- β 1等, 这些细胞因子可以刺激HSC活化, 这与我们在早期的研究结果相一致^[1]. 而活化的HSC又可以通过合成

和分泌TGF- β 1^[3-4], 作用于自身及LSEC, 促进他们合成细胞外基质, 如LN和ColIV等, 从而促进肝窦毛细血管化的形成^[5-6]. TGF- β 1的作用尤为关键, 可以作用于HSC使其合成基底膜成分, 还可以作用于LSEC使之也可以分泌LN和ColIV^[6]. 由内毒素引起的TGF- β 1可通过以下两个途径: 首先内毒素可以直接刺激Kupffer产生TNF- α , 再通过TNF- α 在作用于KC, 活化转录因子如NF- κ B, 而引发TGF- β 1大量合成的自分泌途径^[7]; 其次, 由内毒素刺激Kupffer产生的TNF- α 、PDGF、TGF- β 1等细胞因子可以活化HSC, 活化HSC又可以合成和分泌大量TGF- β 1^[1]. 由此可见内毒素可以直接或间接的激活KC、HSC细胞产生TGF- β 1. 因此IETM间接通过促进TGF- β 1合成增多, 使HSC和LSEC合成和分泌LN、ColIV等基底膜成分, 形成基底膜, 促进肝窦毛细血管化的形成.

正常的肝窦壁是由一层LSEC构成, 它具有

开放的窗孔及孔下缺乏完整的基底膜,这使他不同于机体其他部位的血管内皮细胞. 实验中LSEC的扫描电镜结果表明,随着肝脏病变程度的加重,LSEC窗孔逐渐变小,变少直至消失,到8 wk末时,已完全消失,已类似于毛细血管内皮. 正常的LSEC外基质对维持LSEC结构和功能的完整性具有重要作用^[6],他的改变对LSEC窗口的改变具有重要影响,实验中的肝脏LN免疫组织化学结果表明,随着LSEC下基底膜的逐渐形成,LSEC也逐渐失窗孔. 而内毒素可以通过间接刺激基底膜的形成,引起LSEC失窗孔. 此外,有实验表明LSEC窗孔在内毒素的直接作用下,可以出现去窗孔化,而且内毒素还可以通过激活Kupffer后产生的TNF- α 、白细胞三烯等细胞因子,对LSEC骨架的进行重新排列,从而可以导致去窗孔化的发生^[8-9],而正常的LSEC对于维持正常HSC有重要作用,转型后的LSEC不能逆转HSC活化^[10].

由于肝窦毛细血管化可直接影响PVP^[11-12],这种窦内阻力的增加主要发生在Disse腔,因为肝窦毛细血管化时Disse腔形态常因基底膜如LN、ColIV的形成,以及LSEC去窗孔化而发生改变,影响了PVP. 因此IETM可以通过间接促进肝窦毛细血管化的形成来影响PVP.

总之,IETM对肝纤维化及硬化时的特征性病变-肝窦毛细血管化的形成有重要影响作用.

4 参考文献

- 1 韩德五. 肠源性内毒素血症所致“继发性肝损伤”的临床依据. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1055-1058
- 2 韩德五, 马学慧, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究. 山西医药杂志 1979; 4: 1-6
- 3 王连升, 陈颖伟, 李定国. TGF β _1信号与肝纤维化. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 142-144
- 4 刘立新, 张骞骞, 韩德五, 姚海东. IGFBP2、IGFBP6在TGF- β _1活化的肝星状细胞中表达. 中国病理生理杂志 2008; 24: 2481-2483
- 5 Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524-529
- 6 Neubauer K, Krüger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 1999; 31: 692-702
- 7 Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-1476
- 8 Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002; 1: 1
- 9 Sarphie TG, D'Souza NB, Deaciuc IV. Kupffer cell inactivation prevents lipopolysaccharide-induced structural changes in the rat liver sinusoid: an electron-microscopic study. *Hepatology* 1996; 23: 788-796
- 10 Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 2008; 48: 920-930
- 11 王宪波, 刘平, 唐志鹏, 陆雄, 刘成海, 胡义扬, 徐列明, 顾宏图, 刘成. 肝窦毛细血管化的形成机制研究. 中华消化杂志 2004; 24: 289-292
- 12 DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 390-400

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 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-10-28)

内镜下单点注射组织胶治疗GEV1胃底静脉曲张

李坪, 毛羽, 李常青, 周安, 王捷, 李娜, 刘晶

李坪, 王捷, 李娜, 刘晶, 北京地坛医院内镜室 北京市 100015

毛羽, 北京地坛医院肝胆外科 北京市 100015

李常青, 北京地坛医院介入科 北京市 100015

周安, 北京地坛医院放射科 北京市 100015

李坪, 1994年华西医科大学学士, 主要从事消化内镜工作。

作者贡献分布: 李坪对此文所作主要贡献; 此课题由李坪与毛羽设计; 研究过程由李坪、毛羽、李常青、周安、王捷、李娜及刘晶操作完成; 数据分析由李坪完成; 本论文写作由李坪与毛羽完成。

通讯作者: 李坪, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院内镜室. endolp@126.com

电话: 010-84322506 传真: 010-84397205

收稿日期: 2009-07-07 修回日期: 2009-09-25

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Single-site injection of tissue adhesive under endoscopic guidance for treatment of Type 1 gastric varices

Ping Li, Yu Mao, Chang-Qing Li, An Zhou, Jie Wang, Na Li, Jing Liu

Ping Li, Jie Wang, Na Li, Jing Liu, Department of Endoscopy, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Yu Mao, Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Chang-Qing Li, Department of Interventional Medicine, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

An Zhou, Department of Radiology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Correspondence to: Ping Li, Department of Endoscopy, Beijing Ditan Hospital, 8 Jingshun East Street, Chaoyang District, Beijing 100015, China. endolp@126.com

Received: 2009-07-07 Revised: 2009-09-25

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of single-site injection of tissue adhesive under endoscopic guidance in the treatment of Type 1 gastric varices (GEV1).

METHODS: Under endoscopic guidance, tissue adhesive was injected into the submucosal gastric varices along the lesser curvature of the stomach near the cardia. After injection, changes in gastric varices were observed by endoscopy for 1 to 10 min. An endoscopic review was performed within two weeks after injection.

RESULTS: After injection, all gastric varices be-

came hard, and part of them were eradicated. The complete obliteration rate was 100% (32/32), and the rate of injection site necrosis was 6.2% (2/32).

CONCLUSION: Single-site injection of tissue adhesive into the submucosal gastric varices along the lesser curvature of the stomach near the cardia under endoscopic guidance is effective in the treatment of GVE1.

Key Words: Gastric varices; Tissue adhesive; Injection therapy

Li P, Mao Y, Li CQ, Zhou A, Wang J, Li N, Liu J. Single-site injection of tissue adhesive under endoscopic guidance for treatment of Type 1 gastric varices. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3109-3112

摘要

目的: 评估内镜下单点注射组织胶治疗胃底静脉曲张的近期疗效, 并印证内镜下GEV1型胃底曲张静脉血流方向的理论。

方法: GEV1型胃底静脉曲张进行组织胶注射治疗, 注射点选在贲门旁小弯侧曲张静脉, 进行单点注射。静脉内注射后观察1-10 min, 2 wk内进行内镜复查。

结果: 胃底静脉曲张组织胶治疗后静脉均固化, 部分静脉明显消失。胃底曲张静脉栓塞率100%(32/32)。注射点黏膜糜烂发生率6.2%(2/32)。

结论: 内镜下GEV1型胃底静脉曲张血流方向确实是从贲门旁小弯侧流向大弯侧。由静脉起始部位单点注射组织胶治疗, 疗效显著。

关键词: 胃底静脉曲张; 组织胶; 注射治疗

李坪, 毛羽, 李常青, 周安, 王捷, 李娜, 刘晶. 内镜下单点注射组织胶治疗GEV1胃底静脉曲张. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3109-3112

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3109.asp>

0 引言

食管胃底静脉曲张是肝硬化门脉高压并发症之

■背景资料

胃底静脉曲张的内镜治疗已经在国内外普遍开展, 组织胶治疗为公认最有效的方法, 但是组织胶注射部位的选择, 尚无规律可循。

■同行评议者

丁佑铭, 教授, 武汉大学人民医院肝胆腔镜外科; 田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

■相关报道

Soehendra *et al*首次报道用组织胶栓塞胃底静脉曲张内注射,解决了内镜下胃底静脉曲张出血难题。而Cheng *et al*报道,用改进三明治法注射治疗胃底静脉曲张,未发现任何异位栓塞,主要是因为减少了碘油的用量,避免了碘油栓塞的出现。

一,静脉曲张破裂出血夺去了许多患者生命。随着门奇断流手术、介入、内镜等治疗的开展,食管胃底静脉曲张破裂出血病死率明显降低,尤其伴随着近20年内镜治疗的大幅度进展,越来越多的患者接受了食管静脉套扎、硬化和胃底静脉曲张组织胶栓塞治疗^[1]。内镜治疗已经被公认为食管胃底静脉曲张的一线治疗方案。解剖提示胃底静脉曲张是胃左静脉的一个分支,由食管胃交界下2 cm处穿入胃壁,在胃黏膜内形成胃静脉曲张,再与食管静脉曲张汇合,但是在内镜下如何区分胃底曲张静脉的起始静脉和末端静脉尚无明确提示,也无相关组织胶治疗报道。自从化学名为 α -cyanoacrylate的组织胶成功的在中国临床运用了5年^[2-6]和北京地坛医院自2004年以来为近400例胃底静脉曲张患者进行了静脉内组织胶注射治疗后,我们在工作中证实单点注射组织胶可完全阻塞全部胃底静脉曲张,因此本研究对GEV1型^[7]病例进行单点注射组织胶,进一步观察阻塞胃底静脉曲张的有效性,总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均来至2009-02/2009-06北京地坛医院病毒性乙型肝炎后肝硬化的住院患者,男/女为28/4,平均年龄48.58岁,均为首次内镜治疗。治疗时出血后患者30例和未出血患者2例。根据静脉直径^[8]分为1、2度两型,1度为静脉直径<5 mm,2度静脉直径 \geq 5 mm,本组患者胃底静脉曲张1度/2度为26/6。

所用内镜为2.8 mm钳道内镜(Olympus H260),注射针为25G超滑注射针(Boston),组织胶为 α -cyanoacrylate(北京东林麦迪)。

1.2 方法 治疗前检查注射针,将注射针前端沾少量硅油达到阻止液体进入针内。用2支5 mL注射器分别抽入3 mL盐水和0.5 mL或1.0 mL组织胶备用。治疗时用:组织胶+1.7 mL盐水方法。组织胶注射点位于贲门小弯侧胃底曲张静脉,针尖刺入靶血管后,见针鞘内有回血时,助手立即依次推入组织胶和盐水。1度曲张静脉内注射组织胶0.5 mL,2度曲张静脉内注射组织胶1.0 mL。注毕,助手立即将针尖退回针鞘内,术者用针鞘前端在注射点压迫5 s左右后,将针鞘推入内镜钳道。观察3-10 min后,用针鞘触压曲张静脉,判断其是否实变。在术后2 wk内进行内镜复查,判断疗效。

2 结果

所有胃底静脉曲张组织胶治疗后静脉均实变,

部分静脉消失。

1-2 wk复查情况:完全阻塞率为100%(32/32);注射点糜烂率为6.2%(2/32);且巨大排胶溃疡率、早期排胶溃疡出血率及异位栓塞率均为0;17例患者同时进行食管静脉套扎、15例食管静脉硬化,其中比较典型的如:例1:患者组织胶注射后10 min,所有曲张静脉均被栓塞,内无血液(图1);例2:组织胶注射后3 min,所有曲张静脉均被栓塞,组织胶阻塞静脉在治疗后变得更加明显。治疗12 d内镜检查:静脉均栓塞,部分静脉消失。此患者同时存在胃肾分流,因为套扎后食管静脉出血,患者在组织胶注射14 d后进行经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)治疗,胃底静脉血流完全消失(图2);例3:组织胶注射后3 min几乎所有胃底曲张静脉消失(图3)。

3 讨论

胃底静脉曲张通常在解剖上分胃肾分流、食管胃底静两组,如DSA下直接造影和螺旋CT门静脉血管造影术所示^[9-12]。其中临床上胃肾分流较食管胃底静脉曲张少见。

国内外常用Sarin分类方法描述食管胃底静脉曲张^[13]。Zhu *et al*^[11]认为螺旋CT示GEV1食管胃底静脉曲张主要是通过奇静脉回流至上腔静脉(100%),而胃静脉曲张血流有84%通过胃肾静脉回流至上腔静脉。

1985年Soehendra *et al*^[14]首次报道用组织胶栓塞胃底静脉曲张内注射,解决了内镜下胃底静脉曲张出血难题。过去,我们在进行组织胶治疗时,总是选择内镜下见直径较大的曲张静脉团开始注射,往往要通过2-3点进行注射才能栓塞内镜下看见的全部胃底曲张静脉。但是,这种注射方法治疗时拔针后出血的风险高,术后排胶溃疡大,排胶时间长。相反,用少量组织胶,从贲门旁小弯侧内镜下直径较小的起始静脉内进行单点小剂量注射:1度曲张静脉用0.5 mL组织胶,2度曲张静脉用1.0 mL组织胶,曲张静脉阻塞率为100%。因此单点注射显得更为科学有效。而且,单点小剂量注射也大大降低了医疗费用。拔针出血风险也很小,此组治疗患者术中均未出现拔针后出血现象。

Cheng *et al*^[15]报道,用改进三明治法(0.3 mL碘油+1 mL组织胶混合物)注射治疗胃底静脉曲张,未发现任何异位栓塞,主要是因为减少了碘油的用量,避免了碘油栓塞的出现。我们的方法

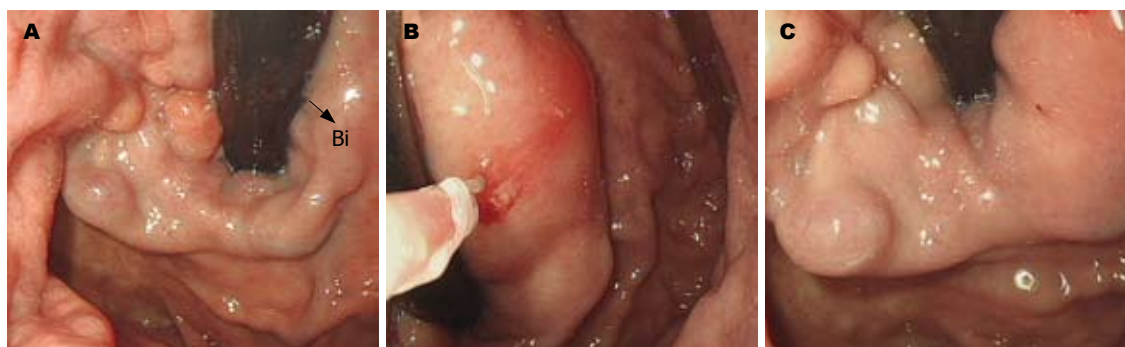


图 1 例1患者组织胶注射前后胃底静脉曲张情况. A: 治疗前, Bi示起始静脉; B: 注射针穿刺静脉见回血; C: 组织胶注射后10 min, 所有曲张静脉均被栓塞, 内无血液.

■应用要点

本研究结果证实, 凡是GEV1型胃底静脉曲张, 只需在起始静脉内单点注射0.5-1.0 mL组织胶, 即能达到完全栓塞胃底静脉曲张的结果. 这项成果的应用将大大提高GEV1型胃底静脉曲张的治疗效果, 减少患者医疗费用, 降低术中、术后风险.

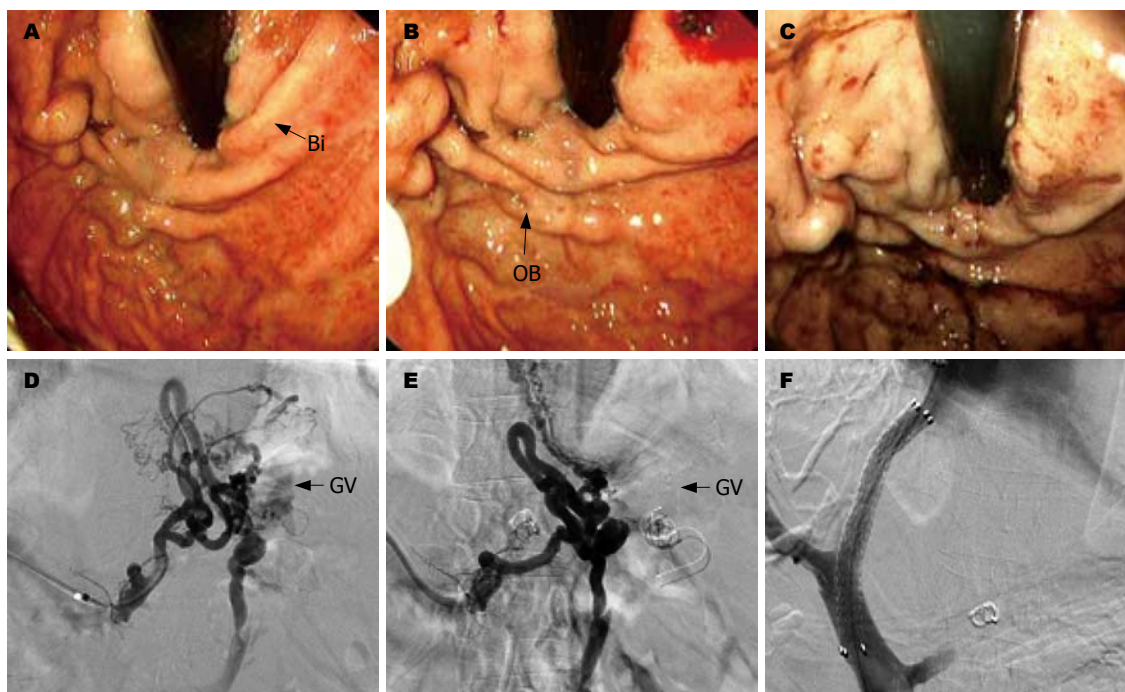


图 2 例2患者组织胶注射前后胃底静脉曲张情况. A: 治疗前, Bi示起始静脉; B: 组织胶注射后3 min, 所有曲张静脉GV均被栓塞, OB示组织胶阻塞静脉在治疗后变得更加明显; C: 治疗12 d, 静脉均栓塞, 部分静脉消失; D-F: 患者同时存在胃肾分流, 因套扎后食管静脉出血, 组织胶注射后14 d进行TIPS治疗, 箭头示胃底静脉血流完全消失.

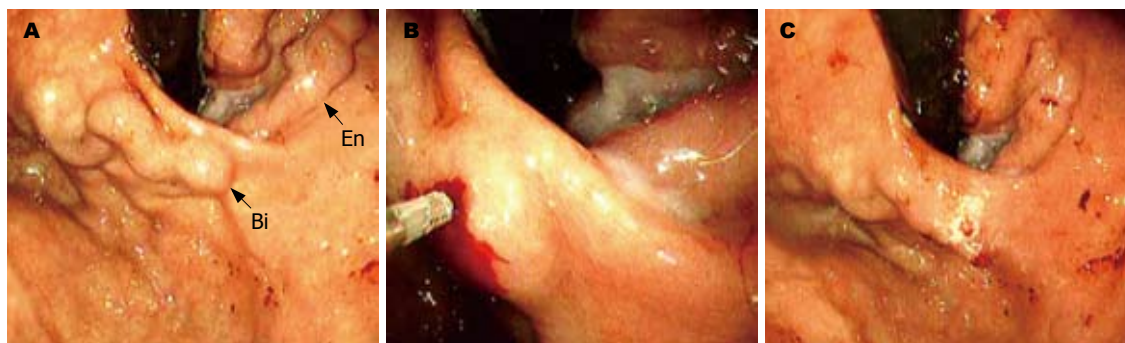


图 3 例3患者组织胶注射前后胃底静脉曲张情况. A: Bi示起始静脉, En示末端静脉; B: 注射针穿刺和注射组织胶; C: 3 min后几乎所有胃底曲张静脉消失.

是用盐水推注纯组织胶, 既快阻力又小. 由于没有使用碘油, 更是避免了碘油异位栓塞和碘油

过敏反应出现的可能, 较加碘油三明治法更为安全.

■同行评价

本研究对治疗胃底静脉曲张破裂出血具有重要的指导意义,有相当高的临床应用价值。

单点法注射组织胶后的不良反应有注射点的糜烂,发生率低,仅(6.2%)。目前未见其他并发症出现,如:早期(2 wk内)排胶溃疡出血、菌血症、异位栓塞、一过性面瘫、小肺栓塞、注射过程中大出血或巨大排胶溃疡等等。

单点法组织胶治疗后,复查内镜见静脉曲张未完全消失,是因为内有组织胶铸型,血管的走行依然存在,用软管触探法或超声探头检查即可证实。2 wk内复查内镜,均未见明显排胶反应。在进行组织胶注射时准确将组织胶注射入血管内非常关键,组织胶外渗越少,术后排胶出血风险越低。但是起始静脉往往较为细直,在穿刺时较为困难,因此要减少组织胶外渗在术者操作技巧上有更高的要求。同时,组织胶的固化时间很短,组织胶在血管内流动的距离往往不超过5-10 cm,组织胶用量过多将导致组织胶外渗到黏膜下,增加了排胶反应可能,或组织胶沿注射针反流至内镜镜面或活检通道内将影响内镜操作,因此单点注射法尽量用小剂量组织胶,无论起始静脉直径多大,组织胶最大剂量最好不超过1.0 mL。

另外,起始静脉和末端静脉也有多种变化,如两者常常靠得很近,甚至起始静脉位于胃底大弯侧也可出现,因此在注射前判断好起始静脉的位置尤为关键,不要急于下针。在活动出血时,此方法不实用,因为患者血容量的下降,曲张静脉整体减轻,起始静脉更是难以发现,所以出血部位直接注射组织胶方法更为准确有效,待出血控制1 wk后,再次单点注射组织胶治疗胃底静脉曲张。

内镜下组织胶注射只栓塞胃壁内曲张静脉,胃壁外静脉和胃肾静脉未栓塞的静脉仍可以很好的分流门脉血流^[16],故门脉压力不会因此上升很多,理论上单点法胃底静脉曲张组织胶治疗对避免患者胃底静脉曲张再出血有帮助。是否可避免断流手术,尚需要长时间和大样本的研究。

4 参考文献

- 1 李坪,成军,毛羽,胡居龙,蒋煜. 急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血200例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 90-93
- 2 Maruyama H, Okabe S, Ishihara T, Tsuyuguchi T, Yoshikawa M, Matsutani S, Yokosuka O. Long-term effect of endoscopic injection therapy with combined cyanoacrylate and ethanol for gastric

fundal varices in relation to portal hemodynamics. *Abdom Imaging* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print]

- 3 冀明,王沧海,于中麟,张澍田. 国产组织粘合剂注射加套扎治疗食管胃底静脉曲张. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 361-362
- 4 Fry LC, Neumann H, Olano C, Malfertheiner P, Mönkemüller K. Efficacy, complications and clinical outcomes of endoscopic sclerotherapy with N-butyl-2-cyanoacrylate for bleeding gastric varices. *Dig Dis* 2008; 26: 300-303
- 5 Consolo P, Luigiano C, Giacobbe G, Scaffidi MG, Pellicano R, Familiari L. Cyanoacrylate glue in the management of gastric varices. *Minerva Med* 2009; 100: 115-121
- 6 Kwak HS, Han YM. Percutaneous transportal sclerotherapy with N-butyl-2-cyanoacrylate for gastric varices: technique and clinical efficacy. *Korean J Radiol* 2008; 9: 526-533
- 7 Sarin SK, Lahoti D, Saxena SP, Murthy NS, Makwana UK. Prevalence, classification and natural history of gastric varices: a long-term follow-up study in 568 portal hypertension patients. *Hepatology* 1992; 16: 1343-1349
- 8 Boustière C, Dumas O, Jouffre C, Letard JC, Patouillard B, Etaix JP, Barthélémy C, Audigier JC. Endoscopic ultrasonography classification of gastric varices in patients with cirrhosis. Comparison with endoscopic findings. *J Hepatol* 1993; 19: 268-272
- 9 Zhang CQ, Liu FL, Liang B, Xu HW, Xu L, Feng K, Liu ZC. A modified percutaneous transhepatic varices embolization with 2-octyl cyanoacrylate in the treatment of bleeding esophageal varices. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 463-469
- 10 Perri RE, Chiorean MV, Fidler JL, Fletcher JG, Talwalkar JA, Stadheim L, Shah ND, Kamath PS. A prospective evaluation of computerized tomographic (CT) scanning as a screening modality for esophageal varices. *Hepatology* 2008; 47: 1587-1594
- 11 Zhu KS, Meng XC, Zhang JS, Guan SH, Li ZR, He KK, Pang PF, Jiang ZB, Huang MS, Shan H. [The role of multi-detector row CT in the diagnosis and hemodynamic studies of gastric varices in portal hypertension] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 3251-3255
- 12 de Franchis R, Dell'Era A, Primignani M. Diagnosis and monitoring of portal hypertension. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 312-317
- 13 Sarin SK, Kumar A. Gastric varices: profile, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 1244-1249
- 14 Soehendra N, Nam VC, Grimm H, Kempeneers I. Endoscopic obliteration of large esophagogastric varices with bucrylate. *Endoscopy* 1986; 18: 25-26
- 15 Cheng LF, Wang ZQ, Li CZ, Cai FC, Huang QY, Linghu EQ, Li W, Chai GJ, Sun GH, Mao YP, Wang YM, Li J, Gao P, Fan TY. Treatment of gastric varices by endoscopic sclerotherapy using butyl cyanoacrylate: 10 years' experience of 635 cases. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 2081-2085
- 16 赵丽琴,贺文,赵红,于永征. CT门静脉成像诊断胃底静脉曲张侧支循环的价值. 中华放射学杂志 2006; 40: 1175-1178

编辑 李瑞敏 电编 何基才

磷脂酰肌醇蛋白多糖-3在肝癌组织中的表达及其临床病理学特征

董志珍, 姚登福, 张崇国, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 邱历伟

董志珍, 南通大学诊断学教研室 江苏省南通市 226001
姚登福, 邱历伟, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001
张崇国, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 南通大学附属医院肿瘤中心 江苏省南通市 226001
董志珍, 副研究员, 主要从事肝癌早期诊断及发病机制研究。
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008187
作者贡献分布: 本课题由董志珍、张崇国及姚登福设计; 研究过程由董志珍、张崇国、钱静、李姗姗、卞银珠及邱历伟操作完成; 数据分析由张崇国及董志珍完成; 论文写作由张崇国、董志珍及姚登福完成。
通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心, yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052254 传真: 0513-85052523
收稿日期: 2009-07-05 修回日期: 2009-10-13
接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-10-28

Glypican-3 expression and its correlation with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma

Zhi-Zhen Dong, Deng-Fu Yao, Chong-Guo Zhang, Jing Qian, Shan-Shan Li, Yin-Zhu Bian, Li-Wei Qiu

Zhi-Zhen Dong, Department of Diagnostic Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Deng-Fu Yao, Li-Wei Qiu, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Chong-Guo Zhang, Jing Qian, Shan-Shan Li, Yin-Zhu Bian, Center for Oncology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008187
Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com
Received: 2009-07-05 Revised: 2009-10-13
Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of human glypican-3 (GPC-3) and analyze its correlation with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Tumor specimens and matched tumor-adjacent and -distant specimens were taken from 36 HCC patients. The expression of GPC-3

in these specimens was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Positive GPC-3 signal was localized in both cell membrane and cytoplasm in HCC, and only in cytoplasm in tumor-adjacent tissue. No positive staining was found in tumor-distant tissue. The positive rate of GPC-3 expression was 80.6% in HCC and 41.7% in tumor-adjacent tissue. The intensity of GPC-3 expression was significantly higher in HCC than in tumor-adjacent and -distant tissues ($\chi^2 = 11.445, P < 0.01$).

CONCLUSION: GPC-3 expression may be closely associated with the development and progression of HCC and can be used as a molecular marker for HCC diagnosis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Glypican-3; Immunohistochemistry

Dong ZZ, Yao DF, Zhang CG, Qian J, Li SS, Bian YZ, Qiu LW. Glypican-3 expression and its correlation with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3113-3117

摘要

目的: 分析人肝细胞癌(HCC)组织中磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC-3)的表达、胞内分布及其临床病理学特征。

方法: 以自身配对法分别收集36例HCC患者经手术切除后的癌灶、癌旁和远癌组织, 以免疫组织化学法检测组织中GPC-3表达及胞内分布与临床病理学特征。

结果: HCC的癌灶组织GPC-3表达于胞质和细胞膜; 癌旁组织GPC-3阳性表达主要定位于胞质, 而远癌组织未见明显表达。癌灶组织GPC-3表达强度明显高于癌旁和远癌组织($\chi^2 = 11.445, P < 0.01$), 表达阳性率分别为80.6%、41.7%和0。

结论: HCC组织GPC-3过表达与其的发生、发

■背景资料

HCC是全球最常见的恶性肿瘤之一, 每年有50余万新发病例, 其中50%在中国。HCC发生发展具有多病因、多中心和多阶段的特征, 肝炎病毒感染引起肝脏慢性炎症是其重要发病背景, HCC的早诊早治至关重要。

■同行评议者

樊红, 副教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

■研究前沿

GPC-3过表达是HCC形成过程中的早期事件,影响多种信号传导途径,与Wnt、IGF-Ⅱ和转化酶等共同作用,参与肝癌细胞的发生、发展过程,与肝细胞恶性转化关系密切,已成为HCC早期诊断的研究热点。

展密切相关。

关键词: 肝细胞癌; 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3; 免疫组织化学

董志珍, 姚登福, 张崇国, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 邱历伟. 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3在肝癌组织中的表达及其临床病理学特征. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3113-3117

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3113.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生是由病毒、化学致癌物等多病因作用以及经过启动、促进、演变等多阶段的发病过程, 因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控, 出现持续增殖而致癌变^[1-3]. 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(glypican-3, GPC-3)基因位于人染色体X26.10, 由8个外显子组成, 启动子区有多个转录因子结合位点^[4-5], 转录产物长度为2130 bp, 编码580个氨基酸. GPC-3与肝细胞恶性转化关系密切, 在肝细胞发生癌变过程中GPC-3呈动态表达^[6]. 本研究观察了人HCC及其自身对照组织中GPC-3的表达及其临床病理学特征, 以探讨其在HCC形成中的机制和临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-2008年南通大学附属医院HCC患者(男31例, 女5例)术后新鲜肝脏组织, 按自身配对法, 分别留取HCC切除后的癌灶组织、癌旁组织(距癌灶边缘2 cm)、远癌组织(距癌灶边缘5 cm)各36份(每份约200 mg), 除部分作组织病理学检查外, 其余组织置-85℃保存. 36份标本中HCC肿块直径≥5 cm有14例, <5 cm 22例(其中<3.0 cm, 13例), HCC患者年龄35-69(平均50.9±9.8)岁. 36例标本已经组织病理学(HE染色)证实其类型均为HCC, 其中高分化7例、中分化24例及低分化5例; 肿瘤单发30例, ≥2个6例; HBsAg阳性者31例、阴性者5例. 所有病例均有完整随访资料, 按全国HCC防治协作组制定的标准核实诊断^[7].

1.2 方法

1.2.1 肝组织总RNA提取与浓度分析: 称取HCC组织或癌周组织50 mg, 置于经0.1% DEPC水处理过的匀浆器中, 加入1 mL TRIzol, 冰浴匀浆. 吸1 mL匀浆液至离心管中, 4℃离心15 000 r/min×10 min. 取上清0.8 mL, 加入0.2 mL氯仿, 震荡2 min, 4℃离心10 000 r/min×10 min. 取上清

0.3 mL, 加100%异丙醇0.3 mL, 再加50%异丙醇0.5 mL, 震荡30 s, 4℃离心15 000 r/min×5 min. 弃上清, 加1 mL 750 mL/L乙醇, 轻轻洗涤沉淀. 4℃离心15 000 r/min×5 min. 弃上清, 室温静置3 min, 将乙醇晾干. 加20 μL 0.1%氯化锂溶解沉淀, 50℃孵育5 min. 在核酸蛋白分析仪上测定吸光度值(A值) A_{260}/A_{280} 与总RNA浓度.

1.2.2 免疫组织化学染色(链霉亲和素-生物素法, SP法): 取新鲜肝组织, 固定、浸蜡, 作成厚度4 μm的组织切片, 常规脱蜡、水化, 双氧水阻断内源性过氧化物酶, 高压加热法修复抗原, 正常动物血清封闭非特异性结合, 滴加GPC-3抗体, 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液漂洗, 滴加生物素标记的第二抗体, 室温孵育10 min, PBS漂洗, 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶, 室温孵育10 min, PBS冲洗, 滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺溶液, 室温显色, 蒸馏水洗, 苏木素复染, 无水乙醇脱水透明、封片. Olympus BX50光学显微镜观察、摄像, 以0.01 mol/L PBS液(pH7.5)分别替代一抗、二抗作阴性对照.

1.2.3 阳性结果判断标准: HCC组织中显示棕黄色颗粒为GPC-3表达阳性. 肝组织中GPC-3表达强度: +, 阳性细胞数为10%-25%; ++, 阳性细胞数为26%-75%; +++, 阳性细胞数>75%.

统计学处理 样本率之间的比较采用确切概率(Fisher's exact)法, 用SPSS13.0统计软件处理和分析数据, 以 $P<0.05$ 表示差异有显著性.

2 结果

2.1 人HCC组织GPC-3表达的胞内分布与定位 HCC及部分癌周组织中GPC-3阳性表达呈棕黄色. 癌组织中GPC-3呈巢状分布, 深染, 细胞胞质和细胞膜均呈阳性; 而对应癌周组织GPC-3阳性表达, 主要定位于胞质, 而细胞膜无明显阳性着色; 远癌组织未见表达, HCCGPC-3表达强度明显高于癌周组织(图1).

2.2 HCC组织总RNA制备及GPC-3表达 HCC组总RNA为 12.4 ± 7.3 mg/g肝, 癌周组为 53.8 ± 52.0 mg/g肝, 后者大约是前者的4倍($t=3.05$, $P<0.01$). 癌灶与癌旁、远癌组织中GPC-3呈差异表达见表1. 癌灶组GPC-3阳性率明显高于远癌和癌旁组($\chi^2=11.455$, $P=0.001$), 且癌旁组阳性率明显高于远癌组; 癌灶组GPC-3表达, 强阳性16例(44.4%), 中等阳性7例(19.4%), 弱阳性6例(16.7%); 癌旁组强阳性1例(6.7%), 中等阳性5例(33.3%), 弱阳性9例(60%); 癌灶GPC-3表达

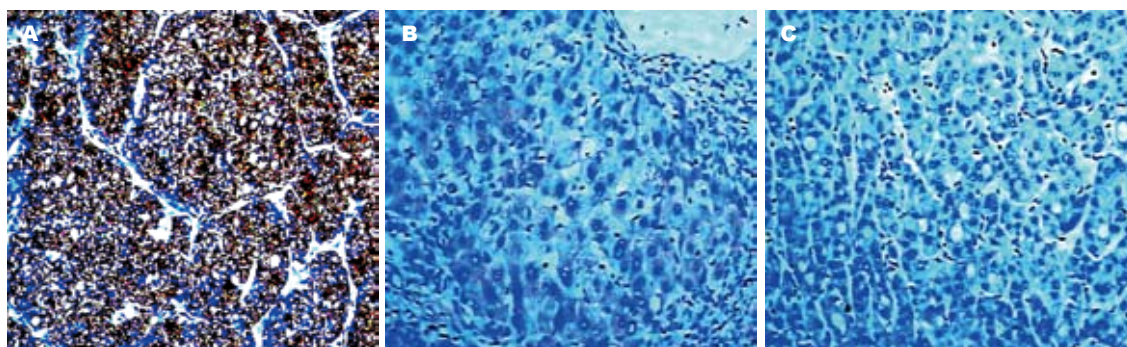


图1 HCC不同组织中GPC-3表达免疫组织化学分析(SP × 200). A: 癌灶组织; B: 癌旁组织; C: 远癌组织.

■创新盘点

癌组织GPC-3表达率较高,而非肝肿瘤组织仅在5%以下,且与AFP表达无相关性.本研究进行GPC-3 mRNA分析有助于HCC诊断和良恶性肝病的鉴别.

表1 HCC不同组织中GPC-3表达阳性率和表达强度 ($n = 36$)

分组	GPC-3阳性率(%)	χ^2 值	P 值	GPC-3表达强度				Fisher值	P 值
				-	+	++	+++		
远癌组织	0.0			36	0	0	0		
癌旁组织	41.7	18.947	0.000	21	9	5	1	19.558	0.000
癌灶组织	80.6	48.558	0.000	7	6	7	16	53.125	0.000

明显高于远癌和癌旁组(Fisher值 = 21.169, $P = 0.000$), 癌旁组强度也明显高于远癌组.

2.3 HCC组织GPC-3表达与病理学特征 GPC-3在癌灶组织的阳性率为80.6%, 其表达强度与肿瘤的分化程度、肿瘤数目、HBsAg、AFP和GGT间的关系, 经确切概率法分析, 各组间均未见明显的统计学差异, 而与肿瘤大小之间存在统计学的差异(Fisher值 = 10.272, $P = 0.010$, 表2).

3 讨论

GPC-3属于硫酸类肝素糖蛋白聚糖家族, 以糖基化磷脂酰肌醇结合到细胞表面^[5]. GPC-3蛋白C端与糖基化磷脂酰肌醇共价结合连接于细胞膜上, N端游离于细胞外, 其内由多个二硫键连接, 分子呈球形立体结构. GPC-3核心蛋白含有由14半胱氨酸残基构成的特征性保守序列, 该序列主要分布在核心蛋白中央区域, 其GAG侧链为肝素及硫酸乙酰肝素, 插入位点限在羧基末端的50个氨基酸残基之内. 蛋白分子结构在第358位精氨酸和359位丝氨酸处可被酶切分成2个亚基: 40 kDa的N端蛋白(可溶性)和30 kDa的C端蛋白(与包膜结合). 外显子中存在点缺失或点突变, 导致GPC-3功能丧失. 他的过表达是HCC形成过程中的早期事件, 影响多种信号传导途径, 经多聚阴离子GAG侧链或核心蛋白与Wnt、IGF-II和转化酶等共同作用, 参与肝细胞的发生、发展过程, 与肝细胞恶性转化关系密切^[8-10].

具有癌胚性质的GPC-3蛋白表达呈棕黄色, 在HCC的癌灶组织中呈巢状分布, 深染, 存在于细胞质和细胞膜, 而对应癌周组织GPC-3阳性表达, 主要位于胞质. HCC组织的不同部分, GPC-3表达存在明显差异. 本研究以免疫组织化学法同步分析了人HCC、癌旁和远癌组织GPC-3表达, 结果显示HCC组织中GPC-3阳性表达明显高于癌周, 特别是远癌组织, 说明肝癌组织GPC-3表达差异, 十分利于良、恶性肝病的鉴别诊断^[5,11-12].

HCC组织中核酸代谢旺盛, 癌灶和癌周组织中总RNA存在梯度分布, 可能与HCC组织的侵袭生长与新血管生成密切相关^[13-14]. 逆转录巢式聚合酶链反应扩增分析人HCC组织GPC-3 mRNA, 结果显示癌组织表达率为74.8%, 而非肝肿瘤组织仅3.2%, 且与甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)表达无明显相关性, 说明GPC-3 mRNA分析有助于HCC诊断和良恶性肝病的鉴别. HCC模型动态研究肝细胞癌变过程中肝GPC-3 mRNA, 其阳性率逐渐升高, 在癌变肝组织达100%. 人HCC组织GPC-3 mRNA高表达, 他可作为HCC早期诊断敏感性高、特异性强的分子标志物^[15].

AFP诊断HCC是目前公认的肿瘤标志物, 但其阳性率仅为70%左右, 其假阴性率达30%, 不利于HCC的早期诊断和小肝癌的发现. 且AFP轻度升高与良性肝病或非肝肿瘤难以区分^[16].

■应用要点

本研究对GPC-3的深入研究,将有助于HCC的早期发现和揭示肝细胞癌变的分子机制,并可成为HCC基因治疗的有利靶点。

表 2 HCC组织GPC-3表达的病理学特征分析

分组	n	GPC-3表达 阳性率n(%)	GPC-3表达强度				Fisher值	P值
			-	+	++	+++		
分化程度								
高	7	5(71.4)	2	1	1	3		
中	24	20(83.3)	4	4	6	10	0.966	0.931
低	5	4(80.0)	1	1	0	3	1.405	1.000
肿瘤数目								
单发	30	24(80.0)	6	5	7	12	2.012	0.631
多发	6	5(83.3)	1	1	0	4		
HBsAg								
阳性	31	25(80.6)	6	6	5	14	2.109	0.709
阴性	5	4(80.0)	1	0	2	2		
肿瘤直径(cm)								
≥5	14	8(57.1)	6	0	3	5	10.272	0.010
<5	22	21(95.4)	1	6	4	11		
与GGT关系								
<50 U/L	17	13(76.5)	5	4	3	6	3.038	0.422
>50 U/L	19	16(84.2)	2	2	4	10		
与AFP关系								
<200 μg/L	18	14(77.8)	4	5	4	5	5.061	0.166
>200 μg/L	18	15(83.3)	3	1	3	11		

GPC-3表达与AFP和γ-谷氨酰基转移酶无明显相关,联检利于临床上提高诊断HCC的敏感性和特异性。HCC组织GPC-3 mRNA表达明显异常,且特异性较高。采用灵敏度高,特异性强的分析技术探测患者HCC发生相关基因标志,并结合癌细胞表达的特异性微量蛋白检测,可早期诊断HCC、监测HCC发生或术后复发。单克隆抗体能够特异性的识别GPC-3,可开发新的方便的临床实用方法,另也可基于单克隆抗体基础上开发新的分子靶向治疗^[17]。随着对GPC-3的深入研究,将有助于HCC的早期发现和揭示肝细胞癌变的分子机制。

4 参考文献

- Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134
- Kittaka N, Takemasa I, Takeda Y, Marubashi S, Nagano H, Umeshita K, Dono K, Matsubara K, Matsuura N, Monden M. Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data. *Eur J Cancer* 2008; 44: 885-897
- Block TM, Marrero J, Gish RG, Sherman M, London WT, Srivastava S, Wagner PD. The degree of readiness of selected biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma: notes from a recent workshop. *Cancer Biomark* 2008; 4: 19-33
- 张崇国, 姚登福. 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3异常表达与肝细胞癌变相关. *国际内科学杂志* 2008; 35: 666-671
- Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis EK, Terracciano LM. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 899-906
- 张崇国, 姚登福, 吴玮, 吴信华, 邱历伟, 赛文莉. 肝细胞癌变过程中磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 mRNA扩增及临床价值. *江苏医药* 2009; 35: 308-310
- 杨秉辉, 夏景林. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 324
- Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 649-656
- Cheng W, Tseng CJ, Lin TT, Cheng I, Pan HW, Hsu HC, Lee YM. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1319-1326
- Lai JP, Sandhu DS, Yu C, Han T, Moser CD, Jackson KK, Guerrero RB, Aderca I, Isomoto H, Garrity-Park MM, Zou H, Shire AM, Nagorney DM, Sanderson SO, Adjei AA, Lee JS, Thorgerirsson SS, Roberts LR. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 1211-1222
- Man XB, Tang L, Zhang BH, Li SJ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. Upregulation of Glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int* 2005; 25: 962-966
- Lü ZL, Luo DZ, Wen JM. Expression and

- significance of tumor-related genes in HCC. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3850-3854
- 13 Coston WM, Loera S, Lau SK, Ishizawa S, Jiang Z, Wu CL, Yen Y, Weiss LM, Chu PG. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 433-444
- 14 Ligato S, Mandich D, Cartun RW. Utility of glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from other primary and metastatic lesions in FNA of the liver: an immunocytochemical study. *Mod Pathol* 2008; 21: 626-631
- 15 Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- 16 Filmus J, Capurro M. Glypican-3 and alphafetoprotein as diagnostic tests for hepatocellular carcinoma. *Mol Diagn* 2004; 8: 207-212
- 17 Nakano K, Orita T, Nezu J, Yoshino T, Ohizumi I, Sugimoto M, Furugaki K, Kinoshita Y, Ishiguro T, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Yamada-Okabe H, Tsuchiya M. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 279-284

■同行评价

本文研究了肝癌组织磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的表达及其临床病理学特征, 有一定的科学性、创新性和临床价值。

编辑 李瑞敏 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: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^a $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第 3 套为 ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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。(科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

炎症与非酒精性脂肪性肝病

谢伶俐, 周力, 李丽滨

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)发病机制尚未完全明确。近来研究发现, NAFLD与代谢综合征密切相关, 存在脂肪组织和肝脏等的天然免疫功能紊乱。来源于脂肪组织和肝脏的炎症因子可能对NAFLD的发生发展起重要作用。

谢伶俐, 周力, 李丽滨, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004

作者贡献分布: 本文综述由谢伶俐完成, 周力与李丽滨审校。

通讯作者: 周力, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科。zhouligy@yahoo.com.cn

电话: 0851-6774245

收稿日期: 2009-08-16 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Inflammation and nonalcoholic fatty liver disease

Ling-Li Xie, Li Zhou, Li-Bin Li

Ling-Li Xie, Li Zhou, Li-Bin Li, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Professor Li Zhou, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. zhouligy@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-16 Revised: 2009-09-29

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the hepatic component of the metabolic syndrome. The metabolic syndrome represents a chronic inflammatory state, and individuals with the disorder demonstrate various immunologic abnormalities. Innate immune dysfunction in adipose tissue leads to abnormal production of adipose-derived factors, some of which can inhibit hepatic fat disposal and promote lipid accumulation within hepatocytes. The latter induces generation of excessive proinflammatory cytokines, particularly when the hepatic innate immune system becomes Th-1 polarized, thus promoting the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Although sustained exposure to these inflammatory mediators generally promotes the generation of various profibrogenic factors, progression from NASH to cirrhosis is actually relatively uncommon due to reduced production of other cytokines such as Th-2 cytokines.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Inflammation; Cytokine; Metabolic syndrome; Innate immunity

Xie LL, Zhou L, Li LB. Inflammation and nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3118-3122

摘要

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征的肝脏组分。代谢综合征代表慢性炎症状态, 代谢综合征患者会呈现不同的免疫异常。脂肪组织的天然免疫功能紊乱导致机体产生异常的脂肪源性因子。某些因子抑制肝脏脂质清除, 促进其在肝细胞内蓄积, 产生脂肪变性。后者在肝脏先天性免疫系统发生Th-1极化的基础上诱导肝脏产生更多的致炎细胞因子, 促进了非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的形成。但由于Th-2等其他细胞因子减少, 尽管肝脏持续暴露于这些可以促进多种促纤维生成因子产生的致炎因子, NASH发展成肝硬化的现象却相对少见。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 炎症; 细胞因子; 代谢综合征; 先天性免疫

谢伶俐, 周力, 李丽滨. 炎症与非酒精性脂肪性肝病. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3118-3122

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3118.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致外, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括非酒精性单纯性脂肪肝以及由其演变的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化^[1]。近来研究发现, NAFLD与肥胖等代谢综合征密切相关^[2], 存在脂肪组织和肝脏等的天然免疫功能紊乱^[3], 并且可能是胰岛素抵抗的并发症^[4]。有资料显示, 肥胖以及肝脂肪变性时过多的脂肪细胞可分泌多种炎症细胞因子^[3]; 肝脏天然免疫功能紊乱可导致促炎症(Th-1)和抗炎症(Th-2)细胞因子的失调^[5]; 此外, 在胰岛素抵抗状态下, 炎症反应诱导的转录因子(如NF-κB)及多

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

种炎症细胞因子明显增高^[6]. 来源于脂肪组织和肝脏的炎症因子在NAFLD的形成与演变中发挥重要作用. 本文就炎症在NAFLD发病机制中的作用作一综述.

1 NAFLD与代谢综合征

NAFLD与代谢综合征密切相关. 代谢综合征的本质是剩余能量贮留引起的内脏脂肪过度蓄积, 以及由其诱导产生的以胰岛素抵抗为主的各种机体功能障碍, 包括肥胖、胰岛素抵抗、高脂血症和高血压等一类相关性疾病. 研究发现, NAFLD与这些代谢综合征相关疾病相伴发生, 并且NAFLD的严重程度与这些疾病的严重程度密切相关^[2]. 因此, 多数学者认为, NAFLD是代谢综合征的肝脏组分. 近来研究发现, 代谢综合征患者具有不同程度的免疫异常; 而在脂肪组织和肝脏中, 先天免疫系统功能紊乱似乎特别明显, 除了细胞因子产生异常, 还有巨噬细胞和自然杀伤T细胞产生的变化^[3].

1.1 脂肪组织中的免疫功能紊乱与代谢综合征 脂肪组织由成熟的脂肪细胞和间质细胞构成, 后者包括与免疫相关的巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞和未成熟的脂肪细胞(如前脂肪细胞). 近来研究发现, 脂肪组织作为体内最大的能量贮库, 并不是被动贮存脂肪的惰性组织, 还可能是体内最大的内分泌器官. 内脏脂肪和少部分皮下脂肪是产生调整机体能量内环境稳态和组织重塑的相关因子的主要来源, 其衍生的因子包括: (1)激素, 如瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)和抵抗素(resistin); (2)细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和组织因子(tissue factor); (3)某些神经介质调节因子和凝血调节因子, 如血管紧张素原(angiotensinogen)和纤溶酶原活化因子抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1).

研究发现, 肥胖个体脂肪组织中往往聚集了异常增多的巨噬细胞, 脂肪组织中的间质细胞(主要是巨噬细胞)是炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-6、IL-1等)的重要来源, 而成熟的脂肪细胞是产生瘦素、脂联素的主要细胞^[3,7]. 然而, 内脏脂肪和外周脂肪库所释放出的因子在数量上和质量上存在不同, 这可能与两者的淋巴细胞群体、巨噬细胞含量和脂肪细胞分化水平的差异有关^[8]. 由内脏脂肪衍生的脂肪因子比

由皮下脂肪衍生的脂肪因子对机体更为有害. 因此, 内脏性肥胖往往伴随着代谢综合征.

目前认为, 代谢综合征的发生机制是在肥胖基础上产生的胰岛素抵抗, 脂肪组织参与的亚临床炎症反应在代谢综合征的发生发展中起重要作用^[6]. 瘦素是肥胖基因的产物, 具有抑制脂肪变性、促进炎症和致纤维化作用. 脂联素通过抗炎、胰岛素增敏和促进脂肪代谢等功能对慢性肝病起一定保护作用. 抵抗素具有促进炎症作用, 并可能参与脂肪变性和纤维生成. TNF- α 、IL-6等因子可介导巨噬细胞浸润, 使肥胖个体产生炎症反应, 进一步导致胰岛素抵抗和脂肪因子的分泌失调^[7]. 代谢综合征个体往往伴随着这些因子水平的改变, 如TNF- α 、IL-6、瘦素及抵抗素水平的升高, 以及脂联素水平的降低^[3,7]. 从某种意义上来说, 代谢综合征是一种低度的系统性炎症状态.

1.2 肝脏组织中的免疫功能紊乱与代谢综合征 肝脏是机体先天性免疫系统的主要器官. 肝脏由多种类型细胞构成, 除了成熟的肝细胞和胆管细胞以外, 还有肝祖细胞、上皮细胞、星状细胞和免疫细胞等间质细胞. 其中, 大量的巨噬细胞(即枯否细胞)、自然杀伤细胞(natural killer, NK)、自然杀伤T细胞(natural killer T cell, NKT)定居于肝脏, 这些免疫细胞是天然免疫系统的重要组成部分^[3,5].

枯否细胞是肝脏衍生性细胞因子的主要来源. 肝脏中的枯否细胞来源于骨髓中的单核细胞, 其数量占机体单核-巨噬细胞系统的80%-90%^[5]. 研究发现, 枯否细胞的数量和功能可根据病变不同而发生改变. 在肥胖动物模型中, 巨噬细胞的吞噬功能受阻并可产生过多的致炎细胞因子^[9].

NK细胞和NKT细胞是肝脏中主要的淋巴细胞, 其数量超过肝脏淋巴细胞总数的50%. NK细胞和NKT细胞通过激活其TCR或NK受体, 可以产生大量Th-1和Th-2细胞因子^[10]. 在很多肝脏疾病中, NK细胞是产生IFN- γ (促炎症因子)的主要细胞. 而NKT细胞可分泌IFN- γ 和IL-4(抗炎的因子), 但具体分泌哪种因子取决于其所处的分化状态^[5]. 研究发现, ob/ob小鼠的肝脏, 由于CD4⁺ NKT细胞的凋亡增加, 使CD4⁺ NKT细胞选择性的缺失^[11]. 而CD4⁺ NKT细胞又是重要的Th-2因子(如IL-4和IL-13)的主要来源. 因此, 这些小鼠肝脏中CD4⁺ NKT细胞的缺失, 使得肝脏中其他一些分泌细胞因子的单核细胞向Th-1

■研究前沿

炎症因子参与NAFLD疾病的发生发展, 但其具体作用机制错综复杂, 如何进一步澄清其作用机制并采取措施预防病变发生、发展是当前亟待解决的问题.

■应用要点

本文阐明了炎症与NAFLD的关系,有助于进一步澄清NAFLD的发病机制,对NAFLD疾病的防治及预后估计有一定指导意义。

极化,从而导致促炎症的细胞因子如TNF- α 、IFN- γ 过量产生。

肝脏中的非免疫细胞也具有传统意义上炎症细胞的特性。研究发现,肝星状细胞能产生TGF- β 、瘦素、脂联素及血管紧张素原等^[3,7]。肝细胞和胆道细胞也能分泌TNF- α 和IL-6等细胞因子^[12]。另外,肝细胞内聚集的脂肪可激活细胞内NF- κ B信号转导通路,进一步诱导TNF- α 产生^[13]。NF- κ B的激活还能诱导肝细胞合成IL-6等细胞因子增多,引起小鼠的胰岛素抵抗;后者可以通过中和IL-6活性得到逆转。这一现象也表明肝细胞分泌的细胞因子和胰岛素抵抗之间可能存在直接联系^[14]。

2 炎症因子在NAFLD发病机制中的作用

NAFLD包括从肝脂肪变性到肝硬化一系列的肝脏疾病。脂肪组织和肝脏天然免疫功能紊乱导致的炎症细胞因子失调在NAFLD疾病发生和发展中起重要作用。

2.1 非酒精性单纯性脂肪肝 早期NAFLD为肝脂肪变性。肥胖和代谢综合征个体引起脂肪代谢异常,所释放的游离脂肪酸大量经门静脉循环到达肝脏,当肝脏的脂质输入或生物合成远大于脂质氧化或输出时,脂质便在肝细胞内蓄积,产生脂肪变性。这一过程的启动可能与脂肪因子的失衡,如TNF- α 、瘦素、抵抗素、纤溶酶原激活物抑制因子1等增多以及脂联素不足有关。

瘦素在调节非脂肪组织的脂质平衡中起重要作用。脂质代谢紊乱是NAFLD发病的前提条件, Nielsen *et al*^[15]利用同位素示踪、动静脉插管、数学模型建立等技术,评价肥胖个体内脏游离脂肪酸的代谢改变,发现释放入门静脉的游离脂肪酸的量随着内脏脂肪含量的增加而增加,表明肝脏早期脂肪酸贮留可能与内脏脂肪组织的过量脂质沉积及其脂解释放有关。此时机体瘦素分泌增多,出现高瘦素血症。ob/ob小鼠(遗传上瘦素基因突变导致瘦素缺乏)和fa/fa大鼠(遗传上瘦素受体功能缺陷)肥胖动物模型实验和肥胖个体临床试验为瘦素的抗脂肪变性作用提供了有力证据。研究发现,该两种啮齿类动物经高脂饮食处理容易诱导出肥胖及胰岛素抵抗等,并且显示明显的肝脂肪变性^[16-17]。相比之下,肥胖患者尽管表现高瘦素血症却仍然患有脂肪肝,表明可能有肝脏瘦素抵抗的发生^[18]。

脂联素通过阻止脂肪酸摄取、增加其氧化和输出等机制减少肝细胞脂质沉积; TNF- α 可

拮抗脂联素的作用。两者比率失调影响肝脂肪变性的发生的转归。Xu *et al*^[19]通过动物实验发现, ob/ob小鼠血清中TNF与脂联素的比率升高,而采用脂联素处理ob/ob小鼠可改善动物的高糖血症和胰岛素抵抗,同时减少肝肿大、肝脂肪变性、血清丙氨酸转氨酶及TNF- α 水平。Masaki *et al*^[20]采用另一种TNF- α 升高并易患肝病的肥胖症动物模型KK-Ay小鼠进行实验,发现脂联素同样可能中和动物体内高水平TNF- α 的作用,从而保护肝脏免遭LPS诱导的损伤。

2.2 NASH 当肝脏经历脂肪变性的第1次“打击”后,由于NKT细胞的耗尽引起局部抗炎症Th-2细胞因子相对不足,使肝脏长期处于促炎反应的环境之中。贮留的脂肪酸进一步激活肝细胞内NF- κ B的信号通路,诱导NF- κ B敏感的基因,从而使多种炎症介质产生增加,包括TNF- α 、IL-8和IL-6。过量的炎症因子持续从肝脏释放导致机体胰岛素抵抗^[21]。局部增多的TNF- α 和IL-8可促使肝细胞氧化应激,最后凋亡,同时招募大量炎症细胞进入肝脏^[22]。当肝脏抗氧化和抗凋亡的防御系统不能阻止肝细胞的死亡和炎症细胞的聚集时,则预示着NASH的出现。

研究发现,持续存在的脂肪因子和肝脏衍生的炎症因子的失衡对NASH的形成起重要作用。瘦素缺乏或功能缺陷不仅可致肝脂肪变性,而且与肝脏的脂毒性有关。高脂饮食诱导的SD大鼠NASH模型研究发现,血清瘦素和游离脂肪酸水平升高,肝脏瘦素受体表达及硬脂酰CoA去饱和酶的表达下降,表现为瘦素抵抗和非氧化的脂肪酸增多^[23]。TUNEL法检测发现NASH大鼠的肝细胞凋亡显著高于正常大鼠,而且随着肝组织脂肪变、炎症和坏死的加重,肝细胞的凋亡也越明显^[24]。

肝脏枯否细胞分泌的TNF- α 是各种原因所致肝脏损伤过程中最早出现的细胞因子,也被认为是促进NAFLD由脂肪变性发展为NASH的主要细胞因子。TNF- α 与脂联素比率的失调同样影响NASH的发病与转归。动物实验发现,不同NASH模型血清中TNF- α 与脂联素比率均升高,而且通过增加脂联素或降低TNF- α 活性以恢复两者正常比值的治疗可改善动物NASH^[25]。相反, Feldstein *et al*^[13]报道,先天TNF1型受体缺陷小鼠经高糖饮食处理后尽管可形成肥胖、胰岛素抵抗和高瘦素血症,但却不会形成NASH。TNF- α 升高和脂联素降低对人类NASH同样起作用。Hui *et al*^[26]通过多元回归分析发现,血清脂联素水平每下降5 mg/L患NASH的优势比(对照单纯肝脏

脂肪变性)升高6倍, 血清TNF- α 浓度每增加1 ng/L患NASH的风险增加1倍. 而恢复TNF与脂联素平衡的治疗也可使NASH患者病情好转^[27-28].

2.3 肝硬化 晚期NAFLD病变表现为肝硬化. 其发病机制可能是NASH肝细胞死亡和炎症状态触发了肝脏修复反应, 在多种因子调节下, 肝脏星状细胞被激活并增殖, 合成过量细胞外基质形成肝纤维化, 后者进一步发展为肝硬化. 但肝纤维化或肝硬化却并不是NASH病变发展的最终结局. 事实上, 大多数NASH患者甚至在很多年以后也不发展为肝硬化^[29]. 由脂肪性肝炎发展成肝硬化这一现象在NAFLD啮齿目动物模型中也不常见^[30]. 另外, 少数NASH患者发展为肝硬化后, 其肝脏脂肪变性和炎症反应往往减轻或消失. 这些现象表明, 除了致炎因子以外, 还有其他因子参与NASH向肝纤维化进展.

脂肪因子和肝脏衍生性因子可能也参与肝硬化的形成. 研究发现, 脂肪因子中的瘦素、TGF- β 、血管紧张素原和PAI-1等具有促纤维化作用^[31]; 而TNF- α 通过抑制脂联素(一种重要的肝纤维化抑制剂)的表达及活性, 可诱导这些促纤维化因子的生成^[32]. 这有助于解释肝脏炎症与纤维化之间的关联. 然而, 难以理解的是为什么呈现慢性炎症状态的肥胖和代谢综合征个体却很少发生肝纤维化.

肝脏天然免疫功能紊乱有助于澄清上述疑问. ob/ob小鼠可自发形成肥胖、2型糖尿病、血脂障碍和NASH, 但是, 尽管长期遭受肝损害和代谢综合征影响却不发生肝硬化^[33]. 给予瘦素治疗后, 发现ob/ob小鼠的肥胖和其他代谢综合征的表现得到改善, NASH也有所减轻, 但肝脏的炎症和纤维化却反而更加重了^[34]. ob/ob小鼠肝脏中的CD4 NKT细胞数量减少, 经去甲肾上腺素处理补充了NKT细胞群后, 致炎细胞因子产量下调, 提示瘦素在这一过程中起了间接的作用^[33]. 奇怪的是, ob/ob小鼠的NE治疗虽然可以下调促炎症的细胞因子, 但却又上调了胶原的基因表达, 并诱导细胞外周和窦状区发生了严重的纤维化^[35]. 这种纤维化的产生可能与肝脏CD4 NKT细胞的聚集有关^[3].

在其他肝纤维化动物模型和不同类型慢性肝病患者中, 肝脏CD4 NKT细胞是促纤维化细胞因子(如IL-4和IL-13)的主要来源. 如在慢性病毒性肝炎向肝硬化转变过程中, 肝脏蓄积的NKT细胞不变, 但NKT细胞的效应子作用却转为有利于Th-2细胞因子(如IL-4和IL-13)的产

生^[36]. 来源于CD4⁺ NKT细胞的条件培养基含有IL-4和IL-13, 采用其培养肝星状细胞可诱导胶原mRNA和蛋白质的合成^[37]. Th-2细胞因子的促纤维化作用不仅限于人类肝星状细胞, IL-13还能激活啮齿类动物的成纤维细胞^[38]. 对于IL-13遗传性缺陷的小鼠, 尽管有受损伤诱导的其他促纤维化因子(如TGF- β)的存在, 但却不发生肝硬化, 表明IL-13可能是诱导肝纤维化的主要介质^[39]. IL-13怎样影响代谢综合征中失调的其他促纤维化和抗纤维化因子的功能, 进而参与NASH向肝硬化的演进, 有待进一步研究证实.

3 结论

NAFLD是代谢综合征的肝脏组分. 代谢综合征是一种低度的系统性炎症状态, 往往伴随着炎症介质水平的改变. 肝脂肪变性和NASH的发生是脂肪因子和肝脏衍生的致炎细胞因子过量产生的结果. 因此, NAFLD的早期两种病变在代谢综合征个体中很常见. 然而, 尽管肝脏持续的暴露于具有促进多种促纤维生成因子产生的炎症介质之下, 但由NASH发展为肝硬化的现象却相对少见, 这一矛盾反映了肝硬化的发生需要另外因子的参与, 如Th-2等细胞因子. 有必要深入研究代谢性应激状态下肝脏重塑的机制, 从而进一步澄清炎症在NAFLD发病机制中的作用以及采取措施预防病变进展.

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 2 Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 185-192
- 3 Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 702-707
- 4 Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007; 91: 1125-1149, ix
- 5 Li Z, Diehl AM. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 565-571
- 6 Navab M, Gharavi N, Watson AD. Inflammation and metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 459-464
- 7 Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009; 50: 957-969
- 8 Atzmon G, Yang XM, Muzumdar R, Ma XH, Gabriely I, Barzilai N. Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots. *Horm Metab Res* 2002; 34: 622-628
- 9 Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;

■同行评价

本文就炎症在NAFLD发病机制中的作用进行综述, 内容新颖、全面, 具有较好的学术价值和可读性.

- 12: 57-65
- 10 Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 2002; 123: 1304-1310
- 11 Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002; 296: 553-555
- 12 Strazzabosco M, Spirli C, Okolicsanyi L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 244-253
- 13 Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-194
- 14 Cai D, Yuan M, Frantz DE, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190
- 15 Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113: 1582-1588
- 16 Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 1996; 13: 18-19
- 17 Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543
- 18 Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 537-556
- 19 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 20 Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-184
- 21 Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132: 2169-2180
- 22 Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1023-1031
- 23 Begriche K, Lettéron P, Abbey-Toby A, Vadrot N, Robin MA, Bado A, Pessayre D, Fromenty B. Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E939-E951
- 24 Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang XD. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr* 2008; 138: 1866-1871
- 25 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 26 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 27 Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Mantzoros CS. Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obes Res* 2003; 11: 1048-1054
- 28 Kopp HP, Krzyzanowska K, Möhlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, Schernthaner G. Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 766-771
- 29 Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-121
- 30 Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104
- 31 Frühbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004; 2: 197-208
- 32 Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* 2005; 54: 133-140
- 33 Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40: 434-441
- 34 Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37: 206-213
- 35 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438-445
- 36 de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004; 173: 1417-1425
- 37 Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured L90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25: 420-428
- 38 Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103: 779-788
- 39 Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, Wakefield LM, Letterio JJ, Wynn TA. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* 2004; 173: 4020-4029

消化内镜诊疗相关性穿孔的内镜治疗现状

刘明

刘明, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化病研究所 厦门市消化疾病诊治中心 福建省厦门市 361004

通讯作者: 刘明, 主任医师, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心. ming.liu@xmzsh.com

电话: 0592-2993170 传真: 0592-2993170

收稿日期: 2009-07-19 修回日期: 2009-09-30

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Recent advances in endoscopic therapy for diagnostic and therapeutic endoscopy-associated perforations of the digestive tract

Ming Liu

Ming Liu, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Affiliated to Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Ming Liu, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Affiliated to Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China. ming.liu@xmzsh.com

Received: 2009-07-19 Revised: 2009-09-30

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

As diagnostic and therapeutic endoscopy is more widely applied in clinical practice, endoscopy-associated perforations of the digestive tract have become more and more common. Among patients with endoscopy-associated perforations, few can be cured by conservative therapy, and the majority need to undergo laparoscopic or surgical operations to avoid serious consequences. However, the development of new medical instruments makes it possible to effectively and promptly manage endoscopy-related perforations via endoscopic suturing and closure.

Key Words: Perforation; Suture; Endoscopic therapy

Liu M. Recent advances in endoscopic therapy for diagnostic and therapeutic endoscopy-associated perforations of the digestive tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3123-3127

摘要

随着消化内镜诊疗技术的普及和不断发展应用, 与其操作相关的消化系穿孔在临床上越来越常见, 其中少数小穿孔通过系统的内科保守治疗可以自愈, 但大部分穿孔仍然需要及时行腹腔镜或者外科手术处理, 以免引发严重后果. 随着新型消化内镜和治疗器械的不断开发应用, 越来越多的与消化内镜诊疗相关的穿孔可以通过适当的内镜下穿孔的闭合方法进行即刻缝合或者封堵, 从而避免了手术, 也为进一步开展现代消化内镜下手术提供了有力的技术和心理保障.

关键词: 穿孔; 缝合; 内镜疗法

刘明. 消化内镜诊疗相关性穿孔的内镜治疗现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3123-3127

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3123.asp>

0 引言

消化系穿孔是临床上常见的急症之一, 大部分为病理性, 如消化性溃疡及肿瘤等, 少数为医源性穿孔, 如消化系狭窄的扩张, 息肉的切除等. 随着消化内镜治疗技术的不断创新与发展, 如黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)和黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)及经自然腔道内镜手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES)技术等, 伴随的相关的内镜治疗性穿孔的发生率也随之增加, 需要及时妥善实施镜下处理, 以避免腹膜炎的发生和追加使用创伤性大的腔镜手术或者普通手术修补穿孔. 内镜下穿孔修补技术方法目前已不仅仅限于使用常规的钛夹技术进行小穿孔的夹闭, 也出现了许多新方法和多种类型专用的内镜辅助缝合器械, 以此对消化系内镜治疗相关性穿孔及造口进行内镜下更有效可靠的缝合关闭. 现仅就医源性消化系穿孔的消化内镜下修补技术的现状作一总结, 供同行参考. 消化系支架置入后引发的支架压迫性穿孔不属于本文讨论之列.

■背景资料

近年来, 消化内镜诊疗相关的消化系穿孔在临床上越来越常见. 随着新型消化内镜和治疗器械的不断开发应用, 许多与消化内镜诊疗相关的穿孔可以通过适当的内镜下穿孔的闭合方法进行即刻缝合或者封堵, 从而避免了手术.

■同行评议者

季国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科; 董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■研发前沿

越来越多的内镜下缝合装置正在不断被研发出来,目前多数还处于动物实验阶段,少部分器械已进入临床初步运用。

1 可以引发穿孔的消化内镜治疗技术

除了常规消化内镜检查偶尔造成胃肠道穿孔外,与消化内镜操作有关的大部分穿孔为各种消化内镜治疗术所引发的严重并发症之一,包括:(1)各类良恶性狭窄扩张术;(2)息肉电切术;(3)硬化剂注射术;(4)EMR;(5)ESD;(6)十二指肠乳头切开术;(7)而NOTES造成的人为胃肠管壁内造口也属于此范畴;(8)其他少见的情况,如套扎术、经皮内镜下胃空肠造瘘术(percutaneous endoscopic gastrojejunostomy, PEGJ)等。

2 镜下治疗性穿孔的种类

根据穿孔发生的时间分为:急性穿孔和迟发性穿孔。前者指在操作过程中发生的镜下可见的穿孔,后者为在内镜手术完成24 h后发生的穿孔;根据穿孔发生的大小分型:大穿孔(直径或者长度>2 cm),中穿孔(1-2 cm),小穿孔(<1 cm),隐匿性穿孔(微小穿孔);根据发生的解剖部位分为:食管穿孔,胃穿孔,结肠穿孔及小肠穿孔;根据发生穿孔的可预见性分为:并发症性穿孔和治疗性穿孔。

3 治疗穿孔的内镜辅助器械

除了常规使用的胃肠镜外,一般推荐使用双通道治疗型内镜。如不具备,可以采用内镜辅助管道。消化系穿孔的内镜辅助治疗器具包括:(1)金属夹;(2)尼龙圈结扎装置;(3)套扎器;(4)组织胶或者生物蛋白胶;(5)内镜辅助管道;(6)被膜支架;(7)专用缝合器械;(8)其他。

4 消化系穿孔的内镜治疗方法

4.1 带膜支架封堵术 对于食管穿孔,由于操作空间有限,钛夹技术有时难以充分发挥作用,可以使用被膜食管支架如西格玛支架对穿孔实施临时短期封堵处理,待穿孔愈合后再适时取出。但对于胃和结肠穿孔,因为管腔大,蠕动强,故不适用。

4.2 金属夹闭合术 金属夹闭合术是目前为止使用最为广泛的技术,近年来国内外均有大量成功文献报道。对于小穿孔使用一个或者几个金属夹就可满意封闭穿孔。对于大穿孔,由于金属夹跨度有限,不能一次性将穿孔夹闭,可以在适当吸闭消化系管腔,充分缩小穿孔的情况下,利用多个金属夹完成穿孔的闭合。也可利用双通道治疗内镜,先通过第一通道插入大组织钳或者抓持钳将穿孔边缘先行拉拢,然后再经过第

二通道使用金属夹把已经聚拢的穿孔夹闭固定缝合^[1-3]。国外有最多使用22个钛夹完成闭合ESD后黏膜缺损的手术报道^[4]。目前最为常用的两爪金属夹除了有日本的Olympus的金属夹推送器可以重复使用的系列产品Quick Clip外,还有美国Boston公司的一次性产品Resolution Clip。借助特制的“8”字形金属环,金属夹技术可以更加高效地关闭了结肠EMR所导致平均直径16.3 mm的黏膜缺损^[5]。三爪金属夹产品则为美国的Cook公司的Triclip,目前临床应用报告不多。2008年德国还推出了一种全新的Over-The-Scope-Clip system(OTSC)金属夹系统,他为一种镍钛记忆合金耙状夹预先装置在内镜前端的释放套管内,利用专用的抓持钳将病变周围组织拉入套帽内或者负压吸引将病变及周围黏膜吸入套帽内,然后利用配套旋转扳机系统经过连线把耙状夹牵拉释放,耙状夹脱离套帽后迅速恢复原状对合,将组织咬合在一起,从而起到止血和封闭穿孔的作用。此耙状夹有带刺和无刺两种类型。动物实验和初步的临床小样本试验显示这一新器械较传统的金属夹能够更有效地封闭创面和NOTES性穿孔,目前缺乏大样本的对比观察资料,正确评估尚难^[6-9]。

现有的金属夹技术各有特点,可以根据使用者的具体情况来选用。金属夹治疗的有效性主要取决于穿孔的部位和类型,但是金属夹的使用技巧也是不容忽视的方面。动物实验后解剖显示内镜下可以有效地对10-20 mm长的结肠穿孔实施金属夹缝合治疗,甚至长度达50 mm结肠的裂口也可达到满意黏膜及黏膜下层的闭合,从而有效预防继发性腹膜炎的发生^[10]。

日本学者对于6例人体EMR导致的胃壁穿孔利用穿孔处的网膜作为补片,将其通过穿孔拉入胃腔内,再使用金属夹把网膜固定在穿孔周围胃黏膜上,从而达到封堵穿孔的目的,全部取得满意结果^[11]。近期的动物实验也进一步证实了此网膜补片-钛夹固定封堵术方法的有效性^[12]。但需要更多的临床病例加以证实其安全性和有效性。

4.3 生物胶黏堵术 对于小穿孔及可能的发生隐匿性穿孔创面可以使用组织胶如生物蛋白胶等医用黏合剂实施内镜直视下局部喷涂封堵覆盖处理。遇到较大的穿孔,如果钛夹技术等也不能保证完全可靠的封闭创面,可以在完成缝合术后再辅助以局部涂布组织胶添堵缝合后的缝隙及覆盖创面,以期待隔离及保护创面,减少胃肠

液对创面的侵蚀作用和漏出,促进创面的愈合,防止病情扩展蔓延,结合胃肠道减压及抗生素使用等内科保守措施,多能避免再通过手术方法补救^[13]。

4.4 镜下联合治疗术 遇到较大的穿孔,有时单独使用钛夹技术常不能满意地关闭创口,此时可以利用双腔治疗内镜或者辅助管道或者双内镜技术,结合现有的常用治疗器械对创口实施镜下联合缝合治疗。推荐镜下同时联合使用Olympus尼龙圈结扎装置和钛夹技术。基本操作步骤为根据穿孔的大小选择适当规格大小的尼龙圈先套放安置在穿孔处,使穿孔位居于张开的尼龙圈中央,然后再使用两个以上的钛夹将尼龙圈多点钳夹固定在穿孔周围正常黏膜上,进而收拢缩小尼龙圈,把穿孔边缘黏膜对拉靠拢或者成向心性聚拢,封闭穿孔。可以分为2种形式:(1)平拉式,利用2个钛夹将单个尼龙圈远近端分别夹持在穿孔远近侧正常黏膜组织上,然后收拢尼龙圈使穿孔远近黏膜边缘靠拢,使其圆形穿孔变为长裂口,然后再利用钛夹把剩余裂口夹闭。根据具体情况,可以运用数个尼龙圈和钛夹在穿孔的多个部位多点呈平行状实施缩小穿孔面积操作,最后再单独追加使用钛夹完成整个缝合步骤;(2)荷包式,利用多个钛夹将单个尼龙圈等距离均匀呈环状固定在穿孔周围正常黏膜上,再收拢尼龙圈,如同收紧荷包口样聚拢穿孔周围组织覆盖穿孔,从而实现封闭穿孔的目的。但过多钛夹会发生尼龙圈最后缩小时相互交叉顶撞现象,穿孔黏膜边缘易产生间隙而影响缝合效果,所以推荐使用4-6个钛夹为宜。此种内镜联合缝合技术最早由日本学者松田在2003年美国DDW上作了专题介绍,次年论文正式发表在*Gastrointest Endoscopy*^[1,14]。2005年以来我们应用本技术治疗了8例包括直肠穿孔和食管胃吻合口瘘等不同类型的患者,均达到满意的缝合巨大黏膜缺损或者穿孔的效果^[15]。

4.5 套扎技术 利用传统的套扎器或者辅以套扎器对结肠息肉切除时发生的小穿孔周围组织实施吸引套扎处理也有成功的个案报道,效果佳,但病例少,需要进一步使用以评估其疗效^[16-17]。

4.6 专用工具缝合术 以上内镜下穿孔的缝合技术并不是真正意义上的内镜缝合技术,仅起到利用黏膜及黏膜下层组织来封闭穿孔的目的,对消化系缺损的固有肌层覆盖和封堵而已,无对合作用,故穿孔的完整愈合时间较长。随着消化内镜治疗技术的不断深入发展和实际需

要,穿孔的有效缝合治疗将成为新的挑战。国外近年来正在不断研发新的专用镜下辅助治疗器具以应对当代多种镜下手术并发的胃肠道穿孔及时有效的缝合治疗和彻底关闭以完成腹腔内器官手术治疗为目的的人为消化系管壁内造口(NOTES)的需要,实现真正意义上的消化系管壁的全层缝合术,从而达到更加可靠的穿孔的缝合,降低手术风险和治疗费用,缩短住院时间,为进一步广泛深入开展有关消化系病变的切除及管壁切开造口术,如ESD和NOTES,提供有效的应急措施和可靠的手段保障。

国外除了利用现有的专用器械外,如Bard EndoCinch suturing device(Davol, Cranston, RI)^[18-19]和Plicator(NDO, Mansfield, Mass, USA)^[20-21]。其他已经应用于临床的缝合装置还有Sew-Right(Cook Medical Inc, Bloomington, Ind, USA)^[20]EsophyX和StomaphyX(Endogastric Solutions, Redmond, Wash, USA)^[22]。目前仍然处于动物实验阶段的专用内镜缝合装置包括:Eagle Claw(Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan)^[23]及GProx(USGI Medical, San Clemente, Calif, USA)^[24]。上述产品外形较粗大,结构复杂,价格昂贵,安装及使用均较繁杂,目前主要应用于GERD的内镜下治疗,未来能否在胃壁穿孔的治疗中发挥重要作用尚不得而知,且实际临床使用前景还不太明朗。

目前有部分内镜下缝合技术已经初步应用于临床,取得预期的疗效。现仅就几种较成熟的简单缝合技术作一简介。(1)多夹释放装置InScope Multi-Clip Applier(IMCA)(InScope, a division of Ethicon Endo-Surgery, Cincinnati, Ohio, USA),此装置用类似订书机的原理,可以一次纵向先后排列安置4个钛夹于释放管道内,释放管最前端的大跨度组织抓持固定钳并可以根据实际需要进行旋转,并可以反复开闭以寻求最佳的钩拉聚拢穿孔边缘效果,直视下确认穿孔对应边缘被夹闭合拢后,再将管道腔内的第1个钛夹推送释放把穿孔边缘彼此对合固定,重复操作即可先后在穿孔的不同位置连续释放另外3个钛夹,依次并排将穿孔完全关闭缝合。但此装置需要使用3.2 mm通道的内镜。初步动物实验表明,此装置可以迅速而满意关闭2 cm的结肠穿孔。目前尚缺乏临床上的实际使用经验,效果有待进一步评估^[25-26];(2)组织闭合装置Tissue Approximation Device(TAD; InScope, Ethicon Endo-Surgery, Inc, Cincinnati, Ohio, USA),此装置由前

■名词解释

内镜缝合技术:指在消化内镜直视下通过专用缝合器械将消化系穿孔闭合封堵的技术。

■同行评价

本综述具有一定实际应用意义,对临床内镜下治疗消化内镜诊疗相关性穿孔有较好的指导价值。

端系一T形金属棒的聚丙烯线、长而中空可以容纳缝合线的穿刺针和打结剪切装置3部分组成。操作步骤为先将内置前端系一T形金属棒的聚丙烯线穿刺针刺过穿孔一侧边缘并释放T形金属棒,再把另一系T形金属棒的聚丙烯线穿刺针刺过穿孔另一侧边缘并释放T形金属棒,最后将2根缝线打结收紧缝合穿孔。最初的动物实验和前期的临床试验显示此方法可以有效缝合长度5 cm的穿孔。其优点为此装置结构简单,穿刺管身纤细,可以通过普通内镜常规的2.8 mm活检通道,在内镜直视下短时间可以完成多对缝合线的准确穿刺和打结固定缝合操作,是一种比较有发展前景的技术,值得推荐^[27-28]。

4.7 封堵伞技术 封堵伞技术(cardiac occluder device)移植沿用心房间隔缺损封堵伞技术。2个由镍钛记忆合金编织而成扁圆盘形状的带膜网状封堵伞,2伞之间中心部经由一短细蒂相连,将其后部与推送器管内连接杆旋接后,纵轴向充分压缩后逐步反向置入推送器套管内的前部,推送器前段由内镜活检通道插入至内镜前端显露于视野内,靠近消化系管壁穿孔及内造口处,在直视条件下把推送器前端对准穿孔并插入,进入腹腔内一定长度后,固定推送器内推杆,回退推送器外套管先将前端封堵伞释放于穿孔的腹腔侧,前端腹腔伞失去外套管的约束后迅速张开恢复扁圆伞形,然后适当整体外拉推送器,使得腹腔堵漏伞紧贴穿孔的浆膜面,再进一步回退外套管把后部封堵伞释放于胃腔内,确认封堵伞恢复记忆形状,完全膨胀封堵穿孔无误后,顺时针向旋转推送器内杆将封堵伞完全脱离,依此将穿孔或者胃造口封堵。目前本技术仅有成功的动物实验,还没有人体初步应用的临床报告,但是根据目前大量成功的心房间隔缺损封堵伞的临床应用结果报告推理,其应该是一种有发展前途的胃肠道穿孔及内造口封闭技术,除了需要做进一步的胃肠道方面的临床试验外,封堵伞昂贵的价格以及自身不可吸入性可能是制约其广泛被采用的因素^[29]。

5 结论

随着消化内镜诊疗技术的不断发展与创新应用,并发胃肠道穿孔及人为管壁造口的状况将越来越多,临床上迫切需要一种或者几种简便而行之有效的内镜直视下的缝合技术,为深入广泛开展有关的多种内镜下治疗技术提供有力的辅助器械和可靠的技术支持,从而可以使消化内

镜治疗技术造成的胃肠道穿孔并发症危害的严重性降低到最低限度,同时也为手术者可以从容进行相关的内镜下治疗操作提供了充分的心理保障,减少术者的后顾之忧。

6 参考文献

- Matsuda T, Fujii T, Emura F, Kozu T, Saito Y, Ikematsu H, Saito D. Complete closure of a large defect after EMR of a lateral spreading colorectal tumor when using a two-channel colonoscope. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 836-838
- Tsunada S, Ogata S, Ohyama T, Ootani H, Oda K, Kikkawa A, Ootani A, Sakata H, Iwakiri R, Fujimoto K. Endoscopic closure of perforations caused by EMR in the stomach by application of metallic clips. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 948-951
- Baron TH, Gostout CJ, Herman L. Hemoclip repair of a sphincterotomy-induced duodenal perforation. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 566-568
- Choi KD, Jung HY, Lee GH, Oh TH, Jo JY, Song HJ, Hong SS, Kim JH. Application of metal hemoclips for closure of endoscopic mucosal resection-induced ulcers of the stomach to prevent delayed bleeding. *Surg Endosc* 2008; 22: 1882-1886
- Fujii T, Ono A, Fu KI. A novel endoscopic suturing technique using a specially designed so-called "8-ring" in combination with resolution clips (with videos). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1215-1220
- Schurr MO, Hartmann C, Ho CN, Fleisch C, Kirschniak A. An over-the-scope clip (OTSC) system for closure of iatrogenic colon perforations: results of an experimental survival study in pigs. *Endoscopy* 2008; 40: 584-588
- Kirschniak A, Kratt T, Stüker D, Braun A, Schurr MO, Königsrainer A. A new endoscopic over-the-scope clip system for treatment of lesions and bleeding in the GI tract: first clinical experiences. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 162-167
- Repici A, Arezzo A, De Caro G, Morino M, Pagano N, Rando G, Romeo F, Del Conte G, Danese S, Malesci A. Clinical experience with a new endoscopic over-the-scope clip system for use in the GI tract. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 406-410
- Schurr MO, Arezzo A, Ho CN, Anhoek G, Buess G, Di Lorenzo N. The OTSC clip for endoscopic organ closure in NOTES: device and technique. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2008; 17: 262-266
- Raju GS, Pham B, Xiao SY, Brining D, Ahmed I. A pilot study of endoscopic closure of colonic perforations with endoclips in a swine model. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 791-795
- Minami S, Gotoda T, Ono H, Oda I, Hamanaka H. Complete endoscopic closure of gastric perforation induced by endoscopic resection of early gastric cancer using endoclips can prevent surgery (with video). *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 596-601
- Dray X, Giday SA, Buscaglia JM, Gabrielson KL, Kantsevov SV, Magno P, Assumpcao L, Shin EJ, Reddings SK, Woods KE, Marohn MR, Kalloo AN. Omentoplasty for gastrotomy closure after natural orifice transluminal endoscopic surgery procedures (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 131-140
- Mutignani M, Iacopini F, Dokas S, Larghi A, Familiari P, Tringali A, Costamagna G. Successful endoscopic closure of a lateral duodenal perforation

- at ERCP with fibrin glue. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 725-727
- 14 Katada C, Muto M, Manabe T, Boku N, Ohtsu A, Yoshida S. Esophageal stenosis after endoscopic mucosal resection of superficial esophageal lesions. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 165-169
 - 15 刘明, 任建林, 叶震世, 王琳, 陈建民, 施华秀, 蔡宝英, 许立新, 杨柳珠, 吕苗, 陈丽娟. 内镜下巨大消化道黏膜缺损联合缝合术. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 262-265
 - 16 Moon SY, Park CH, Yoon SM, Chung Y, Chung YW, Kim KO, Hahn TH, Yoo KS, Park SH, Kim JH, Park CK. Repair of an endoscopic submucosal dissection-induced rectal perforation with band ligation. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 160-161; discussion 161
 - 17 Fan CS, Soon MS. Repair of a polypectomy-induced duodenal perforation with a combination of hemoclip and band ligation. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 203-205
 - 18 Kadirkamanathan SS, Evans DF, Gong F, Yazaki E, Scott M, Swain CP. Antireflux operations at flexible endoscopy using endoluminal stitching techniques: an experimental study. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 133-143
 - 19 Swain P, Park PO, Mills T. Bard EndoCinch: the device, the technique, and pre-clinical studies. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13: 75-88
 - 20 Chuttani R. Endoscopic full-thickness plication: the device, technique, pre-clinical and early clinical experience. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13: 109-116, ix-x
 - 21 Pleskow D, Rothstein R, Kozarek R, Haber G, Gostout C, Lembo A. Endoscopic full-thickness plication for the treatment of GERD: long-term multicenter results. *Surg Endosc* 2007; 21: 439-444
 - 22 Rosen M, Ponsky J. Wilson-Cook sewing device: the device, technique, and preclinical studies. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13: 103-108
 - 23 Bergman S, Mikami DJ, Hazey JW, Roland JC, Dettorre R, Melvin WS. Endolumenal fundoplication with EsophyX: the initial North American experience. *Surg Innov* 2008; 15: 166-170
 - 24 Chiu PW, Lau JY, Ng EK, Lam CC, Hui M, To KF, Sung JJ, Chung SS. Closure of a gastrotomy after transgastric tubal ligation by using the Eagle Claw VII: a survival experiment in a porcine model (with video). *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 554-559
 - 25 Swain P. The ShapeLock system adapted to intragastric and transgastric surgery. *Endoscopy* 2007; 39: 466-470
 - 26 Raju GS, Ahmed I, Xiao SY, Brining D, Poussard A, Tarcin O, Shibukawa G, Dawson K, Knight G, Tanguay R, Hull J. Controlled trial of immediate endoluminal closure of colon perforations in a porcine model by use of a novel clip device (with videos). *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 989-997
 - 27 Trevisani L, Cifalà V, Sartori S, Gilli G, Matarese G, Abbasciano V. Unsedated ultrathin upper endoscopy is better than conventional endoscopy in routine outpatient gastroenterology practice: a randomized trial. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 906-911
 - 28 Bergström M, Swain P, Park PO. Early clinical experience with a new flexible endoscopic suturing method for natural orifice transluminal endoscopic surgery and intraluminal endosurgery (with videos). *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 528-533
 - 29 Perretta S, Sereno S, Forgione A, Dallemagne B, Coumaros D, Boosfeld C, Moll C, Marescaux J. A new method to close the gastrotomy by using a cardiac septal occluder: long-term survival study in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 809-813

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》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EMBase/Excerpta Medica, EM)和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ)收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》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. (科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

靶向Pokemon基因shRNA重组质粒的构建及其对HepG2细胞生长的影响

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安

■背景资料

肝细胞癌(HCC)的发生是多步骤、多阶段的过程, 此过程的实现需要多个癌基因的激活。近年来研究发现的Pokemon基因控制着细胞突变的整个过程。

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30800968

作者贡献分布: 王波与张全乐对此文所作贡献均等; 此课题由张全乐、王波、刘梅及田德安设计; 研究过程由张全乐、晏维及夏丽敏完成; 数据分析由张全乐完成; 论文书写由王波与田德安完成。

通讯作者: 田德安, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tiandeanwh@medmail.com.cn

电话: 027-83663611

收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-28

Short hairpin RNA-mediated downregulation of the Pokemon gene suppresses proliferation and promotes apoptosis in HepG2 cells

Bo Wang, Quan-Le Zhang, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian

Bo Wang, Quan-Le Zhang, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800968

Correspondence to: De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tiandeanwh@medmail.com.cn

Received: 2009-08-18 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To construct recombinant plasmids containing short hairpin RNA (shRNA) targeting the Pokemon gene and investigate the effects of shRNA-mediated downregulation of the Pokemon gene on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells.

METHODS: Three shRNAs were designed according to the coding sequence of the Pokemon gene and used to construct recombinant plasmids. The recombinant plasmids were trans-

ected into HepG2 cells using Lipofectamine 2000. The expression of Pokemon mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Cellular proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of H-ras and β -catenin genes was detected by RT-PCR.

RESULTS: Three recombinant plasmids were successfully constructed. The expression of Pokemon mRNA and protein was obviously downregulated in HepG2 cells transfected with the recombinant plasmids. The best silencing effect was achieved in cells transfected with the pshRNA2 plasmid. The expression levels of Pokemon mRNA and protein were downregulated by 75.2% and 72.61%, respectively. MTT assay indicated that pshRNA2 transfection could inhibit cellular proliferation and promote apoptosis. After pshRNA2 transfection, the expression of H-ras mRNA was downregulated ($P < 0.05$) in HepG2 cells though no significant change was observed in β -catenin expression.

CONCLUSION: The recombinant plasmids containing shRNA targeting the Pokemon gene can specifically downregulate Pokemon expression. The Pokemon protein can promote proliferation and inhibit apoptosis in HepG2 cells possibly via downregulation of H-ras expression.

Key Words: Pokemon; Short hairpin RNA; Cell proliferation; Apoptosis; H-ras

Wang B, Zhang QL, Yan W, Xia LM, Liu M, Tian DA. Short hairpin RNA-mediated downregulation of the Pokemon gene suppresses proliferation and promotes apoptosis in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3128-3133

摘要

目的: 观察携带shRNA的重组质粒对肝癌细胞HepG2增殖及凋亡的影响, 并初步探讨其分子机制。

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

方法: 设计3对针对Pokemon基因不同位点的shRNA片段的真核表达载体, 脂质体介导转染肝癌细胞株HepG2细胞. RT-PCR及Western blot检测转染前后Pokemon mRNA及蛋白质的表达, MTT和流式细胞仪分析转染后细胞增殖及凋亡的变化, RT-PCR检测其可能的下游因子 β -catenin及H-ras的表达.

结果: 成功构建含shRNA片段的重组质粒, 依次命名为pshRNA1、2、3. 转染HepG2细胞后, Pokemon基因的mRNA及蛋白质表达水平明显下调, 以pshRNA2最强, 抑制率分别为75.2%(RNA水平)和72.61%(蛋白质水平). MTT显示pshRNA2可明显抑制细胞增殖; 流式细胞仪测定转染后细胞凋亡增加; RT-PCR显示下游因子H-ras的表达明显降低($P<0.05$), 而 β -catenin的表达没有变化($P>0.05$).

结论: 采用RNAi技术可以特异性阻断Pokemon基因的表达; Pokemon基因有促进肝癌细胞株增殖及抑制其凋亡的作用, 该效应可能与下调其下游因子H-ras的表达有关.

关键词: Pokemon; 短发夹状RNA; 细胞增殖; 细胞凋亡; H-ras

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安. 靶向Pokemon基因shRNA重组质粒的构建及其对HepG2细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3128-3133
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3128.asp>

0 引言

Pokemon基因, 又称POK红系髓性致癌因子(POK erythroid myeloid ontogenic factor). 作为POK家族转录抑制因子的一员, 他不仅与胚胎发育和细胞分化有关, 而且在某些组织的细胞恶性转化过程中起着关键作用. 近年来研究表明, Pokemon基因在淋巴瘤、乳腺癌及非小细胞肺癌中均有很高的表达^[1-3]. 我们前期的研究结果显示, 原发性肝癌患者癌组织中Pokemon基因的表达明显上调. 在此基础上, 本实验拟构建靶向Pokemon基因的shRNA重组质粒, 观察其对肝癌细胞株HepG2增殖和凋亡的影响, 并初步探讨其可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2由本实验室保存; DMEM培养液购于Invitrogen公司; 100 mL/L胎牛血清购于Clark公司; 兔抗人Pokemon多克隆抗体购于ABCAM公司; 脂质体Lipofectamine

2000购于Invitrogen公司; pGenesil-2载体购于武汉晶赛公司; 限制性内切酶BamH I 和HindIII 购于TaKaRa公司; 超纯质粒小量提取试剂盒购于北京博大泰克公司; MTT购于Sigma公司; 人Annexin V-FITC试剂盒购于晶美公司.

1.2 方法

1.2.1 靶向Pokemon基因的shRNA重组质粒的构建: 根据NCBI GenBank上公布的Pokemon基因(NM_015898)全长序列, 遵循shRNA的设计原则, 利用Promega公司的shRNA在线软件筛选出3条19 nt的序列交由上海生工生物技术有限公司合成, 分别为: shRNA1, (5'-CAGCAGAACGTGTACGAGA-3', 干扰位点为363-381); shRNA2, (5'-GCTGGACCTTGATAGTCAA-3', 干扰位点为578-596); shRNA3, (5'-GCACAGACACCTCAGAAA-3', 干扰位点为1595-1613). 所选择的序列通过BLAST在GenBank上比对, 证明所选择的序列与其他基因没有同源性. 阴性对照序列为ACTACCGTTGTTATAGGTG, 此序列不与任何人类基因序列同源. 序列两端分别引入BamH I 及HindIII酶切位点. 将上述寡核苷酸序列克隆到载体上. 重组质粒转化感受态细胞, 卡那霉素抗性的LB培养液恒温摇床过夜, 送北京诺赛基因公司测序, 质粒测序结果通过Chromas软件进行分析, 证实插入的shRNA片段的碱基序列与设计序列完全一致.

1.2.2 细胞培养和脂质体转染: HepG2细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置于50 mL/L培养箱, 37℃恒温培养. 取对数生长期的细胞, 接种于6孔板及96孔板内, 待细胞达到85%-90%的融合, 按照质粒: 脂质体比例为4 μ g: 10 μ L加入Lipofectamine 2000及质粒复合物转染细胞, 4 h后换上新鲜的培养液. 实验设立重组质粒组(pshRNA1、2、3)、对照质粒组及脂质体空白对照组.

1.2.3 Pokemon基因表达的检测: 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测Pokemon基因RNA的表达. 收集转染后48 h的HepG2细胞提取总RNA. Pokemon基因引物的上游序列5'-GGTCGCAGAAGGTGGAGA-3', 下游序列5'-GGTCGTAGTTGTGGGCAAA-3'; β -actin引物上游序列5'-GTTGCGTTACACCTTTCTTG-3', 下游序列5'-GACTGCTGTACCTTCACCGT-3'. PCR的反应体系为25 μ L: 逆转录产物1 μ L, 10 \times Taq酶反应缓冲液2.5 μ L, MgCl₂ 2.0 μ L, dNTP 1 μ L, 上下游引物各1 μ L, Taq酶1 μ L, 去离子水补足25 μ L.

■ 研发前沿

Pokemon基因与人类肿瘤关系的研究尚处于起步阶段, 人们对其在肿瘤尤其是实体瘤中的作用及机制知之甚少. 由于Pokemon基因控制着细胞突变的整个过程, 其作为上游基因可以激活其他癌基因, 加速肿瘤进展, 所以抑制Pokemon基因的表达可以影响其他癌基因的表达, 减缓肿瘤发展, 提高肿瘤的治疗效果.

■创新盘点

由于Pokemon-ARF-Hdm2-P53-P21通路在实体肿瘤的发生中频繁缺失,所以Pokemon基因在HCC中的信号传导通路尚不十分清楚。本研究发现其可能通过特异性的诱导下游分子H-ras的表达来调控HCC细胞的生长过程。

循环参数: 95℃, 5 min后, 94℃, 40 s, 57.7℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min. 扩增后的产物取5 μL进行2%的琼脂糖凝胶电泳, 然后在紫外凝胶成像仪上进行拍照, 利用相关图像分析软件分析电泳条带的灰度值, mRNA表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值。

1.2.4 Pokemon蛋白表达的检测: 采用免疫印迹法(Western blot)检测Pokemon蛋白的表达。收集转染后48 h的HepG2细胞, 用细胞裂解液抽提细胞总蛋白, Bradford法检测总蛋白浓度, 取40 μg总蛋白进行电泳。10% SDS-PAGE中蛋白分离完毕后将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%的封闭液封闭2 h, 加入一抗(兔抗人Pokemon蛋白多克隆抗体, 1:200), 4℃过夜; 洗膜, 再加入二抗(羊抗兔IgG-HRP, 1:10 000)孵育1 h, 洗膜后进行ECL显色。利用相关图像分析软件扫描分析条带的灰度值。Pokemon蛋白表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值。

1.2.5 细胞增殖活性的检测: 采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的增殖活性。将转染处理组及空白对照组处于对数生长期的细胞以4000个/孔接种96孔板, 分别于24、48、72、96及120 h分别弃去培养基, 每孔加入5 g/L的MTT溶液继续培养4 h, 弃去MTT, 各孔加入150 μL的DMSO, 室温下震荡10 min, 在酶标仪 A_{490nm} 处测定各孔的吸光度值(A值), 绘制细胞的生长曲线, 并计算细胞的生长抑制率。细胞生长抑制率 = (阴性对照组A值-转染组A值)/阴性对照组A值 \times 100%。

1.2.6 细胞凋亡的检测: 采用流式细胞术检测细胞的凋亡。取对数生长期HepG2细胞以 1×10^6 接种24孔板, 于转染后培养48 h, 胰酶消化收集细胞, PBS洗涤2次, 取100 μL的细胞悬液于5 mL流式管中, 加入5 μL Annexin V-FITC和10 mg/L的碘化吡啶, 轻轻混匀, 避光室温反应15 min, 加入300 μL的结合缓冲液后上机检测。以各组中凋亡细胞占总计数细胞的百分比计算凋亡率。

1.2.7 β -catenin及H-ras的检测: TRIzol法提取各组细胞中的总RNA, 经逆转录合成cDNA。 β -catenin上游引物5'-CCAAGTGGGTGGTATAGAGG-3', 下游引物5'-GCTGGGTATCCTGATGTGC-3', 退火温度为59℃, PCR产物长度为329 bp; H-ras上游引物5'-TGCCATCAACAACACCAAG-3', 下游引物5'-CTCATCAGGAGGGTTCAGC-3', 退火温度为54℃, PCR产物长度为283 bp。PCR的反应体系为25 μL: cDNA 1 μL, $10 \times$ Taq酶反应缓冲

液2.5 μL, $MgCl_2$ 1.5 μL, dNTP 1 μL, 上下游引物各1 μL, Taq酶1 μL, 去离子水16 μL。 β -catenin的循环参数为: 95℃, 5 min, 94℃, 40 s, 59℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min。 H-ras的循环参数为: 95℃, 5 min, 94℃, 40 s, 54℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min。 扩增产物在紫外凝胶成像仪上进行拍照, 利用相关图像分析软件分析电泳条带的灰度值, mRNA表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值。

统计学处理 采用SPSS13.0分析软件进行统计学处理, 根据数据性质, 分别采用非参数检验及Fishers精确分析法进行分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒pshRNA的鉴定 测序结果显示, 所插入的shRNA1, shRNA2及shRNA3片段正确的连入pGenesil-2载体中, shRNA重组质粒构建成功。

2.2 shRNA重组质粒对Pokemon基因表达的抑制作用

2.2.1 RT-PCR检测Pokemon mRNA的表达: RT-PCR检测各组细胞中Pokemon及 β -actin mRNA的表达。以目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值作为Pokemon mRNA表达的相对含量, 并计算抑制率。抑制率 = 阴性对照组Pokemon的相对表达量-转染重组质粒组Pokemon的相对表达量/阴性对照组Pokemon的相对表达量。结果显示, 转染pshRNA重组质粒的细胞Pokemon的表达较阴性对照组明显减弱($P < 0.05$), 而转染阴性对照质粒的细胞与空白组相比, Pokemon的表达没有明显变化($P > 0.05$), 此结果显示转染shRNA重组质粒能够明显抑制Pokemon基因的表达。3个shRNA质粒转染组之间进行对比, pshRNA-2转染组Pokemon基因的表达量明显低于其他2组($P < 0.05$), 而pshRNA-1组与pshRNA-3组之间无显著差异性($P > 0.05$, 表1)。

2.2.2 Western blot检测Pokemon蛋白的表达: 提取各组细胞的总蛋白, western blot检测各组细胞中Pokemon及 β -actin蛋白的表达。以目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值作为Pokemon蛋白表达的相对含量, 并采用上述方法计算抑制率, 取3次实验结果进行统计学分析。结果显示转染pshRNA重组质粒后, 细胞Pokemon蛋白条带较对照组明显减弱($P < 0.05$), 而转染阴性对照质粒的细胞与空白组相比, Pokemon的表达没有明显变

表 1 转染shRNA重组质粒后各组细胞Pokemon mRNA的表达及抑制率

分组	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
灰度比值	0.453 ± 0.023 ^a	0.214 ± 0.011 ^c	0.478 ± 0.020 ^a	0.863 ± 0.036	0.904 ± 0.006
抑制率(%)	47.51	75.20	44.61	—	—

^a*P*<0.05 vs 阴性对照组; ^c*P*<0.05 vs pshRNA1及pshRNA3组。

表 2 转染shRNA重组质粒后各组细胞Pokemon蛋白的表达及抑制率

分组	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
灰度比值	0.547 ± 0.023 ^a	0.246 ± 0.017 ^c	0.568 ± 0.014 ^a	0.898 ± 0.018	1.006 ± 0.023
抑制率(%)	40.09	72.61	36.75	—	—

^a*P*<0.05 vs 阴性对照组; ^c*P*<0.05 vs pshRNA1及pshRNA3组。

表 3 各组细胞在不同时间的4值

分组	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白对照组	0.442 ± 0.027	0.580 ± 0.016	0.678 ± 0.069	0.731 ± 0.018	0.895 ± 0.025
阴性对照组	0.421 ± 0.013	0.556 ± 0.007	0.663 ± 0.016	0.712 ± 0.024	0.873 ± 0.019
pshRNA2组	0.335 ± 0.011	0.313 ± 0.003	0.360 ± 0.012	0.411 ± 0.013	0.431 ± 0.014

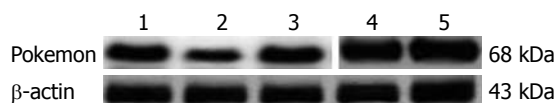


图 1 Western blot检测各组细胞中Pokemon基因的蛋白表达。1: shRNA1组; 2: shRNA2组; 3: shRNA3组; 4: 阴性对照组; 5: 空白对照组。

化(*P*>0.05)。3个shRNA质粒转染组之间进行对比, pshRNA-2转染组Pokemon蛋白的表达量明显低于其他2组(*P*<0.05), 而pshRNA-1组与pshRNA-3组之间无显著差异性(*P*>0.05, 图1, 表2)。

2.3 pshRNA-2质粒对HepG2细胞生长活性的抑制作用 MTT法显示, 与阴性对照及空白组相比, 转染pshRNA-2质粒能够明显抑制HepG2细胞的生长活性, 阴性对照组及空白组的细胞生长曲线之间无明显差异(表3, 图2)。

2.4 pshRNA-2质粒对HepG2细胞凋亡的影响 转染48 h后, 通过流式细胞仪检测及分析软件显示, pshRNA-2质粒转染组细胞凋亡率(45.09%±1.62%)显著增加, 明显高于阴性对照组的凋亡率(8.33%±0.64%, *P*<0.05), 而阴性对照组与空白组细胞的凋亡率(6.43%±0.49%)无显著差异性(*P*>0.05, 图3-4)。

2.5 β-catenin及H-ras的表达 β-catenin在shRNA质粒转染组、阴性对照组及空白组中的表达

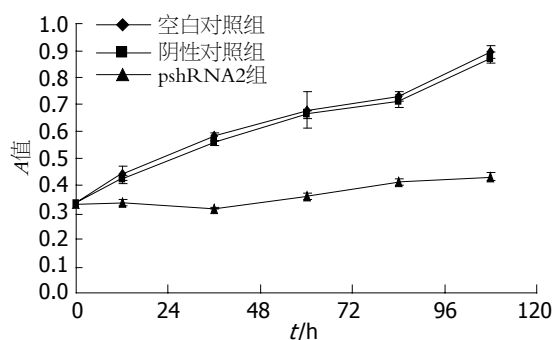


图 2 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞增殖的影响。

均无差异性; 而H-ras在shRNA质粒转染组中的表达显著减少, 明显低于阴性对照组及空白组(*P*<0.05); 阴性对照组及空白对照组中的H-ras表达无差异性(表4)。

3 讨论

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第3位, 仅次于胃癌和食管癌。HCC起病隐匿, 患者早期缺乏典型症状, 多数患者就诊时病情已处于晚期, 治疗效果差, 死亡率高。因此, 探索新的治疗HCC的方法势在必行, HCC的基因治疗正成为目前的探索热点。RNAi技术有效

■应用要点

本研究对Pokemon进行的研究有助于HCC发生机制的阐明, 并可能为HCC的治疗及预防提供新的靶点。

■同行评价

本文采用RNAi技术,构建了靶向Pokemon基因的shRNA,并初步观察了其对于肝癌细胞株HepG2增殖和凋亡的影响,内容新颖,有一定理论意义及应用价值。

表 4 各组细胞中 β -catenin及H-ras的表达

类别	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
β -catenin	0.892 ± 0.120	0.932 ± 0.032	0.924 ± 0.232	0.963 ± 0.136	0.978 ± 0.013
H-ras	0.212 ± 0.032^a	0.113 ± 0.019^a	0.297 ± 0.047^a	0.924 ± 0.003	0.937 ± 0.011

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组.

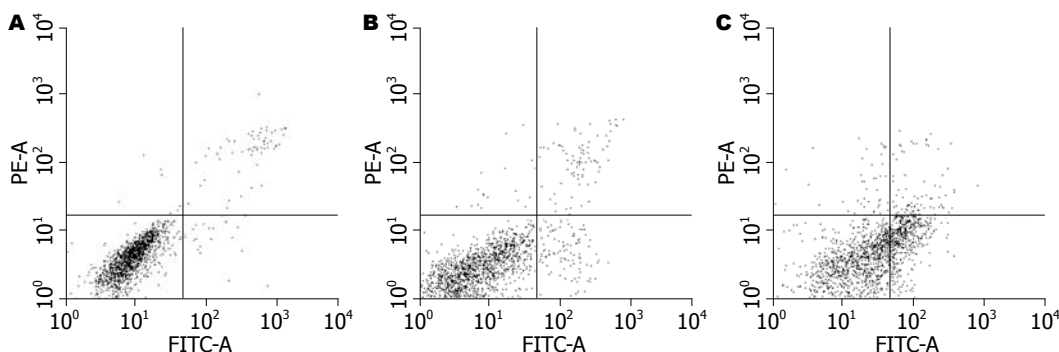


图 3 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞凋亡的影响. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: shRNA-2质粒转染组.

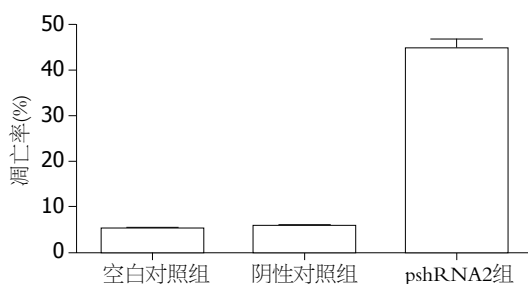


图 4 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞凋亡的影响.

沉默靶基因的表达,在动物实验中已经证实他可以通过静脉或局部注射进入瘤体内而发挥良好的抗肿瘤作用^[4].构建siRNA表达载体与化学合成siRNA相比,更有利于进行稳定表达siRNA和长效抑制的研究.转染到细胞的DNA模板中,在体内转录得到siRNAs,从而不需要直接进行RNA的操作,能提高siRNA的稳定性,并可使siRNA在体内维持较长时间的基因沉默^[5].

Pokemon基因起初是作为结合于人类免疫缺陷病毒I型(human immunodeficiency virus type I, HIV- I)的启动子元件而被发现的,继而作为前髓细胞性白血病锌指(promyelocytic leukaemia zinc finger, PLZF)的同系物而被克隆^[1].2005年Maeda *et al*报道Pokemon作为原癌基因,能够特异性地抑制抑癌基因ARF,促进肿瘤的发生发展,从而引起人们的广泛关注^[6].但是迄今为止,关于Pokemon基因在HCC形成过

程中的作用及其机制国内外报道较少.我们既往的研究发现, HCC组织中Pokemon mRNA及蛋白的表达均高于癌旁组织, Pokemon基因表达的上调仅与患者的瘤体直径有关,而与患者年龄,肿瘤分化程度以及TNM分期等无关.提示Pokemon与HCC的发生发展密切相关,我们的实验结果与国内报道基本一致^[7].那么Pokemon在HCC的形成过程中究竟发挥怎样的作用呢?

为了阐述这个问题,我们构建了如下的实验体系:首先,检测发现HCC细胞株HepG2中Pokemon呈强表达(结果未显示);其次,成功构建并筛选靶向Pokemon基因的重组质粒,并导入HepG2中,分别于RNA和蛋白质水平证实其能够有效抑制Pokemon基因的表达.该体系的建立为我们体外研究Pokemon基因的功能奠定了良好的基础.

细胞的增殖和凋亡在HCC发生发展中起着重要的作用^[8-9].我们发现,转染Pokemon shRNA表达载体后,细胞的增殖率明显低于对照组,呈非时间依赖性,说明Pokemon基因在细胞增殖过程中起到重要的作用.流式细胞术检测显示干扰组细胞的凋亡率明显高于对照组.表明靶向Pokemon的shRNA表达载体可以通过促进细胞凋亡的方式来调控细胞的生长过程.该结果为我们整体试验过程中观察到的Pokemon基因的上调只与瘤体直径有关的现象提供了可靠的试验依据.

Maeda *et al*^[6]认为, Pokemon是通过直接抑制癌基因ARF促进某些类型淋巴瘤发生发展的, 近年来也有报道认为Pokemon主要是通过更下游的分子即ARF-Hdm2-P53-P21通路发挥作用^[10]. 但由于ARF/P53通路在实体肿瘤的发生中频繁缺失, 所以该基因在HCC中的信号传导通路尚不十分清楚. 本研究基于以下理由初步选择H-ras及 β -catenin作为其下游因子进行检测: (1)与H-ras单独转染相比, H-ras与Pokemon基因联合转染成纤维细胞株MEFs时, 细胞出现明显增殖特性, 并能抵抗单独转染所引起的细胞衰老或者凋亡^[1]; (2) β -catenin是与Pokemon同一家族成员并且功能相似的Kaiso基因的下游因子^[11-12], 而关于Pokemon与 β -catenin的关系至今为止尚无相关报道. 我们的研究表明, 干扰组细胞中H-ras表达量与对照组相比明显减少, 而 β -catenin的表达量则无明显变化. 因此我们推测Pokemon基因可能通过特异性的诱导下游分子H-ras的表达来调控肿瘤细胞的生长过程. 至于Pokemon及H-ras二者之间具体的信号传导通路尚有待进一步研究.

总之, 本实验成功构建了靶向Pokemon的shRNA表达载体, 并初步探讨了其对肝癌细胞株HepG2生长的影响及其可能的机制. 结合前期的整体试验结果, 我们相信Pokemon将有可能成为人类HCC治疗的一个新靶点.

4 参考文献

- 1 Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 8575-8578
- 2 Agrawal A, Yang J, Murphy RF, Agrawal DK. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 115-122
- 3 Apostolopoulou K, Pateras IS, Evangelou K, Tsantoulis PK, Liontos M, Kittas C, Tiniakos DG, Kotsinas A, Cordon-Cardo C, Gorgoulis VG. Gene amplification is a relatively frequent event leading to ZBTB7A (Pokemon) overexpression in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2007; 213: 294-302
- 4 Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3857-3865
- 5 Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 2005; 54: 117-142
- 6 Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, Guernah I, Zelent A, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature* 2005; 433: 278-285
- 7 吴阳, 张水军, 丁月超. Pokemon基因在原发性肝癌组织中的表达及意义. *山东医药* 2008; 48: 92-93
- 8 Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 513-520
- 9 Feo F, Frau M, Pascale RM. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6601-6615
- 10 Choi WI, Jeon BN, Yun CO, Kim PH, Kim SE, Choi KY, Kim SH, Hur MW. Proto-oncogene FBL-1 represses transcription of p21CIP1 by inhibition of transcription activation by p53 and Sp1. *J Biol Chem* 2009; 284: 12633-12644
- 11 Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1570-1574
- 12 Wanitsuan W, Kannnurn S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6052-6059

编辑 李军亮 电编 何基才

《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. (科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

白头翁醇提物对大鼠结肠炎肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的保护作用

张文远, 姜伟炜

■背景资料

紧密连接是构成肠黏膜屏障的主要结构基础, 当结肠炎发生时可由紧密连接的破坏引起肠黏膜屏障的损伤, 在治疗方面, 是否可通过保护紧密连接从而达到保护肠黏膜屏障的作用, 本文就这一问题研究了白头翁醇提物对TNBS诱导大鼠结肠炎模型的肠黏膜屏障肠上皮细胞紧密连接蛋白occludin是否具有保护作用。

张文远, 姜伟炜, 四川省医学科学院·四川省人民医院消化科 四川省成都市 610072

姜伟炜, 贵州省遵义医学院 贵州省遵义市 563003

四川省卫生厅基金资助项目, No. 070054

作者贡献分布: 张文远与姜伟炜对此文所作贡献均等; 此课题由张文远与姜伟炜设计; 研究过程由张文远与姜伟炜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张文远与姜伟炜提供; 数据分析由张文远与姜伟炜完成; 本论文写作由张文远与姜伟炜完成。

通讯作者: 张文远, 主任医师, 610072, 四川省成都市, 四川省医学科学院·四川省人民医院消化科。

syzhangwenyuan@163.com

电话: 028-87393916

收稿日期: 2009-08-03 修回日期: 2009-09-14

接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-28

Protective effects of radix pulsatillae alcohol extract on intestinal epithelial tight junctions in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis

Wen-Yuan Zhang, Wei-Wei Jiang

Wen-Yuan Zhang, Wei-Wei Jiang, Department of Gastroenterology, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Wei-Wei Jiang, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: the Fund from the Health Department of Sichuan Province, No. 070054

Correspondence to: Wen-Yuan Zhang, Department of Gastroenterology, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. syzhangwenyuan@163.com

Received: 2009-08-03 Revised: 2009-09-14

Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of radix pulsatillae alcohol extract on intestinal epithelial tight junctions in rats with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and explore potential mechanisms involved.

METHODS: Acute colitis was induced in rats using TNBS enema. Thirty-eight rats were randomized into four groups: normal control group ($n = 8$), model control group ($n = 10$), radix

pulsatillae alcohol extract treatment group ($n = 10$) and golden bifid (live combined bifidobacterium, lactobacillus and streptococcus thermophilus tablets) treatment group ($n = 10$). Diarrhea and bloody stool were observed. Colonic damage was evaluated histologically. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in colonic tissue and endotoxin in blood were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of occludin in intestinal mucosal epithelial cells was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: After acute colitis was induced in rats using TNBS enema, disease activity index and colonic damage score increased. However, treatment with radix pulsatillae alcohol extract and golden bifid significantly decreased disease activity index (6.50 ± 1.27 and 5.90 ± 1.67 vs 9.20 ± 1.75 , respectively; both $P < 0.05$), colonic damage score (5.00 ± 1.05 and 4.80 ± 1.25 vs 7.10 ± 0.99 , respectively; both $P < 0.05$), colonic TNF- α level (521.24 ± 109.37 ng/L and 503.98 ± 126.63 ng/L vs 657.54 ± 149.60 ng/L, respectively; both $P < 0.05$) and blood endotoxin level (0.148 ± 0.093 EU/mL and 0.153 ± 0.106 EU/mL vs 0.213 ± 0.023 EU/mL, respectively; both $P < 0.05$), and remarkably increased colonic IL-10 content (92.19 ± 30.09 ng/L and 95.57 ± 27.71 ng/L vs 42.92 ± 23.74 ng/L, respectively; both $P < 0.05$) in rats with TNBS-induced colitis. In the model control group, the structure of tight junctions was destroyed and the expression of occludin was downregulated in colonic mucosal epithelium. However, treatment with radix pulsatillae alcohol extract and golden bifid could reduce the damage to tight junctions and upregulate the expression of occludin in rats with TNBS-induced colitis.

CONCLUSION: Radix pulsatillae alcohol extract can exert a protective effect against TNBS-induced intestinal mucosal barrier dysfunction possibly via mechanisms that are associated with adjusting intestinal microecology, upregulating occludin expression, reducing colonic TNF- α level and blood endotoxin level, and increasing

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

colonic IL-10 production.

Key Words: Radix pulsatillae alcohol extract; Intestinal microecology; Trinitrobenzene sulfonic acid; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-10; Endotoxin; Tight junction; Intestinal mucosal barrier

Zhang WY, Jiang WW. Protective effects of radix pulsatillae alcohol extract on intestinal epithelial tight junctions in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3134-3139

摘要

目的: 探讨白头翁醇提取物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的调控, 进一步阐明白头翁醇提取物对大鼠实验性结肠炎的肠黏膜屏障的保护作用。

方法: 建立TNBS诱导大鼠结肠炎模型。实验分为正常组、模型组、白头翁醇提取物治疗组和双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌(金双歧)组。进行疾病活动指数(DAI)和组织学损伤评分, 用ELISA法测定结肠组织TNF- α 、IL-10和血清内毒素, 采用免疫组织学染色检测紧密连接(tight junction, TJ)相关蛋白occludin的分布。

结果: TNBS诱导大鼠结肠炎后, DAI和组织学损伤评分增高, 结肠组织TNF- α 水平升高、IL-10水平降低和血清内毒素水平升高, 而经白头翁醇提取物和双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌处理后, DAI和组织学损伤评分有明显下降(6.50 ± 1.27 , 5.90 ± 1.67 vs 9.20 ± 1.75 ; 5.00 ± 1.05 , 4.80 ± 1.25 vs 7.10 ± 0.99 , 均 $P < 0.05$), 结肠组织TNF- α 水平降低(521.24 ± 109.37 ng/L, 503.98 ± 126.63 ng/L vs 657.54 ± 149.60 ng/L, 均 $P < 0.05$)、血清内毒素水平降低(0.148 ± 0.093 EU/mL, 0.153 ± 0.106 EU/mL vs 0.213 ± 0.023 EU/mL, 均 $P < 0.05$)和IL-10水平升高(92.19 ± 30.09 ng/L, 95.57 ± 27.71 ng/L vs 42.92 ± 23.74 ng/L, 均 $P < 0.05$); TNBS诱导大鼠结肠炎后, TJ结构遭到破坏, TJ相关蛋白的表达减少, 而白头翁醇提取物和双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌(金双歧)处理后可使TNBS引起的TJ结构受损减轻, 相关蛋白的表达增多。

结论: 白头翁醇提取物可以对TNBS诱导大鼠结肠炎肠黏膜屏障具有明显的保护作用, 其机制可能是通过调节肠道微生态、上调肠上皮细胞紧密连接蛋白occludin的表达、降低结肠组织TNF- α 含量、提高IL-10水平, 从而抑制内毒素通过紧密连接进入体循环。

关键词: 白头翁醇提取物; 肠道微生态; 三硝基苯磺

酸; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素10; 内毒素; 紧密连接蛋白; 肠道黏膜屏障

张文远, 姜伟伟. 白头翁醇提取物对大鼠结肠炎肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的保护作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3134-3139

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3134.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的病因和发病机制至今尚不完全清楚。近年来, 肠道黏膜屏障在IBD中的作用越来越受到重视, 肠上皮细胞紧密连接蛋白是肠上皮细胞间的最重要的连接蛋白, 对肠黏膜屏障起着至关重要的作用, 参与了IBD的发病过程^[1-2], 中药是否可以通过调整肠道上皮紧密连接到达治疗IBD, 目前国内外未见这方面的报道。白头翁醇提取物对TNBS诱导大鼠结肠炎模型的肠黏膜屏障肠上皮细胞紧密连接蛋白occludin是否具有保护作用, 为此我们做了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, 雌雄兼用, 购自四川省医学科学院实验动物研究所, 许可证号: SCXK(111)2004-16。白头翁批号080721, 产地: 四川省成都中医药大学惠康药业; 三硝基苯磺酸(trinitrobenzene-sulfonic acid, TNBS)为Sigma公司产品, 试剂浓度1.14 kg/L; 双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌(金双歧), 每片0.5 g, 内蒙古双奇药业股份有限公司, 批准文号: 国药准字S19980004; 一抗occludin兔多克隆抗体, Sigma公司; TNF- α 、IL-10 ELISA法检测试剂盒, 欣博盛生物科技有限公司; 血清内毒素鲎试剂盒, 欣博盛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 白头翁醇提取物的制备: 按王先芳 *et al*^[3]方法提取并稍加改进。称取白头翁饮片250 g, 加950 mL/L乙醇1500 mL, 在80℃恒温水箱中加热回流2.5 h, 共3次, 用100目尼龙网过滤, 将滤液减压蒸馏回收乙醇, 然后烘干成褐色粉末备用。

1.2.2 造模: SD大鼠共38只, 雌雄兼用, 适应性饲养3 d后随机数字表法分成正常对照组($n = 8$)、TNBS模型组($n = 10$)、白头翁醇提取物治疗组($n = 10$)和金双歧治疗组($n = 10$)。参照Morris *et al*^[4], 王皓 *et al*^[5]报道的TNBS法造模: 所有大鼠术前禁食24 h, 自由饮水, 氯胺酮注射液(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 模型组、白头翁治疗组及金

■研究前沿

炎症性肠病发生时肠黏膜屏障损伤已证实, 但其发生机制是目前研究的热点, 而且治疗通过调节肠道微生态方面的机制尚不清楚。

■创新盘点

目前有关中药治疗炎症性肠病是肠上皮细胞紧密连接蛋白occludin表达的文章尚未见报道。本研究证实了白头翁醇提取物对大鼠结肠炎黏膜上皮细胞紧密连接蛋白具有保护作用。为中医治疗炎症性肠病提供新的思路。

双歧治疗组将含TNBS(100 mg/kg)的500 mL/L乙醇溶液0.85 mL用硅胶管缓慢注入距肛门约8 cm处的肠腔内, 正常对照组在相同的麻醉条件下予以等量生理盐水注入, 注入后立即提起大鼠尾部倒置2-3 min, 以防药液倒流。造模后第1-7天, 白头翁治疗组大鼠将制备的白头翁醇提取物按2 g/kg用蒸馏水配置成1 mL灌肠; 金双歧治疗组大鼠用已制备的金双歧粉末水溶液(2 Co/只)1 mL灌肠, 模型组和正常对照组以等量生理盐水灌肠, 每天1次。各组大鼠饲以相同的平衡颗粒样食物, 并自由饮水, 观察大鼠精神状态、进食、活动、大便和体质量等情况。于造模后第8天取眼眶静脉血测定血清内毒素, 并断颈处死所有大鼠, 游离并取下整段结肠, 沿肠系膜纵向剪开, 清洁肠内污物后观察结肠标本充血水肿情况、溃疡大小、分布、有无活动性出血等情况; 取1 cm病变组织, 行HE染色及免疫组织化学法检测occludin的表达; 余下标本液氮冻存, 用于ELISA法测定结肠组织中TNF- α 、IL-10的表达。

1.2.3 occludin免疫组织化学染色: 采用EnVision法, 石蜡切片常规脱蜡至水, H₂O₂孵育, 胃蛋白酶37℃ 30 min抗原修复, 兔抗occludin抗体(1:200)4℃过夜后, 滴加适当二抗工作液室温孵育30 min, DAB显色, 镜下控制显色时间, 苏木素复染, 常规脱水透明, 树胶分片。在低倍镜下观察occludin在肠上皮细胞的分布特征, 每张切片选取5处occludin染色集中区域, 在高倍镜下($\times 200$)计数, 求得平均值。

1.2.4 血清内毒素测定: 取SD大鼠眼眶静脉血, 低温6000 r/min离心5 min, 取0.1 mL上清液, 以ELISA法测定其内毒素含量, 具体步骤按试剂盒说明书操作进行。

1.2.5 结肠组织TNF- α 、IL-10测定: 切取部分结肠组织, 电子天平称质量, 在液氮条件下将大鼠结肠研磨碎, 冰PBS 0.4 mL制成结肠组织溶液, 4℃ 3500 r/min离心10 min, 取0.1 mL上清液, 使用相应的试剂盒以ELISA法测定其TNF- α 、IL-1含量。

统计学处理 均数以mean \pm SD表示, 各组间比较用F检验, $P<0.05$ 时差异有显著性。

2 结果

2.1 疾病活动指数(DAI)和组织评分的比较 DAI及组织学损伤评分与正常组比较差异均有显著性意义($P<0.05$), 白头翁治疗组与金双歧治疗组比较差异无显著意义($P>0.05$, 表1)。

表1 各组大鼠DAI和结肠组织学损伤评分

分组	<i>n</i>	DAI	组织学评分
模型组	10	9.20 \pm 1.75 ^{ace}	7.10 \pm 0.99 ^{ace}
白头翁治疗组	10	6.50 \pm 1.27 ^a	5.00 \pm 1.05 ^a
金双歧治疗组	10	5.90 \pm 1.67 ^a	4.80 \pm 1.25 ^a
正常组	8	0.75 \pm 0.71	0.25 \pm 0.46

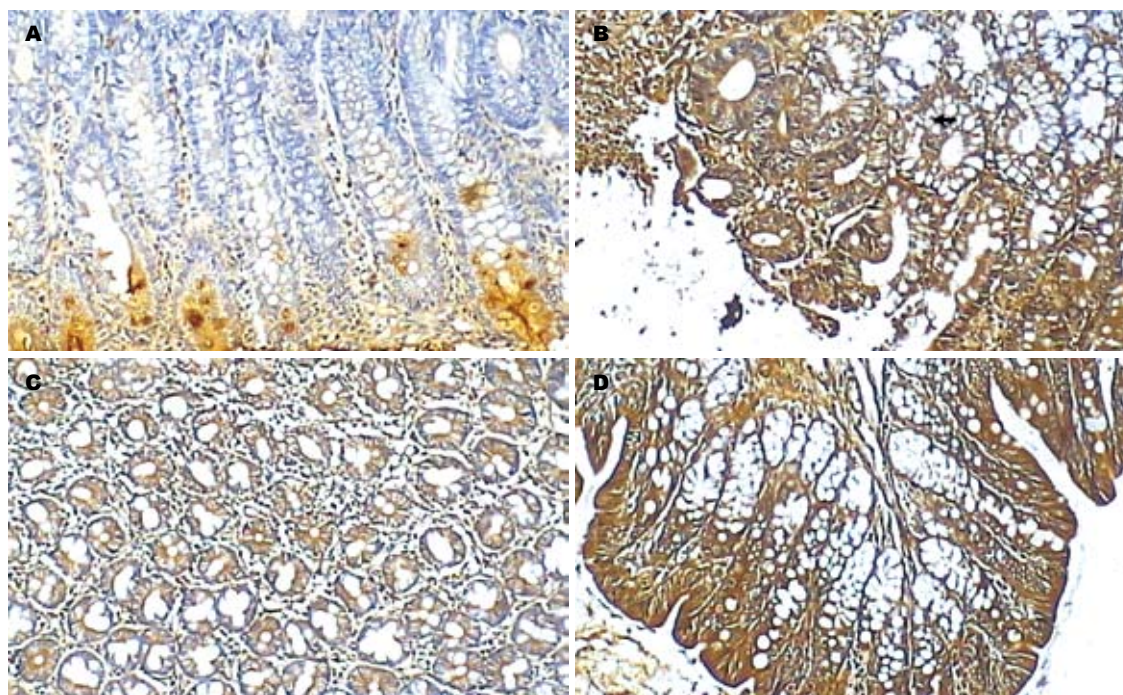
^a $P<0.05$ vs 正常组; ^c $P<0.05$ vs 白头翁治疗组; ^e $P<0.05$ vs 金双歧治疗组。

2.2 occludin免疫组织化学染色分布特征 正常组occludin连续分布于肠黏膜上皮细胞的边缘, 主要定位于细胞膜和细胞质, 为棕黄色染色颗粒, 其计数结果为81.62 \pm 11.39。模型组occludin染色散乱, 其计数结果为25.78 \pm 10.28。白头翁治疗组染色明显恢复, 其计数结果为50.68 \pm 17.02。金双歧治疗组染色有所恢复, 其计数结果为52.43 \pm 16.15。模型组与金双歧治疗组相比有差异($P<0.05$)。模型组结肠组织occludin阳性染色强度及范围较弱, 白头翁治疗组和金双歧治疗组occludin较模型组强, 正常组occludin的定位与前面2组没有明显区别, 但其棕褐色染色强度及范围很强(图1)。

2.3 结肠组织TNF- α 、IL-10含量及血清内毒素水平 TNF- α 、IL-10和血清内毒素水平在模型组、白头翁治疗组和金双歧治疗组、正常对照组组间比较, 差异均有显著性意义(均 $P<0.05$), 白头翁治疗组与金双歧治疗组之间差异无显著性意义($P>0.05$, 表2)。

3 讨论

肠黏膜屏障主要由肠黏膜基底膜、上皮细胞层及其表面的黏液层所构成^[6], 在维护肠功能中扮演着重要角色。肠上皮细胞是肠黏膜屏障的主要组织结构基础, 细胞间的连接复合体参与维持上皮细胞的完整性, 其中紧密连接是细胞间最重要的连接方式, 在细胞侧空间形成调控屏障, 调控水、离子和大分子物质的跨膜转运, 防止大分子物质经肠腔漏到周围组织中, 维护肠黏膜屏障功能和肠黏膜通透性^[7-10]。紧密连接不仅参与生理过程调节, 还参与炎症的调节过程, 当肠上皮细胞紧密连接一旦发生变异、减少或缺失, 则细胞间隙通透性增加, 细菌、内毒素及大分子物质就可通过紧密连接进入体循环^[11-12]。上皮紧密连接主要由occludin蛋白、claudin蛋白、连接黏附分子等紧密连接蛋白构成选择性



■应用要点
本研究发现, 白头翁醇提取物治疗后的鼠结肠炎肠道屏障上皮细胞紧密连接蛋白occludin表达升高, 为白头翁醇提取物用于临床试验做了充分的准备。

图 1 各组大鼠结肠组织occludin染色表达($\times 100$). A: 模型组; B: 白头翁治疗组; C: 金双歧治疗组; D: 正常组.

表 2 各组大鼠结肠组织TNF- α 、IL-10及血清内毒素含量

分组	<i>n</i>	TNF- α (ng/L)	IL-10(ng/L)	内毒素(EU/mL)
模型组	10	657.54 \pm 149.60 ^{abc}	42.92 \pm 23.74 ^{abc}	0.213 \pm 0.023 ^{abc}
白头翁治疗组	10	521.24 \pm 109.37 ^a	92.19 \pm 30.09 ^a	0.148 \pm 0.093 ^a
金双歧治疗组	10	503.98 \pm 126.63 ^a	95.57 \pm 27.71 ^a	0.153 \pm 0.106 ^a
正常组	8	205.40 \pm 72.49	123.00 \pm 36.16	0.099 \pm 0.121

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^b $P < 0.05$ vs 白头翁治疗组; ^c $P < 0.05$ vs 金双歧治疗组.

屏障功能, 紧密连接蛋白在上皮细胞分化中起重要作用^[7,13-14]. 其中, occludin蛋白是紧密连接中最重要的结构蛋白, 不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭, 还能与不同的分子结合, 参与紧密连接形成的信号调节. 肠上皮occludin水平的检测不仅可以反映肠道菌群紊乱情况下致病菌对肠道屏障的破坏情况, 也反映了肠道屏障的恢复程度, 因此在国际上已得到认可^[15-18].

目前普遍认为, IBD发病时肠黏膜屏障功能异常, 一些损伤性因素如炎症细胞因子能破坏肠黏膜屏障, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位, 进一步激活固有层免疫细胞, 导致肠黏膜异常炎症反应^[19-21]. 各种炎症因子及内毒素等可通过影响各种紧密连接蛋白的表达, 使连接复合体遭到破坏, 肠黏膜通透性增加^[22]. Willemsen *et al*^[23]研究IFN- γ 对闭合蛋白claudin-2表达的影

响和肠上皮屏障功能之间的关系时发现IFN- γ 通过不同作用机制影响到闭合蛋白claudin-2的表达, 破坏肠上皮屏障, 进而导致IBD等的发生. 还有报道, TNF- α 通过紧密连接破坏上皮屏障功能^[24], IBD肠黏膜高表达的其他细胞因子如IL-15、IL-2、IL-1 β 等也能影响上皮细胞紧密连接蛋白表达及分布^[25-26].

我们的实验结果表明, 白头翁醇提取物对TNBS诱导的大鼠结肠炎有明显的抑制作用. 用白头翁提取物治疗TNBS诱导大鼠结肠炎, 结肠黏膜糜烂、溃疡显著减轻, 炎症细胞浸润明显减少, DAI和黏膜损伤积分明显下降, 与金双歧治疗组无差异显著性, 与模型组比较差异有显著性, 提示白头翁醇提取物对结肠炎具有一定的治疗作用. 本实验还表明, 模型组紧密连接蛋白occludin表达低于正常组的表达, 而通过白头翁醇提取物治疗后, 结肠组织occludin表达明显高于

■同行评价

本研究设计合理, 有一定创新性, 可读性较好。

模型组, 但低于正常组的表达, 从而表明紧密连接蛋白occludin参与了IBD的发病机制, 可能是当IBD发病时, 肠黏膜屏障功能异常, 导致肠上皮细胞紧密连接发生减少、缺失, 使得肠上皮细胞紧密连接occludin蛋白的表达下降, 肠道通透性增加。调节肠道微生态能够增强肠上皮细胞的紧密连接, 降低肠道通透性, 增强肠道黏膜屏障功能。Madsen *et al*^[27]研究发现, 口服VSL 3能降低肠黏膜分泌TNF- α 和IFN- γ , 恢复IL-10-KO小鼠损伤的结肠屏障功能和上皮细胞的完整性。Resta-Lenert *et al*^[28]也在对肠侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *E.coli*, EIEC)对人肠上皮细胞系(HT29/cl 19A和Caco-2)感染的研究中发现, 嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, ST)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, LA)能维持或增强细胞骨架蛋白和紧密连接蛋白的磷酸化, 因此增强了肠上皮细胞间的紧密连接, 从而阻止了EIEC对肠上皮细胞的侵袭。另外还有一些研究发现^[29-31]增加肠道特殊菌群, 通过改变肠道微生态, 不仅能够增加细胞因子IFN- γ 的水平, 而且增强肠道上皮细胞的功能及活性。我们的实验结果显示: 在通过金双歧治疗后, 结肠组织occludin表达明显高于模型组, 但低于正常组的表达, 白头翁治疗组与金双歧治疗组之间差异无显著意义, 从而表明白头翁治疗组具有与金双歧调节肠道微生态的类似作用, 通过维持肠道菌群的平衡, 维护肠道微生态屏障, 抑制细菌移位, 从而使肠道上皮紧密连接蛋白occludin的表达增多, 保护肠上皮的机械屏障, 达到治疗结肠炎的目的。我们的结果还显示, 模型组中与正常组比较, 血清内毒素水平升高, 炎症因子TNF- α 水平升高, IL-10水平降低; 经白头翁和金双歧治疗后, 血清内毒素水平明显下降, TNF- α 水平显著降低, IL-10水平明显升高, 白头翁治疗组与金双歧治疗组之间差异无显著意义, 表明IBD发病时, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层以为并激活其免疫细胞, 产生大量炎症细胞因子, 血清内毒素水平升高, 炎症分子进一步损伤肠道黏膜屏障功能, 使炎症进一步扩大; 给予白头翁后, 通过纠正肠道微生态后, 使致炎细胞因子减少, 抗炎细胞因子增多, 血清内毒素也降低。

总之, 白头翁醇提物对TNBS诱导大鼠结肠炎肠上皮细胞紧密连接蛋白的调控, 起到对肠黏膜屏障的保护作用; 其作用机制可能是通过保护肠道微生物屏障, 纠正肠道菌群紊乱调节肠道微生态, 降低IBD中致炎细胞因子TNF- α 、

升高抗炎细胞因子IL-10, 减少炎症分子对肠道黏膜屏障的损伤, 有效的调节肠黏膜屏障功能, 从而使紧密连接蛋白occludin的表达增多, 减少肠上皮细胞受损伤的机会, 保护肠道黏膜上皮细胞之间的紧密连接蛋白, 降低肠道通透性, 从而抑制内毒素通过紧密连接进入体循环, 达到治疗IBD的目的。

4 参考文献

- 1 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533
- 2 Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 4969-4976
- 3 章荣华, 耿宝琴, 王先芳. 白头翁醇提物的抗肿瘤作用. *浙江医科大学学报* 1998; 27: 204-206
- 4 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 5 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立. *胃肠病学* 2001; 6: 7-10
- 6 Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520
- 7 Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213-C1228
- 8 González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- 9 Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays* 2005; 27: 356-365
- 10 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909
- 11 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- 12 Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564
- 13 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
- 14 Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 2006; 37: 569-577
- 15 崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛. 暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3008-3012
- 16 Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13:

- 1227-1237
- 17 Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 2000; 275: 29816-29822
- 18 Tilsala-Timisjärvi A, Alatosava T. Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. *Int J Food Microbiol* 2001; 68: 45-52
- 19 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- α . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G669-G678
- 20 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- 21 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172
- 22 何新颖, 唐志鹏, 张亚利. 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
- 23 Willemsen LE, Hoetjes JP, van Deventer SJ, van Tol EA. Abrogation of IFN- γ mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 275-284
- 24 Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. Tumor necrosis factor α disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004; 116: 14-18
- 25 Nishiyama R, Sakaguchi T, Kinugasa T, Gu X, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC. Interleukin-2 receptor β subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2001; 276: 35571-35580
- 26 Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007; 178: 4641-4649
- 27 Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591
- 28 Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003; 52: 988-997
- 29 Broekaert JJ, Walker WA. Probiotics as flourishing benefactors for the human body. *Gastroenterol Nurs* 2006; 29: 26-34
- 30 Dogi CA, Galdeano CM, Perdigon G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine* 2008; 41: 223-231
- 31 Scharek L, Guth J, Reiter K, Weyrauch KD, Taras D, Schwerk P, Schierack P, Schmidt MF, Wieler LH, Tedin K. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105: 151-161

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》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括《世界华人消化杂志》(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

幽门螺杆菌感染对老年人胃黏膜环氧合酶-2表达的影响及意义

王琳, 任美书, 王鸿博, 张蕴, 章明放

■背景资料

胃幽门螺杆菌 (*H pylori*) 是引起消化性溃疡和慢性胃炎的主要病因之一。近年已发现 *H pylori* 感染与胃癌的发生密切相关。 *H pylori* 感染不仅是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子, 还被公认为 I 类致癌物, 但 *H pylori* 致癌的发病机制至今尚不完全清楚。

王琳, 任美书, 王鸿博, 张蕴, 章明放, 天津医科大学总医院
干部病房 天津市 300052

天津市卫生局科技基金资助项目, No. 07KZ24

作者贡献分布: 此课题由任美书、王鸿博及王琳共同设计, 研究过程及论文撰写由张蕴、王鸿博、王琳及任美书共同完成; 实验所用试剂及技术指导由章明放提供。

通讯作者: 王琳, 住院医师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院干部病房。 eileen3330@sina.com
电话: 022-60363577

收稿日期: 2009-08-11 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-28

Effects of *Helicobacter pylori* infection on cyclooxygenase-2 expression in gastric mucosal epithelium of elderly population

Lin Wang, Mei-Shu Ren, Hong-Bo Wang, Yun Zhang,
Ming-Fang Zhang

Lin Wang, Mei-Shu Ren, Hong-Bo Wang, Yun Zhang,
Ming-Fang Zhang, Department of Cadre Ward, the General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Supported by: the Fund of the Health Bureau of Tianjin, No. 07KZ24

Correspondence to: Lin Wang, Department of Cadre Ward, the General Hospital of Tianjin Medical University, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. eileen3330@sina.com

Received: 2009-08-11 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection on cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in gastric mucosal epithelium.

METHODS: A total of 200 patients with gastric mucosal lesions at different stages of carcinogenesis were included in the study. Rapid urease test in combination with Giemsa staining or ¹⁴C urea breath test was used to assess *H pylori* infection in these patients. COX-2 expression in gastric mucosal epithelium was detected by immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: The detection rate of *H pylori* infec-

tion was highest in patients with gastric cancer (GCA), followed by patients with atypical hyperplasia (AH) and intestinal metaplasia (IM). The positive rates of COX-2 expression in patients with chronic superficial gastritis (CSG), IM, AH and GCA were 8%, 24%, 46% and 64%, respectively, exhibiting an upward trend. Significant difference was noted in the positive rate of COX-2 expression between GCA and non-GCA patients ($P < 0.01$). The positive rate of COX-2 expression was significantly higher in *H pylori*-positive patients than in *H pylori*-negative patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The upregulation of COX-2 expression is associated with the malignant transformation of *H pylori*-infected gastric mucosa and may play a role in the development of early premalignant lesions.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Cyclooxygenase-2; Gastric mucosal carcinogenesis; Epithelium

Wang L, Ren MS, Wang HB, Zhang Y, Zhang MF. Effects of *Helicobacter pylori* infection on cyclooxygenase-2 expression in gastric mucosal epithelium of elderly population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3140-3143

摘要

目的: 评估幽门螺杆菌(*H pylori*)感染对老年人胃黏膜COX-2表达的影响及意义。

方法: 取不同阶段的胃黏膜病变共200例, 用速尿素酶试验结合组织学Giemsa染色或¹⁴C尿素呼气试验检测胃黏膜*H pylori*感染状况, 应用免疫组织化学检测胃黏膜上皮细胞COX-2的表达。

结果: 不同组织类型*H pylori*检出率以胃癌最高, 其次为不典型增生(AH)和肠上皮化生(IM)。COX-2在慢性浅表性胃炎(CSG)、IM、AH和胃癌中的表达阳性率分别为8%、24%、46%和64%, 呈递增趋势, 其阳性率胃癌与非癌组织相比差异均有统计学意义。

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

($P<0.01$). 同一类型 *H. pylori* 阳性组 COX-2 的表达高于 *H. pylori* 阴性组, 2 组比较有显著性差异 ($P<0.05$).

结论: COX-2 表达上调与 *H. pylori* 感染的胃黏膜的癌变有关, 可能在癌前病变早期阶段起作用.

关键词: 幽门螺杆菌; 环氧合酶-2; 胃黏膜癌变; 上皮细胞

王琳, 任美书, 王鸿博, 张蕴, 章明放. 幽门螺杆菌感染对老年人胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3140-3143

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3140.asp>

0 引言

胃幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是引起消化性溃疡和慢性胃炎的主要病因之一. 近年已发现 *H. pylori* 感染与胃癌(gastric cancer)的发生密切相关. 浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)-不典型增生(atypical hyperplasia, AH)-胃癌, 被公认为人类胃癌, 尤其是肠型胃癌发生的典型模式. 而 *H. pylori* 感染不仅是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子, 还被公认为 I 类致癌物, 但 *H. pylori* 致癌的发病机制至今尚不完全清楚. 老年人的胃癌发病率很高, 我们收集了 200 例老年患者的资料, 对 COX-2 在慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)、IM、AH 和胃癌中的表达进行了检测, 同时对 *H. pylori* 的感染率进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 选自我院 2007-07/2009-03 经胃镜和病理明确诊断的病理组织 200 例, 包括 CSG、IM、AH 和胃癌各 50 例. 所有患者均无家族性腺瘤病史和结肠癌病史, 也无长期服用非甾体类抗炎药(non-steroid antiinflammatory drugs, NSAIDs)或糖皮质激素病史, 其中男 126 例, 女 74 例, 年龄 60-85(平均 71.8 ± 11.6) 岁.

1.2 方法

1.2.1 实验方法: *H. pylori* 感染患者由快速尿素酶试验结合组织学 Giemsa 染色或 ^{14}C 尿素呼气试验而确立. 所有病理组织重新切片, 制成厚 5 μm 连续切片, 经天津医科大学总医院两位病理学专家双盲诊断无误后, 行免疫组织化学染色. COX-2 使用 ABC 法, COX-2 多克隆抗体 ABC 试剂购自北京中山生物有限公司. 用已知阳性大肠

癌切片作阳性对照.

1.2.2 结果判断: 采用半定量法, COX-2 对每张切片阳性着色的上皮细胞进行判定, 仅细胞核着蓝色者为阴性, 细胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性, 阳性指数(阳性细胞占计数细胞的比例)以随机计数 10 个高倍视野为准, 每个视野观察 100 个细胞, 取其平均值, 阳性指数小于 10 % 为阴性(-)、10%-30% 为阳性(+), 30%-50% 为(++), 大于 50% 为(+++).

统计学处理 所有数据用 SPSS11.0 统计软件进行处理, 采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 COX-2 在不同组织中的表达 COX-2 在非癌组织中阳性染色细胞主要位于胃小凹腺颈部和浅层固有腺, 在间质细胞胞质和平滑肌纤维中均可见到散在表达. 在胃癌组织中阳性染色主要位于癌细胞胞质以及癌旁黏膜上皮和固有腺上皮的胞质中, 呈弥漫性分布. 在 50 例 CSG 中, 阳性 4 例, 且仅为(+). IM 组中 12 例阳性, 其中 6 例(+), 4 例(++), 2 例(+++). AH 组中有 23 例阳性, 其中 5 例(+), 10 例(++), 8 例(+++), 而胃癌组中阳性数达 32 例, 其中 6 例(+), 10 例(++), 16 例(+++). COX-2 在 CSG、IM、AH 到胃癌中的表达阳性率分别为 8%、24%、46% 和 64%, 呈递增趋势, 其阳性率胃癌与非癌组织相比差异均有统计学意义($P<0.01$). 表达强度从 CSG、IM、AH 到胃癌不断增高(表 1).

2.2 COX-2 表达与 *H. pylori* 感染的关系 不同组织类型 *H. pylori* 检出率以胃癌最高达 72%, 其次为 AH 64% 和 IM 52%. 他们与 CSG 相比有显著性差异($P<0.05$). *H. pylori* 在 CSG、IM、AH 到胃癌中的表达阳性率分别为 30%、52%、64% 和 72%, 呈递增趋势. COX-2 阳性与 *H. pylori* 感染有关 ($P<0.05$, 表 2).

3 讨论

COX 是一种膜结合蛋白, 是催化花生四烯酸合成前列腺素(PG)的关键限速酶, 在人体内存在 2 种同工酶. COX-1 基因是结构性表达基因, 存在于大多数正常组织中, 对内环境的稳定起重要作用, 在胃肠道中对黏膜细胞有保护作用; COX-2 基因是迅速应答基因, 被认为是一种炎症酶, 多数组织在正常生理状态下不表达, 但在一些病理状态下, COX-2 表达增高, 如在炎症和肿瘤组织中出现高表达^[1]. 近年来有研究表明:

■ 研发前沿

H. pylori 感染与胃癌发生相关, 但其确切致癌机制目前仍不十分清楚. 根据国内外研究报道, COX-2 与 *H. pylori* 相关性胃癌有密切关系, 具体作用机制还有待进一步研究.

■创新盘点

本研究结果显示, COX-2的表达与 *H pylori* 感染有关。在胃癌组织中COX-2表达增高, 说明COX-2的高表达可能与 *H pylori* 致胃癌机制有关。

表 1 *H pylori*感染与各组织中COX-2表达关系

分组	<i>H pylori</i> 阳性	<i>H pylori</i> 阴性	COX-2阳性n(%)		COX-2阳性率(%)
			<i>H pylori</i> 阳性	<i>H pylori</i> 阴性	
慢性浅表性胃炎	15	35	2(13.3)	2(5.7) ^a	8
肠上皮化生	26	24	9(34.6)	3(12.5) ^a	24
不典型增生	32	18	20(62.5)	3(16.7) ^a	46
胃癌	36	14	29(80.6)	3(21.4) ^a	64

^a*P*<0.05.

表 2 *H pylori*感染与COX-2的关系

	COX-2阳性	COX-2阴性
<i>H pylori</i> 阳性	60	49
<i>H pylori</i> 阴性	11	80

$\chi^2 = 39.97$, ^a*P*<0.005.

COX-2在胃癌发生、肿瘤血管形成及侵袭转移过程中均发挥着重要作用^[2-3]。

本研究结果显示, 在人胃癌组织中COX-2表达的阳性率显著高于CSG、慢性萎缩性胃炎及IM, 与国内外部分文献报道基本一致。由上述可见, 在人体胃癌组织中存在着COX-2的高表达, 他是潜在的新型的肿瘤表型标志物, 可为COX-2抑制剂在胃癌中的应用提供了一定的依据。

*H pylori*感染与胃癌发生相关, 但其确切致癌机制目前仍不十分清楚。根据国内外研究报道, COX-2与*H pylori*相关性胃炎有密切关系。王小虎 *et al*^[4]研究胃窦黏膜在根除*H pylori*前后COX-2表达水平的变化, 发现随着*H pylori*的根除, 胃黏膜COX-2的表达明显减少, Konturek *et al*^[5]研究提示, *H pylori*诱导COX-2产生可能是潜在致癌的重要机制, 根除*H pylori*是减少COX-2表达, 降低*H pylori*潜在致癌作用的一个重要途径。本研究表明, 在有*H pylori*感染的胃组织中COX-2的表达与无*H pylori*感染的胃组织比较阳性率显著上升, 提示*H pylori*感染上调COX-2的表达。与近年来的研究一致, *H pylori*感染可上调胃癌细胞及胃癌组织中COX-2的表达和促进PGE2产生, 并能上调VEGF表达, 后者可能参与EGFR和COX-2介导的通路, 并能被COX-2抑制剂、EGFR阻滞剂所阻断^[6-7]。根除*H pylori*, 胃黏膜COX-2的表达明显减少^[4]。研究还发现*H pylori*可刺激增加IL-8生成, 使胃上皮细胞发生癌变^[8]。动物实验也发现^[9], COX-2的表

达增加了PGE2的合成, PGE2诱导细胞增殖并刺激Bcl-2蛋白表达, 后者可抑制细胞凋亡, 使细胞增殖和凋亡失去平衡而促进肿瘤发生。

本课题结果显示在所检测的胃癌患者中 *H pylori*感染率高达72%, 符合其流行病学。在 *H pylori*感染的胃癌组织中COX-2的表达较无感染的胃癌高(*P*<0.05), 结果表明了COX-2的表达与*H pylori*感染有关。在胃癌组织中COX-2表达增高, 说明COX-2的高表达可能与*H pylori*致胃癌机制有关。其原因可能是*H pylori*感染导致炎症, 产生大量炎症因子激活COX-2, COX-2不仅是启动炎症反应的关键酶, 而且通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管形成等机制参与各种肿瘤的发生、发展过程, 根除*H pylori*能使COX-2下调或消失。因此在胃癌的防治以及预防复发中, 根除*H pylori*与COX-2抑制剂的应用都是非常重要的。

4 参考文献

- 1 Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-1073
- 2 Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1336-1345
- 3 肖炜明, 施瑞华, 丁岩冰, 龚卫娟, 丁永玲, 薛艳. 胃癌组织中EGFR和COX-2表达的意义及其相关性. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 123-128
- 4 王小虎, 李胜保, 吴清明. 根除Hp前后胃窦粘膜COX-2表达的变化. *胃肠病学和肝病杂志* 2000; 9: 283-285
- 5 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielański W, Duda A, Marlicz K, Starzyńska T, Hahn EG. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach--role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 2001; 7: 1092-1107
- 6 Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco Cdel V, Ricci V, Ciardiello F, Romano M. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth

- factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2015-2021
- 7 Chen CN, Sung CT, Lin MT, Lee PH, Chang KJ. Clinicopathologic association of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 183-188
- 8 Joh T, Kataoka H, Tanida S, Watanabe K, Ohshima T, Sasaki M, Nakao H, Ohhara H, Higashiyama S, Itoh M. Helicobacter pylori-stimulated interleukin-8 (IL-8) promotes cell proliferation through transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by disintegrin and metalloproteinase (ADAM) activation. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2081-2089
- 9 Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 3-21

■同行评价

本文论述了 *H pylori* 对胃黏膜 COX-2 表达的影响及意义, 设计合理, 结论具有临床科研价值。

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》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, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于 15 d 内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

RASSF1A基因启动子区甲基化在胃癌组织中的检测

刘培, 姜相君, 葛银林

■背景资料

RASSF1A是多种人类肿瘤中失活的一种抑癌基因, 研究发现其失活的主要机制是该基因启动子区的甲基化。

刘培, 姜相君, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院消化内科 山东省青岛市 266011

葛银林, 青岛大学医学院生物化学与分子生物学教研室 山东省青岛市 266021

作者贡献分布: 此课题由刘培与姜相君设计; 研究过程中由刘培操作完成; 研究所用器材及分析工具由葛银林提供; 数据分析及本论文写作由刘培与姜相君完成。

通讯作者: 姜相君, 主任医师, 266011, 山东省青岛市胶州路1号, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院消化内科。

drjxj@163.com

电话: 0532-82789581

收稿日期: 2009-08-14 修回日期: 2009-10-09

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Detection of RASSF1A promoter methylation in gastric cancer

Pei Liu, Xiang-Jun Jiang, Yin-Lin Ge

Pei Liu, Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Yin-Lin Ge, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Affiliated to Qingdao University, 1 Jiaozhou Road, Qingdao 266011, Shandong Province, China drjxj@163.com

Received: 2009-08-14 Revised: 2009-10-09

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To detect RAS association domain family protein 1A (RASSF1A) promoter methylation and analyze its correlation with clinical and pathological parameters in gastric cancer.

METHODS: Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect RASSF1A promoter methylation in tumor and tumor-adjacent tissues from 39 gastric cancer patients and in 30 control specimens from superficial gastritis patients or healthy volunteers.

RESULTS: The rate of RASSF1A promoter methylation was significantly higher in gastric cancer than in tumor-adjacent tissues and control specimens (64.1% vs 7.7% and 0%, respectively; both $P < 0.01$). No correlation was found between RASSF1A promoter methylation and

age, gender, tumor differentiation or lymph node metastasis in patients with gastric cancer.

CONCLUSION: RASSF1A promoter methylation is closely associated with the oncogenesis of gastric cancer. MSP is a novel and specific method for detection of promoter region methylation and can be used to diagnose gastric carcinoma.

Key Words: Stomach neoplasm; RASSF1A gene; Methylation; Methylation-specific PCR

Liu P, Jiang XJ, Ge YL. Detection of RASSF1A promoter methylation in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3144-3147

摘要

目的: 检测胃癌组织中RASSF1A基因启动子区甲基化状况, 并探讨其与临床病理特征的关系。

方法: 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation-specific PCR, MSP) 检测39例胃癌组织, 及相应癌旁组织和30例对照组织中RASSF1A基因启动子区甲基化水平。

结果: 胃癌组织中RASSF1A基因启动子区甲基化率显著高于癌旁组织甲基化率及对照组 (64.1% vs 7.7%, 0%, 均 $P < 0.01$)。胃癌组织中不同年龄、性别、分化程度及淋巴结转移与否的RASSF1A基因甲基化率的差异均无统计学意义。

结论: RASSF1A基因启动子区甲基化与胃癌的发生密切相关, MSP法是一种快速、敏感的基因甲基化检测方法, 可用于胃癌的辅助诊断。

关键词: 胃癌; RASSF1A基因; 甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应

刘培, 姜相君, 葛银林. RASSF1A基因启动子区甲基化在胃癌组织中的检测. *世界华人消化杂志* 2009; 17(30): 3144-3147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3144.asp>

0 引言

近年越来越多的研究显示, 抑癌基因启动子区

■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

高甲基化导致其转录抑制、表达缺失, 而且在肿瘤临床确诊之前就可检测出特异基因的甲基化异常现象, 为肿瘤的早期诊断提供了新的思路^[1]. Ras相关区域家族1A(ras-association domain family 1A, RASSF1A)基因是近年发现的新型抑癌基因. 研究提示, 该基因启动子区高甲基化造成的失活在多种肿瘤中很常见^[2]. 我们采用MSP检测胃癌组织、相应癌旁组织及对照组织中RASSF1A基因启动子区甲基化水平, 探索RASSF1A基因启动子区甲基化与胃癌发生、发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 所有标本取自2008-12/2009-05青岛市市立医院, 其中39例胃癌及相应癌旁组织取自普外科手术切除标本(癌旁组织取自距癌边缘5 cm), 30例对照组织(其中慢性浅表性胃炎组织18例及正常胃黏膜组织12例)取自门诊胃镜室. 所有标本自取材后立即放入液氮中, 后转入-70℃冰箱保存. 癌组织、癌旁组织和胃镜活检组织都经病理检查, 并确认手术标本切缘为阴性.

1.2 方法

1.2.1 DNA提取: 酚/氯仿法提取DNA, 测 A_{260}/A_{280} 比值为1.8-2.0, 存于-20℃冰箱保存备用.

1.2.2 DNA修饰: 采用Zymo Research公司EZ DNA甲基化试剂盒-Gold(D5005), 按说明书步骤进行操作.

1.2.3 引物设计: 根据RASSF1A基因组DNA启动子区CpG岛DNA序列设计甲基化特异性PCR引物, RASSF1A甲基化(M)和非甲基化(U)引物(表1)由TaKaRa宝生物公司合成.

1.2.4 MSP: PCR反应体积25 μ L, 其中Perfectshot™ Taq(loading dye mix)(TaKaRa宝生物公司)12.5 μ L, 引物各0.5 μ L, 修饰后的DNA 2 μ L, 余下的以灭菌双蒸水补齐至25 μ L. 反应条件: 95℃预变性15 min, 94℃变性30 s, 64℃(甲基化)/59℃(非甲基化)退火50 s, 72℃延伸30 s, 40个循环后, 72℃延伸10 min.

1.2.5 对照设置: 以灭菌双蒸水代替DNA作为空白对照; 以健康志愿者血清DNA作为正常对照; 健康志愿者外周血淋巴细胞DNA经CpG甲基化转移酶M.SssI(New England Biolabs)处理后作为甲基化对照, 以未行甲基化处理的健康志愿者外周血淋巴细胞DNA作为非甲基化对照.

1.2.6 电泳: 取6 μ L扩增产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳. 用UIV凝胶电泳成像及图像分析系统进行

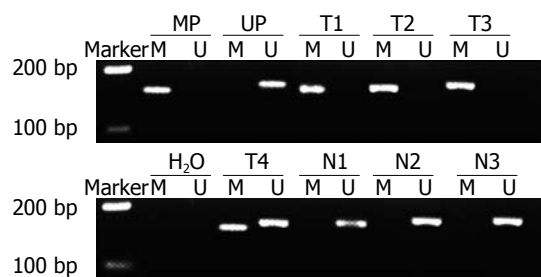


图1 MSP反应产物琼脂糖电泳结果. MP: 甲基化对照; UP: 非甲基化对照; H₂O: 灭菌双蒸水代替DNA电泳结果作为空白对照; M: 甲基化; U: 非甲基化; T1、T2、T3、T4: 胃癌组织; N1、N2、N3: 癌旁组织; T4同时出现甲基化与非甲基化.

拍照和图像分析.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 组间比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RASSF1A基因启动子区CpG岛甲基化 胃癌组、癌旁组及对照组RASSF1A基因启动子区CpG岛甲基化率分别为64.1%(25/39)、7.7%(3/39)和0.0%(0/30). 胃癌组的甲基化率显著高于癌旁组和对照组(均 $P < 0.01$). 其中有2例胃癌组织同时发生甲基化与非甲基化. 3例发生甲基化的癌旁组织所对应的胃癌组织均发生了甲基化(图1).

2.2 RASSF1A基因启动子区CpG岛高甲基化与胃癌临床病理特征的关系 胃癌组织中不同年龄、性别、分化程度的RASSF1A基因甲基化率差异均无统计学意义. 有淋巴结转移组甲基化率(73.9%)较无淋巴结转移组甲基化率(50.0%)高, 但差别无统计学意义. 进展期胃癌和早期胃癌组织中RASSF1A基因甲基化率分别为66.7%和33.3%, 2组比较无明显差异(表2).

3 讨论

DNA甲基化是具有可逆性与遗传性的一种表观遗传学修饰方式^[3], 由S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 在DNA甲基转移酶的催化下, CpG二核苷酸的胞嘧啶环5'位置的氢被活性甲基所取代, 从而转变成5-甲基胞嘧啶. 基因启动子区若发生甲基化, 可致基因转录沉寂, 表达受抑制. 研究证实DNA甲基化机制是抑癌基因失活的一个重要途径, 与肿瘤发生密切相关.

2000年Dammann *et al*^[4]从3号染色体短臂(3p21.3)上克隆出RASSF1基因, 由于选择性剪接和启动子的不同存在不同的转录本, 其中最普遍且最重要的是转录本A(RASSF1A).

■创新盘点

本文用甲基化特异性PCR方法检测胃癌及癌旁组织和正常对照组织中RASSF1A基因启动子区甲基化发生率, 并分析其与肿瘤临床病理特征的关系, 为胃癌的早期诊断提供方法和依据.

■应用要点

本研究显示, RASSF1A基因启动子区高甲基化可能是胃癌早期发展中的一个分子事件。将RASSF1A启动子区高甲基化作为标志物, 结合其他几种甲基化率高的基因, 用甲基化特异性PCR法进行联合检测, 可为胃癌的早期诊断提供重要的理论依据和方法。

表 1 MSP引物序列及产物片段

基因	正义	反义	长度(bp)
RASSF1A(M)	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	AACAAACGCGAACCGAACG	166
RASSF1A(U)	GGGGTTTTGTGAGAGTGTG	ACTAACAAACACAAACCAAACA	170

表 2 胃癌组织中RASSF1A基因启动子区甲基化与临床病理特征的关系 $n(\%)$

临床病理特征	RASSF1A基因		P值
	甲基化	非甲基化	
性别			0.478
男	19(67.9)	9(32.1)	
女	6(54.5)	5(45.5)	
年龄(岁)			0.225
>50	22(68.8)	10(31.2)	
≤50	3(42.9)	4(57.1)	
分期			0.289
I - II期	1(33.3)	2(66.7)	
III - IV期	24(66.7)	12(33.3)	
淋巴结转移			0.179
有	17(73.9)	6(26.1)	
无	8(50.0)	8(50.0)	
分化程度			0.326
低	16(72.7)	6(27.3)	
中	8(57.1)	6(42.9)	
高	1(33.3)	2(66.7)	

RASSF1A作为一种抑癌基因, 通过多种途径抑制细胞生长、促进细胞凋亡和衰老, 其功能失活导致对肿瘤的抑制作用丧失。RASSF1A在正常组织中100%表达, 而在多种恶性肿瘤中表达明显降低或缺失, 现已明确主要机制是由于其启动子区CpG岛高甲基化^[2]。

甲基化特异性PCR法是一种敏感度高, 特异性强, 快速的基因甲基化检测方法。本研究显示对照组中无1例RASSF1A基因启动子区发生甲基化, 胃癌组中该基因启动子区甲基化率(64.1%)显著高于癌旁组(7.7%)($P<0.01$)。Kang *et al*研究发现RASSF1A甲基化现象在胃癌中频繁出现, 而在其他病变(如胃腺瘤、肠上皮化生及慢性胃炎等)中出现很少^[5-6]。结合文献及本研究结果, 提示RASSF1A基因启动子区甲基化是胃癌频发的分子事件, 可能是胃癌早期发展中的一个步骤。本研究中3例癌旁组织中RASSF1A基因发生了甲基化, 因标本来自胃癌患者, 虽经病理证实为非癌组织, 分子水平上可能并非正常, 因为表观遗传学改变的出现一般早于肿瘤

的发生。

从本研究临床病理特征分析发现, 胃癌组织中不同年龄、性别、分化程度的RASSF1A基因启动子区甲基化率的差异均无统计学意义。有淋巴结转移组甲基化率(73.9%)较无淋巴结转移组(50.0%)高, 但2组间比较也无明显差异性。上述结果与文献研究结果一致^[7]。另分析发现进展期胃癌和早期胃癌组织中RASSF1A基因甲基化率分别为66.7%和33.3%, 两者比较无明显差异性, 而Byun *et al*^[8]研究显示该基因缺失或异常低表达与肿瘤的分期和分级有关, 结果不一致, 可能与本研究中早期胃癌例数少有关, 需进一步探讨。

本研究显示, RASSF1A基因启动子区高甲基化与胃癌的发生密切相关, 可能是胃癌早期发展中的一个分子事件。将RASSF1A启动子区高甲基化作为标志物, 结合其他几种甲基化率高的基因, 用甲基化特异性PCR法进行联合检测, 可为胃癌的早期诊断提供重要的理论依据和方法。另发现, 不表达RASSF1A的肿瘤细胞株经甲基化抑制剂5-氮-2脱氧胞苷(5-aza-dC)处理后, 该基因表达恢复^[9], 故抑制和逆转抑癌基因甲基化为防治肿瘤提供了新的思路, 需进一步研究。

4 参考文献

- 胡佳乐, 陈云. RASSF1A基因甲基化作为肿瘤生物学标志的临床应用. 中国肿瘤生物治疗杂志 2008; 15: 296-300
- Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001; 20: 1509-1518
- 孙树汉. 肿瘤的表现遗传学研究. 中国肿瘤生物治疗杂志 2008; 15: 8-12
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319
- Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 519-526
- Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH,

- Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
- 7 Ye M, Xia B, Guo Q, Zhou F, Zhang X. Association of diminished expression of RASSF1A with promoter methylation in primary gastric cancer from patients of central China. *BMC Cancer* 2007; 7: 120
- 8 Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7034-7038
- 9 Murray PG, Qiu GH, Fu L, Waites ER, Srivastava G, Heys D, Agathangelou A, Latif F, Grundy RG, Mann JR, Starczynski J, Crocker J, Parkes SE, Ambinder RF, Young LS, Tao Q. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004; 23: 1326-1331

■同行评价

本文选题新颖, 紧密联系当前研究热点, 为临床早期诊断胃癌及治疗提供了新的思路, 可读性较好。

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》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。(科学编辑: 李军亮 2009-10-28)

奥沙利铂、顺铂联合5-FU/LV治疗晚期胃癌的系统评价

王娜, 关泉林, 姜雷, 周欣, 高晨, 杨含腾

■背景资料

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 居恶性肿瘤发病的第2位, 是一种严重威胁人们身体健康的疾病。胃癌治疗早期仍以手术为主, 但对于不能手术或手术后复发转移的晚期胃癌, 化疗占有十分重要的地位。

王娜, 关泉林, 姜雷, 周欣, 高晨, 杨含腾, 兰州大学第一医院肿瘤外科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 此课题由王娜与关泉林设计; 王娜及周欣检索文献, 收集数据; 统计分析由王娜与姜雷完成; 本论文写作由王娜、关泉林及姜雷完成; 高晨与杨含腾在研究中给予极大的工作支持。

通讯作者: 关泉林, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院肿瘤外科, guanquanlin@163.com

收稿日期: 2009-08-24 修回日期: 2009-10-18

接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-10-28

Cisplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin versus oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a systematic review

Na Wang, Quan-Lin Guan, Lei Jiang, Xin Zhou, Chen Gao, Han-Teng Yang

Na Wang, Quan-Lin Guan, Lei Jiang, Xin Zhou, Chen Gao, Han-Teng Yang, Department of Oncological Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Professor Quan-Lin Guan, Oncological Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. guanquanlin@163.com

Received: 2009-08-24 Revised: 2009-10-18

Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To assess the efficacy of FOLFOX chemotherapy [oxaliplatin plus 5-fluorouracil (5-FU)/leucovorin (LV)] for advanced gastric cancer through a meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs) published worldwide in English or Chinese.

METHODS: Cochrane strategy in combination with manual search was used to identify previously published randomized controlled trials by searching Cochrane library, PubMed, EMBase, Chinese Biomedical Literature Database (CBM), China Journal Full-text Database, and Chinese Scientific Journal Full-text Database (CSJD).

RESULTS: Eight randomized controlled trials involving a total of 662 patients were studied. Of the eight trials, 7 were performed in China, and 1 in the United States. Evaluation of the method-

ological quality showed that the eight RCTs had a moderate risk of bias. Although no statistical difference was found in the 1-year survival rate $OR = 1.37$, 95% confidence interval (95%CI) = [0.93-2.01] between patients treated with oxaliplatin plus 5-FU/LV and cisplatin plus 5-FU/LV, there was a significant difference in the overall survival rate between the two groups of patients ($OR = 1.93$, 95%CI = 1.41-2.66). The incidences of grade 3/4 side effects such as leucopenia and nausea and vomiting were slightly lower in patients treated with oxaliplatin plus 5-FU/LV than in those treated with cisplatin plus 5-FU/LV ($OR = 0.48$ and 0.26 , 95%CI = 0.28-0.83 and 0.16-0.42, respectively). In contrast, the incidence of peripheral neurotoxicity was higher in patients treated with oxaliplatin plus 5-FU/LV than in those treated with cisplatin plus 5-FU/LV ($OR = 1.20$, 95%CI = 0.44-3.30). No significant difference was noted in the incidence of thrombocytopenia between the two groups of patients ($OR = 7.38$, 95%CI = 2.16-25.23).

CONCLUSION: Oxaliplatin plus 5-FU/LV is superior to cisplatin plus 5-FU/LV in improving overall survival rate, but not 1-year survival rate and median survival time. The incidences of nausea and vomiting and leucopenia are lower in patients treated with oxaliplatin plus 5-FU/LV than in those treated with cisplatin plus 5-FU/LV.

Key Words: Oxaliplatin; 5-fluorouracil; Leucovorin; Advanced gastric cancer; Meta-analysis

Wang N, Guan QL, Jiang L, Zhou X, Gao C, Yang HT. Cisplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin versus oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3148-3154

摘要

目的: 收集中英文相关随机对照试验的研究结果进行Meta分析, 对奥沙利铂联合5-FU/LV(FOLFOX)方案的疗效进行评价。

方法: 采用Cochrane系统评价方法, 检索Cochrane Library、PubMed、EMBase、中国

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

生物医学文献数据库(CBM)、中文期刊全文数据库, 中文科技期刊全文数据库(CSJD)等数据库, 并辅以手工检索和其他检索。

结果: 共8个随机对照试验662例患者纳入研究, 其中1个随机对照研究来自美国, 另7个均来自中国; 且8篇RCT存在偏倚的可能性均为中等程度。FOLFOX与顺铂联合5-FU/LV(PLF)方案治疗胃癌在1年生存率方面差异无统计学意义, 但在总的生存率方面有显著差异。其OR值和95%CI分别为1.37(0.93, 2.01)、1.93(1.41, 2.66)。3/4级的不良反应中白细胞减少和恶心呕吐等治疗组轻于对照组; 在外周神经毒性反应方面, 治疗组重于对照组, 差异有统计学意义; 而血小板减少方面差异无统计学意义。其OR值和95%CI分别为0.48(0.28, 0.83)、0.26(0.16, 0.42)、7.38(2.16, 25.23)及1.20(0.44, 3.30)。

结论: FOLFOX方案总有效率优于PLF方案, 但是1年生存率并不优于对照组。白细胞减少和恶心呕吐治疗组轻于对照组, 外周神经毒性重于对照组。

关键词: 奥沙利铂; 5-氟尿嘧啶; 亚叶酸钙; 晚期胃癌; Meta分析

王娜, 关泉林, 姜雷, 周欣, 高晨, 杨含腾. 奥沙利铂、顺铂联合5-FU/LV治疗晚期胃癌的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3148-3154

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3148.asp>

0 引言

尽管胃癌的发病率在世界上的很多地区已有所下降, 但仍居恶性肿瘤发病的第2位, 且这些患者一般到晚期才得到就诊^[1]。目前胃癌切除术后患者的5年生存率为30%-60%, 手术切除是治愈的主要手段, 但对于不能手术或手术后复发转移的晚期胃癌, 化疗占有十分重要的地位。研究表明, 联合化疗可以提高晚期胃癌患者的生活质量和总生存率。但目前尚无标准的方案, 以往联合化疗的基本方案是5-氟尿嘧啶(5-FU)+亚叶酸钙(CF)+顺铂(DDP)。奥沙利铂化学名为反式-右旋-1, 2-环己二氨草酸铂, 是第三代铂类抗癌药物, 与顺铂、卡铂抗癌机制和耐药机制不完全相同, 与5-FU有明显的协同作用, 并且对5-FU耐药的肿瘤有效。为比较奥沙利铂联合氟尿嘧啶和亚叶酸钙方案与顺铂联合氟尿嘧啶和亚叶酸钙方案治疗晚期胃癌的疗效与安全性, 本研究拟对这2种方案的随机对照试验的结果进行

系统评价, 就其疗效和安全性及效价比进行比较研究, 为临床决策分析提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 以英文关键词“leucovorin, calcium folinate, LV, Leucovorin Calcium, CF, cisplatin, DDP, CDDP, cis-platinum, neoplatin, fluorouracil, 5-FU, oxaliplatin, L-OHP, OXA, gastric cancer, stomach cancer, gastric carcinoma, stomach neoplasm, gastric tumor等”及中文关键词“亚叶酸钙, 甲酰四氢叶酸钙, 顺铂, 5-FU, 奥沙利铂, 草酸铂, 乐沙定, 胃癌, 胃肿瘤等”检索数据库PubMed(1966-2009年)、EMBase(1974-2009年)、Cochrane Library(2009年第1期)、中国生物医学文献数据库(1978-2009年)、维普中文科技期刊数据库(1989-2009年)、中国CNKI学术总库(1994-2009年)、NCCN(2009年)、ESMO(2008年)、ASCO(2009年)、SCI(1961-2009年), 获得有关文献80篇。阅读题名、摘要, 排除综述7篇, 腹腔灌注化疗的1篇, 化疗后行切除术的1篇, 其他非随机对照试验、非临床研究文献20篇。剩余51篇查找原文, 排除未达到纳入标准的文献43篇, 最终纳入的8个研究均为随机对照试验。

1.2 方法

1.2.1 观察对象: 纳入标准: 经病理或细胞学证实的晚期胃癌患者; 性别不限; 化疗前Kps评分 ≥ 60 分, 血常规、肝肾功能、心肺功能均正常, 且有可测量的客观指标; 全部病例至少完成2个周期。排除标准: 有化疗禁忌证; 患有胃癌合并其他疾病者; 上次化疗距现在不到1 mo者; 失访率超过20%的研究。

1.2.2 研究类型: 随机对照试验(RCT)和半随机对照试验(qRCT)。

1.2.3 干预措施: 奥沙利铂联合5-FU/LV方案与顺铂联合5-FU/LV方案比较。

1.2.4 测量指标: (1)中位生存时间; (2)有效率; (3)生存率, 生活质量; (4)不良反应。

1.2.5 纳入试验的筛选: 两位研究者独立阅读所获文献题目和摘要, 在排除明显不符合纳入标准的试验后, 对可能符合纳入标准的试验阅读全文, 以确定是否真正符合纳入标准。两位研究者交叉核对纳入试验的结果, 对有分歧而难以确定其是否纳入的试验, 通过讨论或由第三研究者决定其是否纳入。

1.2.6 质量评价: 对最后纳入文献的全文依据Cochrane评价手册5.0的文献质量评价方法进行

■研究前沿

联合化疗可以提高晚期胃癌患者的生活质量和总生存率, 但目前对于晚期胃癌仍无标准的化疗方案, 因此选择效率高、化疗不良反应少的方案是目前化疗研究热点之一, 也一直是肿瘤科医生们不断追求的目标。

■创新盘点

本文按照严格的纳入标准,广泛收集关于奥沙利铂联合5-FU/LV与顺铂联合5-FU/LV比较治疗晚期胃癌的原始随机对照研究,采用Meta分析可以从统计学角度达到增大样本含量,提高检验效能的目的,从而得到比较可靠的结论。

表 1 8个纳入研究的基本病例资料

作者	国家	平均年龄(岁)	试验组/对照组(<i>n</i>)	Kps评分	化疗疗程(每周4 wk)	化疗方案(试验组/对照组)及剂量(mg/m ²)
李智强 ^[2]	中国	54.0	24/25	>60	4周期	(O: 130+L: 100+F: 500)/(P: 20+L: 100+F: 500)
叶书成 <i>et al</i> ^[3]	中国	52.8	56/52	≥70	≥3周期	(O: 130+L: 200+F: 300)/(P: 80+L: 200+F: 300)
冯立艳 <i>et al</i> ^[4]	中国	52.6	26/22	≥60	≥2周期	(O: 130+L: 75+F: 500)/(P: 20+L: 75+F: 500)
于桂萍 <i>et al</i> ^[5]	中国	56.0	36/37	≥70	≥2周期	(O: 130+L: 200+F: 500)/(P: 15+L: 200+F: 500)
赵予军 <i>et al</i> ^[6]	中国	61.0	32/33	≥70	≥2周期	(O: 130+L: 100+F: 250)/(P: 15+L: 100+F: 250)
文世民 <i>et al</i> ^[7]	中国	54.0	23/23	≥60	3-4周期	(O: 130+L: 200+F: 600)/(P: 15+L: 100+F: 250)
符炜 <i>et al</i> ^[8]	中国	50.0	27/26	≥60	≥2周期	(O: 130+L: 100+F: 300)/(P: 80+L: 100+F: 300)
Al-Batran <i>et al</i> ^[9]	美国	64.0	112/108	不清楚	5周期	(O: 85+L: 200+F: 2600)/(P: 50+L: 200+F: 2000)

O: 奥沙利铂; L: 亚叶酸钙; F: 5-FU; P: 顺铂。

评价,内容包括:(1)随机方法:随机方法正确;随机方法不清楚;随机方法不充分;(2)分配隐藏:隐藏方法正确;隐藏方法不清楚;隐藏方法不充分;(3)盲法:盲法正确;盲法不清楚;盲法不充分;(4)随访:随访正确;随访未描述;随访不充分;(5)结果处理是否采用意向处理分析(ITT)。将纳入的研究分为3个等级:A(低度偏倚)所用的评价指标均正确;B(中度偏倚)有1项或1项以上指标未描述;C(高度偏倚)有1项或1项以上指标不正确或未使用。

1.2.7 资料提取:两位研究者按照预先设计的资料提取表,一位研究者提取和录入资料,另一位核对,如遇意见不一致双方讨论解决或由第三研究者判断,缺乏的资料通过电话或信件与作者联系予以补充。提取的主要资料包括:(1)试验的基本情况、两组患者的基线情况和疾病状况;(2)试验设计、研究时间和随访时间、干预药物(措施)、结局测量指标、失访人数和失访处理、反应研究质量的指标。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan5.0统计软件进行Meta分析。计数资料采用比值比(OR)作为疗效分析统计量;计量资料采用加权均数差(WMD)或标准化均数差(SMD),各效应量均以95%可信区间(CI)表示。根据可能出现的异质性因素进行亚组分析,并采用 χ^2 值检验各研究间的异质性。当亚组内各研究间有统计学同质性($P>0.1$, $I^2<50\%$),采用固定效应模型对各研究进行Meta分析;如各研究间存在统计学异质性($P<0.1$, $I^2>50\%$),采用随机效应模型进行分析。各亚组间有统计学同质性($P>0.05$, $I^2<50\%$)采用固定效应模型计算总结果;存在统计学异质性($P<0.05$, $I^2>50\%$)采用随机效应模型计算总结果。异质性源于低质量研究,进行敏感

表 2 纳入研究的方法学质量

作者	随机方法	盲法	失访	分配隐藏	ITT 分析
李智强 ^[2]	UA	NO	NO	NO	UA
叶书成 <i>et al</i> ^[3]	YES	NO	NO	NO	UA
冯立艳 <i>et al</i> ^[4]	UA	NO	NO	NO	UA
于桂萍 <i>et al</i> ^[5]	UA	NO	NO	NO	UA
赵予军 <i>et al</i> ^[6]	UA	NO	NO	NO	UA
文世民 <i>et al</i> ^[7]	UA	NO	NO	NO	UA
符炜 <i>et al</i> ^[8]	UA	NO	YES	NO	UA
Al-Batran <i>et al</i> ^[9]	YES	NO	YES	YES	A(低度偏倚)

UA: 不清楚。

性分析。如亚组只有1项研究仍采用Meta分析相同的统计量。

2 结果

2.1 纳入研究的基本特征 纳入各研究患者的依存性以及治疗组与对照组基线相似性均较好(表1)。


2.2 质量评价 本系统评价所纳入的文献存在着不同程度的方法学质量问题,其中只有2篇^[3,9]描述了具体的随机方法,2篇^[8-9]提到了随访,1篇^[9]提到了分配隐藏,1篇^[9]进行了ITT分析。具体资料见表2。

2.3 中位生存时间 在中位生存时间方面试验组和对对照组之间无统计学差异。

2.4 生存率 纳入各研究只有5个研究比较了1年生存率的报道,没有远期生存率的报道。各研究间无异质性($P = 0.96$, $I^2 = 0\%$),采用固定效应模型。两方案在1年总生存率方面的差异无统计学意义($OR = 1.37$, 95%CI: 0.93-2.01, 表3)。

2.5 总有效率 8个研究都比较了总有效率。各研究间无异质性($P = 0.75$, $I^2 = 0\%$),采用固定效应

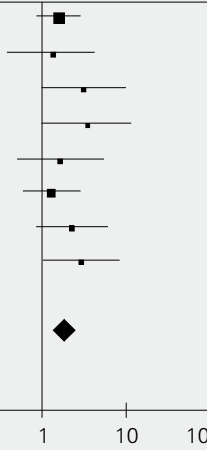
表 3 FOLFOX方案与PLF方案的1年生存率的比较

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight(%)	Odd Ratio M-H, Fixed, 95%CI	Odd Ratio M-H, Fixed, 95%CI
	Events	Total	Events	Total			
Al-Batran <i>et al</i> 2008	50	112	42	106	53.6	1.23 [0.72, 2.11]	
冯立艳 <i>et al</i> 2006	9	25	6	22	9.2	1.50 [0.43, 5.20]	
符炜 <i>et al</i> 2004	13	27	10	26	11.9	1.49 [0.50, 4.43]	
文世民 <i>et al</i> 2004	12	23	8	23	8.6	2.05 [0.63, 6.69]	
于桂萍 <i>et al</i> 2008	15	36	13	37	16.8	1.32 [0.51, 3.40]	
Total (95%CI)		223		214	100.0	1.37 [0.93, 2.01]	
Total events	99		79				
Heterogeneity: $\chi^2 = 0.64$, $df = 4$ ($P = 0.96$); $I^2 = 0\%$							
Test for overall effect: $Z = 1.60$ ($P = 0.11$)							

■应用要点

本研究提示, FOLFOX方案与常规PLF方案治疗晚期胃癌相比较, 总有效率高, 由于晚期胃癌的患者多伴有食欲不振、恶心、呕吐, 选择消化系统不良反应小的奥沙利铂, 更有助于提高患者的生活质量和临床受益疗效, 值得临床进一步总结观察。

表 4 FOLFOX方案与PLF方案总的有效率的比较

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight(%)	Odd Ratio M-H, Fixed, 95%CI	Odd Ratio M-H, Fixed, 95%CI
	Events	Total	Events	Total			
Al-Batran <i>et al</i> 2008	39	112	26	106	32.1	1.64 [0.91, 2.96]	
冯立艳 <i>et al</i> 2006	14	26	10	22	9.2	1.40 [0.45, 4.38]	
符炜 <i>et al</i> 2004	18	27	10	26	6.3	3.20 [1.04, 9.85]	
李智强 2006	14	24	7	25	5.3	3.60 [1.09, 11.86]	
文世民 <i>et al</i> 2004	13	23	10	23	8.0	1.69 [0.53, 5.42]	
叶书成 <i>et al</i> 2005	34	56	28	52	21.1	1.32 [0.62, 2.85]	
于桂萍 <i>et al</i> 2008	19	36	12	37	10.3	2.33 [0.90, 6.02]	
赵予军 <i>et al</i> 2007	17	32	9	33	7.7	3.02 [1.07, 8.50]	
Total (95%CI)		336		324	100.0	1.93 [1.41, 2.66]	
Total events	168		122				
Heterogeneity: $\chi^2 = 4.27$, $df = 7$ ($P = 0.75$); $I^2 = 0\%$							
Test for overall effect: $Z = 4.04$ ($P < 0.0001$)							

模型. 总有效率方面的差异有统计学意义($OR = 1.93$, 95%CI: 1.41-2.66, 表4).

2.6 生活质量 纳入各研究均无生活质量的报道.

2.7 不良反应

2.7.1 外周神经毒性反应: 5个研究比较了外周神经毒性反应. 各研究间无异质性($P = 0.85$, $I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型. 外周神经毒性反应方面的差异有统计学意义($OR = 7.38$, 95%CI: 2.16-25.23, 表5).

2.7.2 白细胞减少: 7个研究比较了白细胞减少. 各研究间无异质性($P = 0.44$, $I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型. 白细胞减少方面的差异有统计学意义($OR = 0.48$, 95%CI: 0.28-0.83, 表6).

2.7.3 血小板减少: 7个研究比较了血小板减少. 各研究间无异质性($P = 0.46$, $I^2 = 0\%$), 采用固定

效应模型. 血小板减少方面的差异无统计学意义($OR = 1.20$, 95%CI: 0.44-3.30, 表7).

2.7.4 恶心呕吐: 8个研究都比较了恶心呕吐. 各研究间无异质性($P = 0.12$, $I^2 = 38\%$), 采用固定效应模型. 恶心呕吐方面的差异有统计学意义($OR = 0.26$, 95%CI: 0.16-0.42, 表8).

奥沙利铂的不良反应表现为外周神经病变、过敏反应和肝脏毒性等. 最严重的神经病变还是1级(66%), 2级(22%)的不良反应比较常见, 只有不到10%的患者出现3/4级不良反应^[10]. 由纳入的文献^[2-9]来看, 治疗组3/4级的不良作用中白细胞减少和恶心呕吐轻于对照组, 差异有统计学差异, 而血小板减少方面差异无统计学意义. 在外周毒性反应方面, 试验组大于对照组, 且差异有统计学意义. 因此临床治疗时应慎重,

■同行评价

FOLFOX方案治疗胃癌有较多报道, 作者对全世界中英文相关随机对照试验研究的结果进行Meta分析, 采用Cochrane系统进行评价, 比较其与顺铂联合5-FU/LV方案疗效, 有一定应用价值。

表 5 FOLFOX方案与PLF方案外周毒性的比较

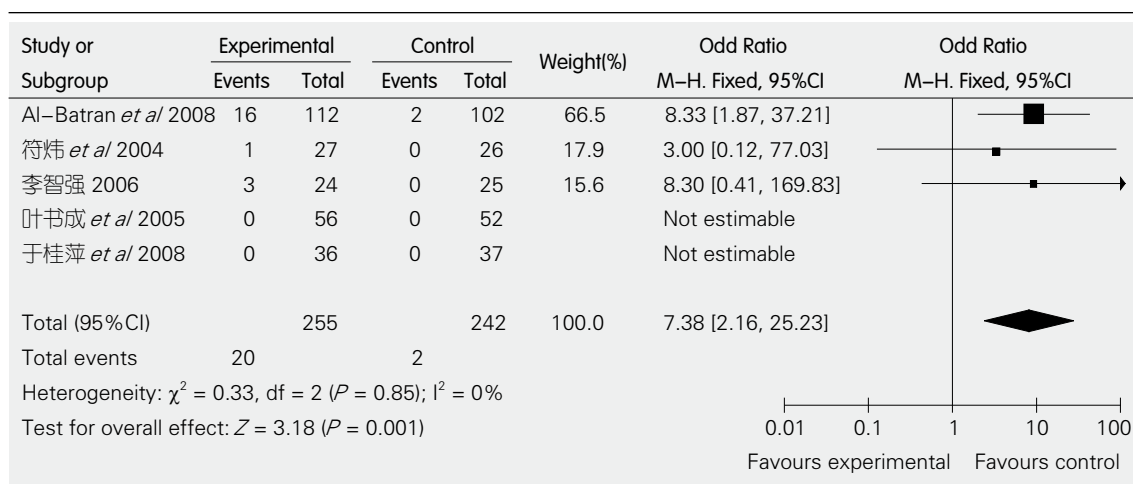
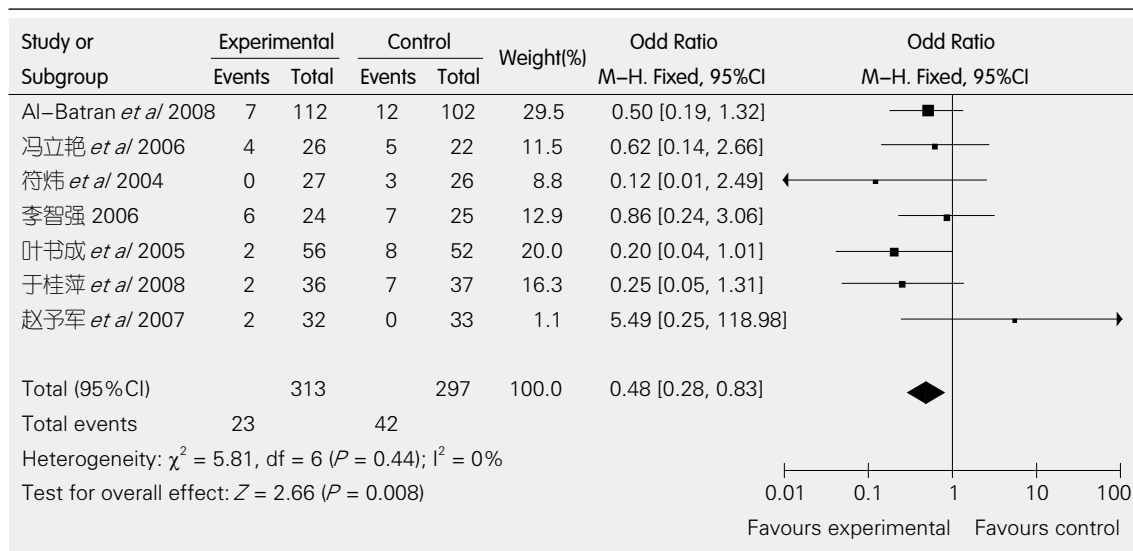


表 6 FOLFOX方案与PLF方案白细胞减少的比较



应根据患者的个体差异制定个体化方案。

3 讨论

胃癌是化疗不太敏感的肿瘤, 但是由于就诊时大部分已经是进展期胃癌, 多数已失去手术机会, 手术切除率约50%, 部分患者在5年内出现原位复发或远处转移, 对不能手术或术后复发及转移的晚期胃癌, 应接受以化疗为主的综合性治疗, 争取延长生命, 提高生活质量。5-FU是胃癌化疗的重要药物, 单独使用有效率为20%^[11]。亚叶酸钙可增加5-FU的抗癌活性。铂类化疗药物在晚期胃癌的化疗中已被广泛地应用。奥沙利铂是第3代铂类抗癌药物, 具有水溶性好、毒性低和抗癌谱广等特点, 剂量限制性毒性为神经系统毒性, 而顺铂主要的限制性毒性为严重

的恶心、呕吐即消化系反应。奥沙利铂的毒性较顺铂显著降低, 患者耐受性好, 同时减少了支持治疗费用, 可广泛与其他药物联用。奥沙利铂作用强于顺铂, 与顺铂没有交叉耐药性^[12], 对顺铂耐药的肿瘤细胞仍然对奥沙利铂敏感。该研究的Meta分析结果显示: FOLFOX方案的总有效率优于PLF方案, 但是1年生存率没有统计学差异。目前2种方案临床上应用都比较广泛, 从不良反应来考虑, FOLFOX方案其白细胞下降, 恶心、呕吐发生率均低于PLF方案; 由于晚期胃癌的患者多伴有食欲不振、恶心、呕吐, 无疑选择奥沙利铂, 其消化系毒性轻微, 更有助于提高患者的生活质量和临床受益疗效。但由于本文所纳入的原始文献中都没有评价患者的2年生存率和5年生存率等, 只评价了1年生存率和总得有

表 7 FOLFOX方案与PLF方案血小板减少的比较

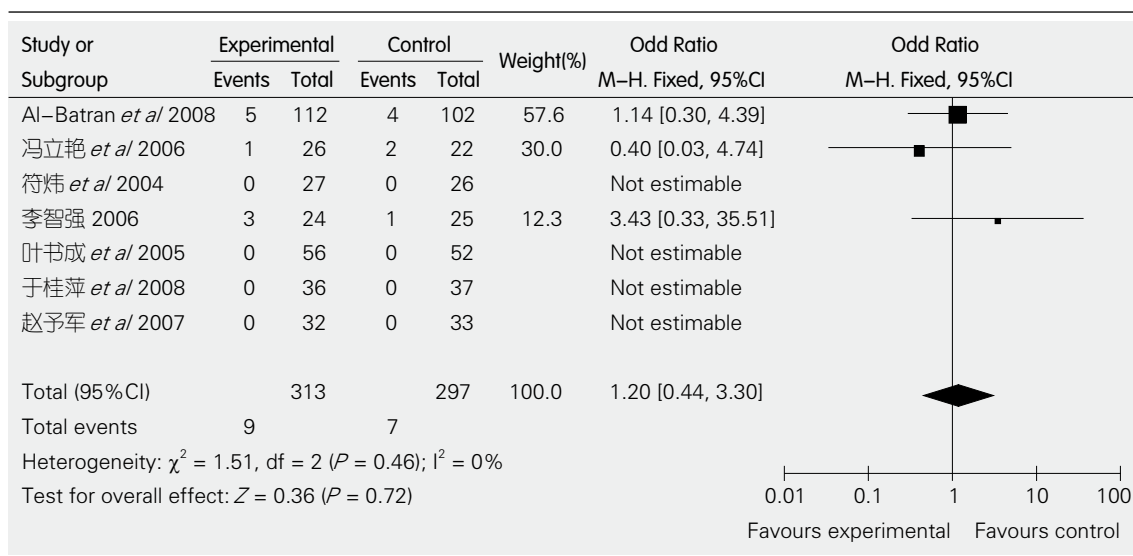
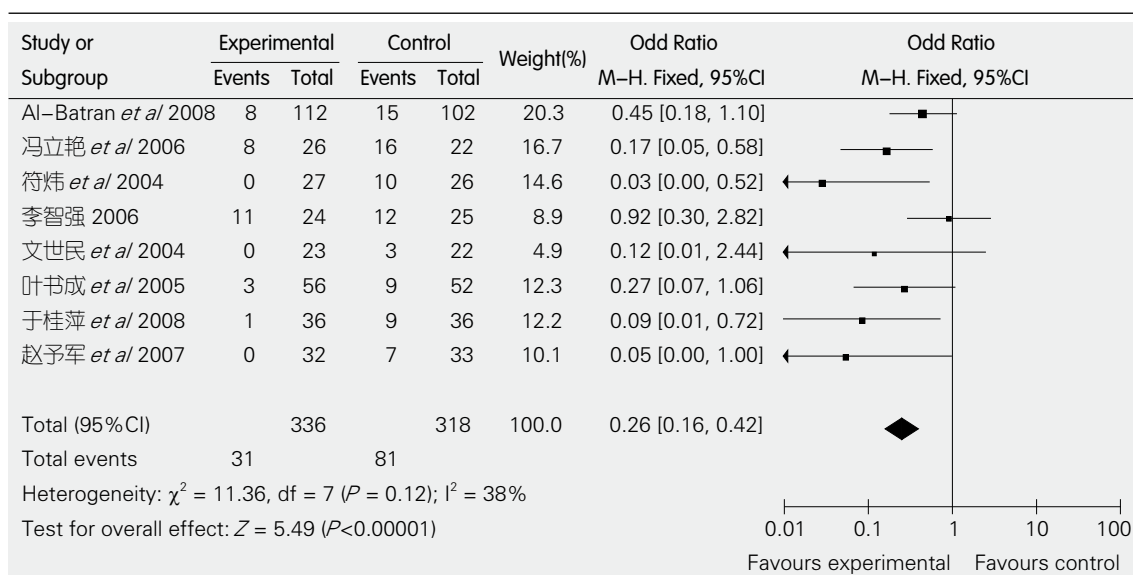


表 8 FOLFOX方案与PLF方案恶心呕吐的比较



效率, 所观察的指标不足, 因此需要更多的临床试验。

本系统评价纳入的研究质量高低不等, 纳入研究对于盲法的描述都不清楚, 因此实施偏倚和测量偏倚的可能性大。所纳入的研究中只有2篇^[3,9]提到了具体的随机方法, 因此选择性偏倚的可能性大。因此以后的研究应该叙述详细的盲法和分配隐藏的具体方法。所纳入的文献中也只有2篇^[8-9]提到了失访, 1篇^[9]进行了ITT分析, 因此在一定程度上都影响了本系统评价的质量。

从方法学可以看出, 本系统评价文献搜集全面, 纳入的研究均为随机对照试验, 质量尚

可。本研究存在潜在的几个缺陷: (1)虽然该Meta分析所纳入文献质量均较高, 但是他是二次研究, 受限于原始研究固有的一些潜在偏倚。(2)纳入文献基本上来自中国, 本研究所纳入文献存在发表偏倚的可能性大。(3)各研究受试对象的基线情况完全相同可能会使合并后结果的存在潜在的偏倚。(4)纳入研究随访时间较短, 测量指标不全面, 部分终点指标如生活质量、中位生存期等无法定量评价, 各研究同样存在报道不全面的问题。(5)各研究在试验进行前均未发表protocol, 与通讯作者联系试验设计实施的具体步骤, 部分环节不清楚。因此, 纳入研究在设计实施过程中可能存在一些潜在的偏倚。

本系统评价纳入文献存在不同程度方法学质量问题,一定程度上降低了本系统评价结果的可靠性和全面性,再加上纳入的原始文献的统计资料的不完整也一定程度上影响了本系统评价的结果的可靠性。

纳入研究报道不全面,建议以后的研究都能按照CONSORTS声明的要求全面规范的报道研究结果,晚期胃癌的预后较差,化疗的目的是为了提高生活质量和延长患者生存期,因此生活质量的测评是很重要的指标,建议以后的研究都能按照统一的QOL量表评价生活质量,本研究显示两方案对在提高患者1年生存率方面无差异,建议以后的研究能有更长时间的随访,两方案的远期疗效尚需要更长时间的观察。同时,在安全性和有效性相似的情况下,经济性的评价是确定化疗优选方案一个重要指标,期待以后的研究能有经济学的评价,以期为临床决策提供更有利的证据。本研究纳入研究7篇来自中国,胃癌的发病在全球有着明显的地域差异,遗传是胃癌发病的一个很重要的危险因素,再者地域不同人群的耐药基因可能不同,因此需要更多来自其他国家和地区的随机对照试验进一步来证实。

FOLFOX方案与常规PLF方案治疗晚期胃癌相比较,总有效率高,消化系不良反应小,但在1年生存率方面无差异,外周神经毒性方面反应重于顺铂组。由于受纳入文献质量的限制,本系统评价所得结论论证强度不高,应用上述证据尚需慎重。期待大样本、高质量的随机对照试验进一步证实。

4 参考文献

- 1 Lee KH, Hyun MS, Kim HK, Jin HM, Yang J, Song HS, Do YR, Ryoo HM, Chung JS, Zang DY, Lim HY, Jin JY, Yim CY, Park HS, Kim JS, Sohn CH, Lee SN. Randomized, Multicenter, Phase III Trial of Heptaplatin 1-hour Infusion and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy Comparing with Cisplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res Treat* 2009; 41: 12-18
- 2 李智强. FOLFOX4方案辅助化疗中晚期胃癌24例临床观察. *实用肿瘤学杂志* 2006; 20: 323
- 3 叶书成, 袁国珍, 郝万红, 徐刚, 张建光, 张长虹. 以奥沙利铂为主联合化疗晚期胃癌的研究. *临床荟萃* 2005; 20: 1150-1152
- 4 冯立艳, 王立波, 赵丽波. OLF和LFP方案治疗晚期胃癌的临床疗效. *中国肿瘤临床与康复* 2006; 13: 503-505
- 5 于桂萍, 李英林. 奥沙利铂联合亚叶酸钙和5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌36例. *陕西医学杂志* 2008; 37: 859-861
- 6 赵予军, 简国庆, 吕素兰. 奥沙利铂联合亚叶酸钙、5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌的临床研究. *中国医药导报* 2007; 4: 22-23
- 7 文世民, 潘荣强. 奥沙利铂联合5-氟尿嘧啶/亚叶酸钙治疗晚期胃癌临床疗效观察. *川北医学院学报* 2004; 19: 11-12
- 8 符炜, 吴剑平, 陆虹. 以草酸铂为主的联合化疗方案治疗晚期胃癌. *临床肿瘤学杂志* 2004; 9: 615-617
- 9 Al-Batran SE, Hartmann JT, Probst S, Schmalenberg H, Hollerbach S, Hofheinz R, Rethwisch V, Seipelt G, Homann N, Wilhelm G, Schuch G, Stoehlmacher J, Derigs HG, Hegewisch-Becker S, Grossmann J, Pauligk C, Atmaca A, Bokemeyer C, Knuth A, Jäger E. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1435-1442
- 10 Eng C. Toxic effects and their management: daily clinical challenges in the treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 207-218
- 11 Rougier P. Docetaxel delivers new management opportunities for gastrointestinal carcinomas. *Anticancer Drugs* 1995; 6 Suppl 4: 25-29
- 12 普绍平, 杨懿焜, 高文桂, 余尧, 刘伟平. 草酸铂的合成及其结构表征. *贵金属* 2000; 21: 26-27

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《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(科学编辑:李军亮 2009-10-28)

胰腺实性-假乳头状瘤临床病理观察14例

易敏, 王嵘, 王建国, 周世英, 张淑坤, 刘红明

易敏, 青海省肿瘤医院病理科 青海省西宁市 810007
王嵘, 青海省肿瘤医院肿瘤科 青海省西宁市 810007
王建国, 周世英, 张淑坤, 青海省人民医院病理科 青海省西宁市 810007
刘红明, 西宁市第一人民医院病理科 青海省西宁市 810000
作者贡献分布: 易敏与王嵘共同设计此课题, 对此文所作贡献均等; 研究过程由易敏、王嵘、张淑坤及刘红明操作完成; 数据分析由王建国及周世英完成; 本文写作由易敏、王嵘及张淑坤共同完成。
通讯作者: 易敏, 主治医师, 810007, 青海省西宁市, 青海省肿瘤医院病理科. wangyueying050205@163.com
电话: 0971-7191954
收稿日期: 2009-08-27 修回日期: 2009-09-29
接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Clinicopathological features of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: an analysis of 14 cases

Min Yi, Rong Wang, Jian-Guo Wang, Shi-Ying Zhou, Shu-Kun Zhang, Hong-Ming Liu

Min Yi, Department of Pathology, Qinghai Provincial Tumor Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China
Rong Wang, Department of Tumor, Qinghai Provincial Tumor Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China
Jian-Guo Wang, Shi-Ying Zhou, Shu-Kun Zhang, Department of Pathology, Qinghai Province People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China
Hong-Ming Liu, Department of Pathology, the First People's Hospital of Xining, Xining 810000, Qinghai Province, China

Correspondence to: Min Yi, Department of Pathology, Qinghai Provincial Tumor Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China. wangyueying050205@163.com
Received: 2009-08-27 Revised: 2009-09-29
Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To analyze the clinicopathological and immunohistochemical features of solid-pseudopapillary tumors of the pancreas (SPTP).

METHODS: The clinicopathological and immunohistochemical data of 14 SPTP patients and 5 islet cell tumor patients (including 3 cases of non-functional islet cell tumors and 2 cases of functional islet cell tumors) were analyzed retrospectively.

RESULTS: The ratio of male to female in 14 SPTP patients was 1 : 6. Their median age was

28 years old. The median diameter of the tumors was 7.25 cm. Histologically, the tumors were composed of pseudopapillary and solid structures. The solid areas were composed of uniform cells. The pseudopapillary structure with a fibrovascular core was remarkable. Immunohistochemically, the tumors were negative for E-cadherin and chromogranin A, but positive for β -catenin and CD10. The positive rates of nuclear and cytoplasmic β -catenin staining in SPTP were 100% and 78.5% (11/14), respectively. In contrast, no membrane β -catenin staining was detected.

CONCLUSION: SPTP is a rare type of tumor that has low malignant potential and remarkable pseudopapillary and is predominantly found in young women. Abnormal E-cadherin and β -catenin expression may be related to the tumorigenesis of SPTP.

Key Words: Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas; Clinical pathology; Immunohistochemistry; Differential diagnosis

Yi M, Wang R, Wang JG, Zhou SY, Zhang SK, Liu HM. Clinicopathological features of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: an analysis of 14 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3155-3159

摘要

目的: 探讨胰腺实性-假乳头状瘤(SPTP)的临床病理形态特征以及免疫组织化学特点。

方法: 回顾性总结分析14例SPTP的临床病理资料及免疫组织化学结果, 并以5例胰岛细胞瘤为对照(其中3例为非功能性, 2例为功能性)。

结果: 14例SPTP患者中男女比例1 : 6, 平均年龄28岁, 瘤体平均直径7.25 cm, 包膜均完整, 组织学显示肿瘤细胞大小一致, 排列成实性片状区和假乳头状区, 围绕纤维血管复层排列而形成的假乳头状突起为特征性组织学改变。E-Cadherin、嗜铬素A均为阴性; β -Catenin在细胞核100%表达阳性, 胞质阳性率为78.5%(11/14), 细胞膜均为阴性; CD10表达阳性。

■背景资料

SPTP是一种较为罕见的胰腺肿瘤, 组织学起源不明, 生物学行为属于低度恶性, 好发于年轻女性, 临床表现不典型, 影像学及病理镜下观察易与非功能性胰岛细胞瘤相混淆。本文旨在探讨SPTP临床病理学特点及鉴别诊断要点。

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■相关报道

仲韦霞 *et al*认为, SPTP的细胞源于胰腺的潜能干细胞, 具有多向分化的能力, 主要以外分泌为特征, 部分伴有神经内分泌分化。

结论: SPTP是好发年轻女性的低度恶性肿瘤, 有特征性的假乳头结构; β -Catenin与E-Cadherin的异常表达可能与肿瘤的发生相关。

关键词: 胰腺实性-假乳头状瘤; 临床病理; 免疫组织化学; 鉴别诊断

易敏, 王嵘, 王建国, 周世英, 张淑坤, 刘红明. 胰腺实性-假乳头状瘤临床病理观察14例. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3155-3159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3155.asp>

0 引言

胰腺实性-假乳头状瘤(solid-pseudopapillary tumor of pancreas, SPTP)是一种较罕见的肿瘤, 近年来随着发病率的增加逐渐被认识. 该肿瘤占胰腺外分泌肿瘤的0.17%-2.7%^[1], 其生物学行为属于低度恶性, 组织学起源不明, 临床表现无特殊, 多数患者外科手术切除后预后良好, 但有10%-15%的患者可有复发、转移等恶性行为, 死亡率极低^[2]. 本研究分析青海省肿瘤医院(5例)、青海省人民医院(6例)及西宁市第一人民医院(3例)病理科1998-2008年SPTP临床病理资料, 并进行 β -Catenin、E-Cadherin、CD10等12项免疫组织化学检测, 对比5例胰岛细胞瘤, 旨在探讨其临床病理学特点及鉴别诊断要点。

1 材料和方法

1.1 材料 复习1998-2008年胰腺肿瘤手术切除标本切片, 其中确诊为SPTP 14例, 女12例, 男2例, 男:女为1:6, 年龄14-42(平均28)岁. 并选择5例胰岛细胞瘤为对照, 其中3例为非功能性, 2例为功能性。

1.2 方法 14例SPTP病例均挑选典型病变蜡块, 常规病理切片行HE染色, 免疫组织化学染色采用EnVision法. 抗体选用 β -Catenin、E-Cadherin、CD10、CK18、AAT、NSE、嗜铬素A、突触素、波形蛋白、PR、Ki-67、CD56等12项. 所有抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 使用PV-9000试剂盒及DAB显色系统显色. 并以5例胰岛细胞瘤进行对比。

2 结果

2.1 临床资料 14例SPTP病例中, 所有患者发病前无明显诱因, 无烟酒等不良嗜好, 无肿瘤家族史. 其中8例无临床症状, 因体检发现上腹部包块而就诊, 6例表现为上腹部不适或疼痛, 病程1 wk-6 mo. 影像学表现为界限清楚的低密度肿块,

常伴囊性变. 8例患者术前检查包括癌胚抗原、糖链抗原、甲胎蛋白、CA125、CA242、肝肾功能及血淀粉酶等, 仅1例患者出现轻度血清淀粉酶升高, 余均无异常. 术后大体标本检查发现, 肿瘤位于胰头部4例, 胰尾部4例, 胰颈体部2例, 胰体尾部2例, 胰头颈交界区1例, 胰旁1例. 随访1.6-9.7年, 患者均健在, 且无复发及转移. 具体情况见表1。

2.2 病理观察

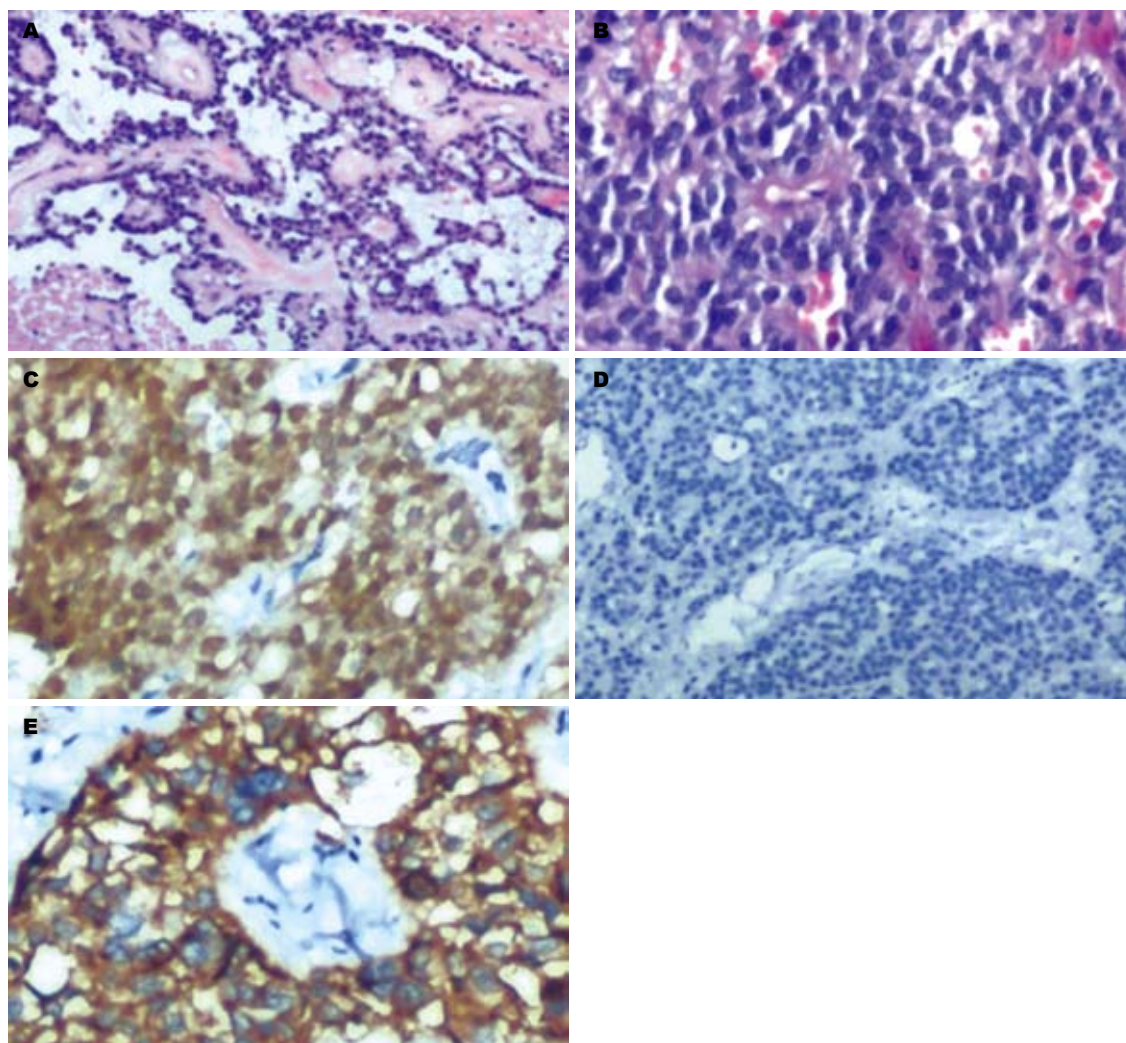
2.2.1 肉眼观察: 瘤体直径2.3-20 cm(表1), 平均7.25 cm, 均有完整包膜, 呈圆形、椭圆形, 边界清楚, 切面呈囊实性. 囊性区呈多房状, 内壁常附有松软暗红色絮状物; 实性区呈灰白及灰黄色, 质地松软。

2.2.2 光镜观察: 14例SPTP组织学表现相似, 肿瘤由实性区、假乳头状区及囊性区构成. 实性区肿瘤细胞排列成片状、巢状, 被纤细的小血管分隔, 形态较一致, 呈圆形或卵圆形, 中等大小, 胞质嗜酸性, 细胞核的异型性小, 呈卵圆形, 位于中心, 染色质细腻, 部分细胞有核沟, 核分裂像罕见. 假乳头状区显示特征性分支状乳头, 含纤维血管轴心, 乳头表面肿瘤细胞排列整齐, 形成假小梁, 乳头轴心内胶原纤维部分黏液变性(图1A), 其间有大量薄壁血管或血窦. 间质可见泡沫组织细胞聚集及胆固醇裂隙. 囊性区常可见出血、坏死. 其中2例肿瘤细胞之间及胞质内可见典型的嗜酸性小体(图1B); 3例间质内可见散在的钙化。

2.3 免疫表型 14例病例中SPTP肿瘤细胞E-Cadherin均为阴性(图1D); β -Catenin均为阳性, 且定位表现明显的特异性, 细胞核100%的表达阳性, 胞质阳性率为78.5%(11/14), 而细胞膜均为阴性(图1C); Vimentin均呈弥漫强阳性表达, 假乳头区表达程度较实性区强; NSE呈较强阳性表达(12/14); AAT表达阳性程度为可疑至++; CD10、CD56表达+至+++ (图1E); CK18不同程度表达阳性; ChrA几乎全部为阴性表达, 仅1例为弱阳性; Syn部分阳性; PR呈强阳性表达; Ki-67指数在0.05%-1.50%, 实性区较假乳头区稍强(表2). 在胰岛细胞瘤对照组中, 肿瘤细胞均表达E-Cadherin, 阳性定位在细胞膜及胞质; β -Catenin的阳性表达则定位在细胞膜及胞质, 核均为阴性; CD10均不表达(表3)。

3 讨论

SPTP是一种较少见的胰腺非内分泌源性肿瘤, 占胰腺所有外分泌肿瘤的0.17%-2.70%^[1], 最早



■创新盘点

在本研究中首次使用免疫标志物E-Cadherin对SPTP肿瘤细胞进行检测, 标记均为阴性, 分析可能与SPTP独特的组织形态学(围绕纤维血管复层排列而形成的假乳头结构)及侵袭性行为相关。

图1 SPTP组织病理观. A: 假乳头状区, 显示特征性分支状乳头, 含纤维血管轴心, 间质黏液变性(HE × 100); B: 实性区, 瘤细胞间有嗜酸性小球(HE × 200); C: SPTP瘤细胞 β -Catenin细胞质及细胞核阳性(EnVision × 200); D: SPTP瘤细胞E-Cadherin表达阴性(EnVision × 100); E: SPTP瘤细胞CD10细胞质阳性(EnVision × 400).

由Frantz在1959年描述. 近10年来随着对该病认识加深, 发病率逐渐升高^[2]. 该病主要发生在青春期及青年女性, 男性罕见, 10岁以下儿童极少见, 40岁以上发病者也不超过10%, 无明显种族倾向^[3]. 临床表现可无症状或仅上腹部不适, 影像学(如CT、B超等)表现为界限清楚的低密度肿块, 常伴囊性变, 不易将其与非功能胰岛细胞瘤鉴别^[4]. 大体上胰腺SPTP多为包膜完整、境界清楚的肿块, 圆形、囊实性, 可触及波动感, 直径3-20(平均8-10) cm; 可见于胰腺的任何部位, 以胰头尾部多见, 也可发生在胰腺旁或胰腺以外的腹腔或腹膜后. 本组中有1例位于胰腺旁, 仅与胃壁轻微粘连(有学者认为可能起源于异位胰腺). 肿物切面多为半囊半实性, 囊性区常见坏死和出血, 实性区较少见.

SPTP的组织起源一直备受争议. 目前多数学者认为SPTP的细胞源于胰腺的潜能干细胞,

具有多向分化的能力, 主要以外分泌为特征, 部分伴有神经内分泌分化^[5]. 本组研究SPTP中14例均可见到 β -Catenin在细胞核和/或细胞质中沉积, E-Cadherin均为阴性, 这结果提示 β -Catenin及E-Cadherin的基因突变可能与SPTP的发生密切相关. β -Catenin是Wnt信号转导通路的下游元件, 介导信号从胞膜至胞质再到细胞核的传递. 糖原合成酶激酶-3 β 的磷酸化作用引起 β -Catenin降解, 使后者在正常细胞胞质中的游离量保持较低水平. 在SPTP肿瘤细胞中, 异常的Wnt信号抑制糖原合成酶激酶-3 β 磷酸化, 从而抑制 β -Catenin降解, 导致 β -Catenin在胞质中积累, β -Catenin转位入核增多, 与T细胞转录因子形成复合物, 促进下游靶基因, 如细胞周期蛋白D1、c-Myc等表达增多, 从而引起增生^[6-8]. E-Cadherin为上皮细胞之间及细胞与细胞外基质黏附的重要黏附因子, 是位于染色体16q12.1上的基因编

■应用要点

本研究提示,在SPTP与非功能性胰岛细胞瘤组织形态学检查鉴别困难时,可联合应用免疫标志物 β -Catenin、E-Cadherin、CD10、AAT、NSE、嗜铬素A、突触素、波形蛋白、PR及CD56相鉴别,以提高对SPTP的诊断率。

表 1 14例SPTP患者临床病理资料

序号	性别	年龄(岁)	肿瘤直径(cm)	肿瘤部位	手术方式	随访时间(年)	随访结果
1	女	14	6.0	胰头	胰十二指肠切除术+胆囊切除	1.6	正常
2	女	32	8.0	胰体尾	胰体尾+脾切除	2.9	正常
3	男	36	7.2	胰尾	胰体尾切除+脾切除+胃后壁切除	3.0	正常
4	女	42	2.3	胰头	胰十二指肠切除术	3.1	正常
5	女	16	5.5	胰尾	胰体尾+脾切除	3.2	正常
6	女	28	4.0	胰头	胰头肿瘤切除术	4.3	正常
7	女	19	4.6	腹腔	腹腔肿瘤切除术	4.3	正常
8	女	26	12.0	胰尾	胰体尾切除+脾切除	6.9	正常
9	女	23	5.3	胰头	胰十二指肠切除术	7.4	正常
10	女	39	3.6	胰尾	胰体尾切除+脾切除	7.9	正常
11	女	28	5.0	胰颈体交界区	胰腺肿瘤切除	8.2	正常
12	女	27	12.0	胰头颈	胰头肿瘤切除, 胰肠吻合, 空肠-空肠Roux-en-Y吻合术	8.6	正常
13	男	15	6.0	胰颈体	胰颈体切除术	8.8	正常
14	女	15	20.0	胰体尾	胰尾肿瘤及脾切除	9.7	正常

表 2 14例SPTP患者免疫组织化学染色结果

序号	β -Cat	E-Cad	CD10	Vim	PR	ChrA	NSE	AAT	CK18	Syn	CD56	Ki-67(%)
1	核/浆	-	++	++	+++	-	+	++	+	-	+	0.05
2	核	-	+++	++	++	-	+++	++	弱+	+	+	1.00
3	核/浆	-	+	++	+	-	+	++	弱+	±	+	0.30
4	核/浆	-	++	+++	+++	-	-	+	+	+	灶状+	0.02
5	核/浆	-	+++	++	+++	弱+	++	+	+	+	+	4.00
6	核/浆	-	+	+	+	-	+	+	+	-	++	6.00
7	核/浆	-	+	+++	+++	-	++	+	+	-	+	0.05
8	核/浆	-	+	+++	+++	-	+++	±	+	-	++	0.01
9	核/浆	-	+++	+++	+++	-	+++	++	+	+	+	1.50
10	核/浆	-	+	+++	+	-	++	+	+	-	+	0.02
11	核	-	+	+++	++	-	++	+	+	-	+	0.05
12	核	-	+	+++	+	-	++	+	±	±	+	0.10
13	核/浆	-	++	++	+++	-	-	-	+	+	+	0.02
14	核/浆	-	+	++	+	-	++	+	+	+	+	1.20

表 3 胰岛细胞瘤对照组免疫组织化学结果

序号	β -Cat	E-Cad	CD10	Vim	PR	ChrA	NSE	AAT	CK18	Syn	CD56	Ki-67(%)
1	膜	膜	-	+	+	+++	+++	-	+	++	+	1.0
2	浆	膜/浆	-	-	++	+++	+++	+	++	+++	+++	1.0
3	膜/浆	浆	-	-	-	+	++	-	-	+	±	7.0
4	膜	膜	-	++	-	+	+	+++	+++	++	-	20.0
5	膜/浆	浆	-	+++	+	++	±	++	-	-	++	0.9

码的钙依赖性跨膜糖蛋白, 与其细胞内可溶性连环素(α 、 β 、 γ -连环素)结合形成复合体, 与相邻细胞的E-Cadherin相互连接, 参与细胞黏附和信号的传递, E-Cadherin的功能抑制或表达下降,

可使细胞间黏附能力下降^[9]。据本组研究结果, SPTP独特的组织形态学及侵袭性行为可能与此相关。同时, 本研究14例PR阳性表达提示SPTP的发生、发展可能与PR水平有一定相关性。上

皮标志物(CK18)、腺泡标志物(AAT)、神经内分泌标志物(Syn、ChrA、NSE)和间叶标志物(Vim、CD10、CD56)均有阳性表达,支持SPTP来源于潜能干细胞,具有多向分化能力的学说。

SPTP组织学上可见细胞有实性片状和假乳头状2种排列方式。肿瘤细胞胞质嗜伊红或透亮空泡状,细胞核圆形或卵圆形,染色质细腻,可见核沟,核分裂像罕见。细胞质内及细胞外均可见嗜酸性小体,经淀粉酶消化后PAS阳性。实性区域肿瘤细胞中等大小,并以小血管间隔。远离小血管的肿瘤细胞逐步退变,血管旁细胞围绕纤维血管复层排列而形成假乳头状突起,成为SPTP特征性改变。邻近囊性区域可见泡沫组织细胞、胆固醇裂隙、钙化、异物巨细胞和出血。肿瘤大多有部分或完整包膜,且肿瘤也可侵犯包膜。如果肿瘤出现血管浸润、侵犯神经及周围组织、血管内见瘤栓、核分裂像增多,则考虑肿瘤出现恶性变^[5,10-11]。

该病需与以下肿瘤鉴别:(1)非功能性胰岛细胞瘤,也好发于青年女性,实性区组织形态与SPTP相似,但其有菊形团排列,无假乳头结构,免疫组织化学显示 β -Catenin表达在细胞膜及胞质,细胞核为阴性,E-Cadherin均为阳性,Vim、CD10均为阴性,可资鉴别;(2)胰母细胞瘤,常好发于年幼男孩,组织学特征为腺泡结构伴有鳞状小体,无纤维血管轴心及假乳头排列,insulinase(+)而Vim(-);(3)腺泡细胞癌,该病更常见于老年男性,癌组织与周围分界不清,切面呈结节状,镜下癌组织呈腺泡或小梁状排列而无假乳头状结构,CK(+),insulinase(+),而AAT(-)^[12-14]。

手术切除是SPTP首选治疗方法,常用手术方式包括肿瘤摘除、局部切除、胰十二指肠切除术等,只要肿瘤可完整切除,几种手术方式的预后情况无显著差异^[3,10]。某些直接侵犯而不能完全切除的病例可应用放疗。2000年WHO肿瘤组织分类中认为,虽然SPTP具良性形态学表现,但必须将其归为未定的恶性潜能肿瘤,预后较好。据国内外报道显示,仅有极少数病例术后复发或发生远处转移,且即便局部复发或远处转移(如转移到肝及腹膜)的患者经再次手术,其术后存活期仍可达几年甚至十几年^[15]。SPTP的免疫组织化学Ki-67指数通常很低,也提示SPTP是一种具有低度恶性潜能的肿瘤,其预后良好及存活期较长也成为该病的一大特点。该肿瘤的

恶性程度与血管的浸润,周围神经的浸润,核异型性,核分裂及显著的渐进性坏死相关^[11]。本研究14例患者随访2-10年,均无复发及转移。

致谢: 特别感谢中国医学科学院肿瘤医院苏勤教授对本研究最初设计构思所作贡献。

4 参考文献

- 1 Klimstra DS, Wenig BM, Heffess CS. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17: 66-80
- 2 陈舍黄. 胰腺实性假乳头状瘤的诊断和治疗. 当代医学(学术版) 2008; (142): 64-65
- 3 贾其稳, 曹海霞, 李百文, 王华枫, 袁耀宗, 王建承. 胰腺实性假乳头状瘤的临床病理分析. 胃肠病学 2008; 13: 460-464
- 4 Thambugala GM, Pereira J, Sugo E, Henry G, Cohn RJ. Solid and cystic papillary epithelial neoplasm of the pancreas in an 11-year-old girl: imaging features with pathological correlation. *Australas Radiol* 2006; 50: 373-376
- 5 仲伟霞, 宋化著, 郭玲玲, 穆殿斌, 孙兰萍, 杨爱清, 战雪梅, 李俞慧, 李胜. 胰腺实性假乳头状瘤临床病理特征及预后的研究. 中华普通外科杂志 2006; 21: 244-247
- 6 Tanaka Y, Kato K, Notohara K, Hojo H, Ijiri R, Miyake T, Nagahara N, Sasaki F, Kitagawa N, Nakatani Y, Kobayashi Y. Frequent beta-catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. *Cancer Res* 2001; 61: 8401-8404
- 7 Min Kim S, Sun CD, Park KC, Kim HG, Lee WJ, Choi SH. Accumulation of beta-catenin protein, mutations in exon-3 of the beta-catenin gene and a loss of heterozygosity of 5q22 in solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *J Surg Oncol* 2006; 94: 418-425
- 8 Nishimori I, Kohsaki T, Tochika N, Takeuchi T, Minakuchi T, Okabayashi T, Kobayashi M, Hanazaki K, Onishi S. Non-cystic solid-pseudopapillary tumor of the pancreas showing nuclear accumulation and activating gene mutation of beta-catenin. *Pathol Int* 2006; 56: 707-711
- 9 纪清连, 孙玲玲, 付伟伟, 李霞. 胰腺癌组织Cx43和E-cad表达及意义. 青岛大学医学院学报 2009; 45: 39
- 10 刘桂杰, 李学华, 王力, 李洪光, 刘志恒. 胰腺实性假乳头状瘤的临床特征及手术治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3457-3459
- 11 陈柯, 丁敏, 胡闻, 王晓秋. 胰腺实性-假乳头状肿瘤的超微结构研究. 临床与实验病理学杂志 2006; 22: 681-683
- 12 刘彤华, 刘复生. 疑难外科病理诊断与鉴别诊断. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 210-211
- 13 Zhang H, Liang TB, Wang WL, Shen Y, Ren GP, Zheng SS. Diagnosis and treatment of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 454-458
- 14 师杰, 崔全才. 胰腺实性假乳头状瘤. 诊断病理学杂志 2005; 12: 149-151
- 15 Martin RC, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a surgical enigma? *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 35-40

■同行评价

本文采用回顾性分析的方法,对于SPTP的临床病理、免疫组织化学特征等进行了详细的对比研究,对于临床上更好地鉴别诊断SPTP有较大的指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

不同胰肠吻合方式的临床效果比较

田 夫, 向进见, 李明忠, 蒋雪峰, 邓 清, 秦仁义

■背景资料

目前已有30种以上胰肠吻合方式应用于临床, 主要的胰肠吻合方式仍是端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合和捆绑式胰肠吻合3种。临床上对这3种胰肠吻合方式的临床效果评价仍存在争议。

田夫, 向进见, 李明忠, 蒋雪峰, 邓清, 长江大学附属第一医院普外科 湖北省荆州市 434000

秦仁义, 华中科技大学附属同济医院胆胰外科 湖北省武汉市 430000

作者贡献分布: 此文由田夫与向进见设计构思, 田夫与向进见对此文所作贡献均等; 由向进见、李明忠、蒋雪峰及邓清收集临床资料; 数据分析、图片绘制及论文撰写由向进见完成; 论文由秦仁义审阅。

通讯作者: 向进见, 主治医师, 434000, 湖北省荆州市, 长江大学附属第一医院普外科3病区. xiang-jj@tom.com

电话: 0716-8115027

收稿日期: 2009-08-05 修回日期: 2009-09-22

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-28

Comparison of the efficacy of different methods of pancreaticojejunostomy

Fu Tian, Jin-Jian Xiang, Ming-Zhong Li, Xue-Feng Jiang, Qing Deng, Ren-Yi Qin

Fu Tian, Jin-Jian Xiang, Ming-Zhong Li, Xue-Feng Jiang, Qing Deng, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Ren-Yi Qin, Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 43000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin-Jian Xiang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. xiang-jj@tom.com

Received: 2009-08-05 Revised: 2009-09-22

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To compare the efficacy of end-to-end invaginated pancreaticojejunostomy, duct-to-mucosa pancreaticojejunostomy and binding pancreaticojejunostomy.

METHODS: The clinical data of 157 patient who underwent pancreaticoduodenectomy at our hospital from February 1999 to May 2009 were collected. Of all patients, 61 underwent end-to-end invaginated pancreaticojejunostomy, 66 underwent duct-to-mucosa pancreaticojejunostomy and 30 underwent binding pancreaticojejunostomy. The anastomotic time, postoperative complications, death rate and length of stay were compared.

RESULTS: The mean time to complete end-to-end invaginated pancreaticojejunostomy, duct-to-mucosa pancreaticojejunostomy and binding pancreaticojejunostomy was 35.85 ± 4.73 , 37.18 ± 6.12 and 20.75 ± 4.05 min, respectively. The mean time to complete binding pancreaticojejunostomy was significantly shorter than that to complete end-to-end invaginated pancreaticojejunostomy and duct-to-mucosa pancreaticojejunostomy (both $P < 0.05$). No significant differences were noted in complication rate, mortality rate and length of stay among the three groups. No pancreatic leakage was observed after binding pancreaticojejunostomy.

CONCLUSION: Satisfactory efficacy and low complication rate can be achieved using any of the three methods of pancreaticojejunostomy. Binding pancreaticojejunostomy has more convenient procedure, shorter operative time and less complications than the other two methods.

Key Words: Pancreaticoduodenectomy; Pancreaticojejunostomy; Pancreatic leakage

Tian F, Xiang JJ, Li MZ, Jiang XF, Deng Q, Qin RY. Comparison of the efficacy of different methods of pancreaticojejunostomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3160-3163

摘要

目的: 探讨端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合和捆绑式胰肠吻合的临床应用效果。

方法: 收集本院1999-02/2009-05行胰十二指肠切除术的患者资料157例, 其中采用端端胰肠套入式吻合方式61例, 端侧胰管空肠黏膜吻合方式66例, 捆绑式胰肠吻合方式30例。分析患者胰肠吻合时间、术后并发症各指标、死亡率及住院时间。

结果: 端端胰肠套入式吻合时间、端侧胰管空肠黏膜吻合时间与捆绑式胰肠吻合组比较差异有统计学意义(35.85 ± 4.73 min, 37.18 ± 6.12 min vs 20.75 ± 4.05 min, 均 $P < 0.05$)。3组术

■同行评议者

杨维良, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科; 王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科

后并发症各指标、死亡率及住院时间统计学上无差异. 捆绑式胰肠吻合无1例发生胰漏.

结论: 3种方法均有良好的临床效果及较低的并发症. 捆绑式胰肠吻合具有操作更方便、手术时间短、并发症少的优点, 值得临床推广.

关键词: 胰十二指肠切除术; 胰肠吻合术; 胰漏

田夫, 向进见, 李明忠, 蒋雪峰, 邓清, 秦仁义. 不同胰肠吻合方式的临床效果比较. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3160-3163

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3160.asp>

0 引言

胰肠吻合是胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)消化系重建最重要的一环. 胰肠吻合的主要方式包括端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合和捆绑式胰肠吻合. 为了观察3种不同胰肠吻合方式的效果, 更好地在临床实践过程中恰当地选择胰肠吻合方式, 本文回顾性分析了本院1999年来采用3种不同胰肠吻合方式的临床资料, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本院1999-02/2009-05行胰十二指肠切除术治疗的患者157例, 其中采用端端胰肠套入式吻合方式(A组)61例, 端侧胰管空肠黏膜吻合方式(B组)66例, 捆绑式胰肠吻合方式(C组)30例. 所有病例术中均行胆管T管外引流, 端侧胰管空肠黏膜吻合方式均将胰管引流管引流于体外, 端端胰肠套入式吻合方式中有56例将胰管引流管引流于体外. 捆绑式胰肠吻合有23例将胰管引流管引流于体外. 157例患者中, 男97例, 女60例, 年龄37-67岁. 术前主诉有黄疸(137例)、腹痛(98例)或伴有体质量明显下降(72例), 全部患者均有病理学诊断, 其中胰头癌119例、胆总管下端癌16例、十二指肠乳头癌13例、壶腹癌5例、胰头肿块型慢性胰腺炎3例、胰头实性假乳头状瘤1例. 3组中术前行PTCD减黄者分别为10例、9例和3例.

1.2 方法

1.2.1 端端胰肠套入式吻合: 胰腺断面U型缝合, 并固定胰管引流管. 在距胰腺断面2 cm处将背面胰腺组织与空肠浆肌层做水平褥式缝合, 再将空肠断端全层与胰腺断端间断缝合1圈后, 再将空肠前壁推上胰腺, 即空肠浆膜面与胰腺外膜相贴, 形成反折套入约2 cm, 然后将套上的空肠

前壁浆肌层与胰腺前面组织缝合.

1.2.2 端侧胰管空肠黏膜吻合: 距胰腺断面1.0-1.5 cm处将背面胰腺组织与空肠浆肌层做水平褥式缝合, 再在对应胰腺断端部位切开空肠浆肌层, 切口与胰腺断端大小相当, 将空肠浆肌层向两侧稍加游离, 显露与胰腺断面相当的一片黏膜层, 将胰断端后缘与空肠浆肌层间断缝合, 用尖刀在空肠黏膜戳一小孔, 胰管与空肠黏膜后壁间断缝合2-3针后, 将胰管支撑引流管插入空肠, 胰管与空肠黏膜前壁间断缝合2-3针, 再将胰断端前缘与空肠浆肌层间断缝合.

1.2.3 捆绑式胰肠吻合: 胰腺断端游离3 cm, 固定胰管引流管. 胰断端上下缘预置缝线. 空肠断端3 cm范围用石炭酸棉球伸入肠腔内擦拭, 破坏黏膜分泌功能, 然后再分别用酒精和盐水清洗. 距离空肠10 cm牵拉处, 空肠对系膜缘上做一小孔, 插入止血钳, 并钳夹预置在胰腺断端上下缘的牵引线, 使胰腺断端套入空肠. 随即用3-0薇乔线把空肠缝在胰腺后上、后下、前上、前下予以固定. 在接近空肠断端两组血管之间的系膜上穿过1根10号丝线, 并环绕套在胰腺断端的空肠上结扎, 结扎松紧度以刚好一血管钳尖可通过.

1.2.4 术后早期并发症的判断标准: (1)早期并发症是指术后1 mo内发生的并发症; (2)胰漏诊断标准是指术后3-10 d手术放置的引流管, 每天腹腔引流液大于50 mL, 且含大量淀粉酶(连续3 d测引流液淀粉酶>血清淀粉酶3倍)者, 可定为胰漏; (3)胆漏为持续引流出富含胆汁的引流液大于10 mL, 超过5 d者; (4)胃肠吻合口漏为术后腹腔引流出胃肠内容物者; (5)腹腔或消化系出血为通过腹腔引流管或消化系失血, 血红蛋白浓度低于80 g/L或24 h降低20 g/L, 需最少2单位血补充失血者; (6)腹腔感染为有腹部感染的临床症状且引流出脓性分泌物者; (7)胃瘫判断标准参考文献[1]; (8)手术死亡为术后30 d内死亡者.

统计学处理 采用SPSS16.0进行统计分析. 计数资料组间采用One-way ANOVA法检验, 两组间采用SNK法(*q*检验), 计量资料采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 3组患者术中情况比较 3组患者年龄、性别和疾病构成上无统计学差异(表1).

2.2 3组患者术中情况比较 A组患者胰肠吻合时间为25-45(平均 35.85 ± 4.73) min; B组吻合时间为27-50(平均 37.18 ± 6.12) min; C组为15-26(平

■ 研发前沿

胰十二指肠切除术是腹部外科最大的手术之一, 手术复杂, 术后易出现并发症, 胰漏是胰十二指肠切除术后严重的并发症和死亡原因之一, 故胰肠吻合方式的选择仍是外科医生关注的焦点.

■应用要点

本研究认为捆绑式胰肠吻合具有操作方便、简单易行、容易掌握、手术时间短、且胰肠吻合口漏及吻合口出血等并发症少的优点,在端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合和捆绑式胰肠吻合3种术式中更值得临床应用。

表 1 3组患者术前临床资料比较

	A组 (n = 61)	B组 (n = 66)	C组 (n = 30)
年龄	50.17 ± 13.12	51.34 ± 15.76	52.33 ± 13.67
性别(男/女)	37/24	42/24	18/12
胰头癌	51	48	20
胆总管下端癌	4	7	5
十二指肠乳头癌	4	5	4
壶腹癌	1	4	0
胰头肿块型慢性胰腺炎	0	2	1
胰头实性假乳头状瘤	1	0	0

表 2 3组患者术中情况比较

	A组	B组	C组
胰肠吻合时间 (min)	35.85 ± 4.73	37.18 ± 6.12	20.75 ± 4.05
胰腺质地(软/硬)	17/44	39/27	21/9
胰管直径 (>3 mm/<3 mm)	15/46	60/6	12/18
胰腺残端长径 (>3 cm/<3 cm)	0/61	66/0	0/30

表 3 3组患者术后早期并发症

	A组	B组	C组	P值
胰漏	3	4	0	0.401
胆漏	2	3	1	0.922
胃肠吻合口漏	0	0	0	0.157
腹腔内出血	0	0	0	0.157
消化系出血	2	1	0	0.536
腹腔感染	1	2	1	0.844
肺部感染	3	5	1	0.667
胃瘫	1	1	0	0.786
病死	1	2	0	0.592

均20.75 ± 4.05) min, 与A、B 2组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

2.3 3组患者术后早期并发症发生及术后住院时间 61例端端胰肠套入式吻合发生胰漏3例、胆漏2例、腹腔感染1例、消化系出血1例、肺部感染3例、胃瘫1例, 1例消化系大出血死亡; 66例端侧胰管空肠黏膜吻合发生胰漏4例、胆漏2例、腹腔感染2例、肺部感染5例、消化系出血1例、胃瘫1例, 1例因胆漏腹腔感染致多器官功能衰竭而死亡; 30例捆绑式胰肠吻合无胰漏发生, 出现胆漏1例、腹腔感染1例、肺部感染1例。3组住院时间分别为19.45 ± 5.56、18.36 ± 8.21和(17.73 ± 7.78) d。3组术后并发症各指标、死亡率及住院时间统计学上无差异(表3)。

3 讨论

胰漏是PD后最常见最严重的并发症^[2], 其危害性在于被激活的胰液漏入腹腔, 腐蚀消化周围组织, 引起致命性大出血或不易控制的感染, 严重者可造成患者死亡^[3]。PD后胰漏发生率在5%-25%^[4], 本组胰漏发生率为4.5%, 胰漏形成的根本原因是胰肠吻合口破裂、胰断面损伤自溶液体外渗和或胰腺缝针处胰液外漏等^[5-6]。胰漏的影响因素主要包括胰肠吻合方式、胰腺断面的处理、胰腺质地、胰管直径、术前黄疸等^[7-9]。为减少胰漏的发生, 目前已有30种以上胰肠吻合方式应用于临床^[10]。主要的胰肠吻合方式仍是端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合和捆绑式胰肠吻合3种。对于减少胰漏的发生, 我们有以下几点体会: (1)强调胰腺断面U型缝合; (2)同时采用胰管支撑引流管及胆管T管外引流; (3)行端端胰肠套入式吻合、端侧胰管空肠黏膜吻合时空肠黏膜和胰腺残端或胰管支

撑管间注意确切的缝扎或结扎; (4)为减少胰腺缝针处胰液外漏, 建议使用带针的3-0薇乔缝线。另外本研究中采用捆绑式胰肠吻合术式30例患者中无1例胰漏发生, 说明捆绑式胰肠吻合术式可减少胰漏的发生, 但这仍需临床病例的进一步论证。

对于胰腺断面的处理除常规缝扎止血外, 我们于胰管引流管置入后, 行胰腺断面U型缝合, 一方面可以减少胰腺断面小胰管的外渗, 另一方面可一定程度上缩小胰腺断端面积, 增加胰腺断端硬度, 便于下一步操作。胰腺断端顺利地套入至空肠内, 是端端胰肠套入式吻合预防胰痿的重要环节。部分手术时常因肠管过窄或胰腺残端过大, 胰腺断端不能很好地套入空肠内, 可导致吻合困难而改行端侧胰管空肠黏膜吻合术, 或即使勉强套入, 由于局部张力过大, 易出现术后肠漏^[11]。该术式由于将整个断面套入肠内, 减少了胰腺断面小胰管外渗引起的胰漏, 但由于整个创面暴露于肠液中, 增加了胰腺断面出血的可能^[12]。端侧胰管空肠黏膜吻合常用于肠管过窄或胰腺残端过大而难行胰肠套入的病例, 该术式由于胰腺断面未套入肠腔, 有可能增加由胰腺断面小胰管外渗而引起的胰漏, 同时胰管空肠黏膜吻合口术后易狭窄, 增加了术后慢

性胰腺炎的可能. 彭淑牖教授于1996年报道了彭氏 I 型捆绑式胰肠吻合术式^[13], 很多医院相继开展该术式, 取得了良好的效果. 2001年彭淑牖教授又推出了彭氏 II 型捆绑式胰肠吻合术, 该术式在保证同类 I 型捆绑式胰肠吻合术可靠的手术效果的基础上, 简化了手术操作, 缩短了手术时间, 由原来的平均27 min缩短为16 min^[14].

本研究病例中, 我们根据胰腺残端长径和胰腺残端胰管的直径来决定胰肠吻合的方式. 对于胰腺残端长径大于3 cm者, 为防止肠腔口径与胰腺周径不相匹配, 不论胰腺质地软硬, 均采用端侧胰管空肠黏膜吻合术, 对于胰腺残端长径小于3 cm者, 可采用端端胰肠套入式吻合或捆绑式胰肠吻合, 早期我们主要采用端端胰肠套入式吻合, 近两年对于胰腺质地软者, 我们主要采用彭氏 II 型捆绑式胰肠吻合术. 手术结果表明, 捆绑式胰肠吻合术相对于其他两组, 胰肠吻合时间明显缩短, 且操作方便. 3种胰肠吻合方式术后并发症如胰漏、胆漏、腹腔感染、消化系出血、肺部感染、胃瘫、消化系出血、胃肠吻合口漏、腹腔内出血及死亡率、住院时间无统计学差异, 但从数据上可以看出, 捆绑式胰肠吻合术总的严重并发症比其他2组要少, 无1例发生胰漏, 这与文献报道相似^[15].

我们认为以上3种方法均可以临床应用, 均有良好的临床效果及较低的并发症, 只是在选择吻合方式的时候要综合考虑术者的胰肠吻合习惯, 熟练的程度, 经验的多少, 胰管及肠管的粗细, 胰腺残端的大小、质地, 胰腺与肠管套入的相容性等因素. 通过10年来我们对157例临床病例及其他医疗单位对3种胰肠吻合方式的比较, 认为捆绑式胰肠吻合具有操作方便, 简单易行, 容易掌握、手术时间短、且胰肠吻合口漏及吻合口出血等并发症少的优点, 易于推广, 值得临床应用.

4 参考文献

- 1 刘志毅, 李亚刚, 宋燕, 武洪斌, 谢忠士. 腹部手术后胃瘫综合征的临床研究. 中国老年学杂志 2008; 28: 400-401
- 2 Shrikhande SV, D'Souza MA. Pancreatic fistula after pancreatectomy: evolving definitions, preventive strategies and modern management. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5789-5796
- 3 史卫海, 王人颢. 21例捆绑式胰肠吻合术临床分析. 中国临床医学 2007; 14: 522-523
- 4 Suzuki Y, Fujino Y, Tanioka Y, Hiraoka K, Takada M, Ajiki T, Takeyama Y, Ku Y, Kuroda Y. Selection of pancreaticojejunostomy techniques according to pancreatic texture and duct size. *Arch Surg* 2002; 137: 1044-1047; discussion 1048
- 5 王捷, 陈汝福, 唐启彬, 刘超, 叶华, 吕永添, 伍衡, 张建龙, 肖志宇, 孙健. 胰十二指肠切除术后胆瘘及胰瘘的防治53例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1230-1232
- 6 徐来喜, 余少鸿, 陈先锋. 胰十二指肠切除术后胆瘘及胰瘘的防治53例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1230-1232
- 7 Sari YS, Koç O, Tunali V, Tomaoglu K. Choice of the optimal pancreaticojejunal anastomosis technique: how can we improve patient safety in pancreatic surgery? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 479-82
- 8 Butturini G, Daskalaki D, Molinari E, Scopelliti F, Casarotto A, Bassi C. Pancreatic fistula: definition and current problems. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 247-251
- 9 Poon RT, Fan ST. Decreasing the pancreatic leak rate after pancreaticoduodenectomy. *Adv Surg* 2008; 42: 33-48
- 10 Kang CM, Kim KS, Choi JS, Lee WJ, Kim BR. Personal experience of pancreas reconstruction following pancreaticoduodenectomy. *ANZ J Surg* 2006; 76: 339-342
- 11 潘卫东, 方和平, 邓美海, 刘波, 凌云彪, 汤照峰, 许瑞云. 根据胰颈和胰管的大小抉择不同胰肠吻合术式. 广东医学 2007; 28: 217-218
- 12 马凯, 李延钧, 戴显伟, 卜献民, 卜仁戈, 王亮, 王晓南. 改良胰-肠端端套入式吻合预防胰十二指肠切除术后胰瘘. 中国医科大学学报 2000; 29: 394-395
- 13 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术(附28例报告). 中华外科杂志 1997; 35: 158-159
- 14 彭淑牖, 刘颖斌, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 吴育连, 方河清, 范敏明, 沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术第 I 型和第 II 型的对比研究. 中国实用外科杂志 2002; 22: 279-280
- 15 Peng S, Wang J, Li J, Mou Y, Liu Y, Cai X. Binding pancreaticojejunostomy - a safe and reliable anastomosis procedure. *HPB (Oxford)* 2004; 6: 154-160

■同行评价

本文从胰肠吻合方法的角度对如何预防Whipple术后最为常见的并发症-胰漏提出了讨论, 有一定临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

嗜酸性粒细胞在溃疡性结肠炎患者中的临床及病理学意义

崔熠, 张洁, 李学锋, 陈琳琳, 赵鑫, 卢放根

■背景资料

UC是一种病因和发病机制不明的疾病, 尽管其病理学损伤有其特异性, 但这种特异性甚至在疾病的不同阶段千差万别, 一直困扰着临床及病理学医师, 也使UC的病理学诊断提供不了“金标准”。大部分是综合临床、内镜下表现及排除其他疾病的综合诊断方法。

崔熠, 张洁, 李学锋, 陈琳琳, 赵鑫, 卢放根, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011

作者贡献分布: 此课题由卢放根与崔熠共同设计、卢放根与张洁指导; 研究过程由崔熠完成; 数据分析由崔熠、李学锋、陈琳琳及赵鑫完成; 本文写作由崔熠完成。

通讯作者: 卢放根, 教授, 博士生导师, 410011, 湖南省长沙市人民中路139号, 中南大学湘雅二医院消化内科。

lufanggenyao@163.com

电话: 0731-85295888

收稿日期: 2009-09-14 修回日期: 2009-10-24

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-10-28

Clinicopathological significance of eosinophil granulocyte infiltration in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis

Yi Cui, Jie Zhang, Xue-Feng Li, Lin-Lin Chen, Xin Zhao, Fang-Gen Lu

Yi Cui, Jie Zhang, Xue-Feng Li, Lin-Lin Chen, Xin Zhao, Fang-Gen Lu, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Fang-Gen Lu, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, 139 Renmin Middle Road, Changsha 410011, Hunan Province, China. lufanggenyao@163.com

Received: 2009-09-14 Revised: 2009-10-24

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To examine eosinophil granulocyte (EG) infiltration in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis (UC) and analyze the correlation of EG infiltration with clinical activity index (CAI), endoscope activity index (EAI) and histopathological parameters of the disease.

METHODS: Forty-five UC patients treated at our hospital from November 2007 to December 2008 were divided into two groups according to disease activity: active group ($n = 45$) and remission group ($n = 39$, patients achieving complete and partial remission after treatment for 6 weeks or more during entire treatment course). CAI, EAI and histopathological parameters were used to evaluate disease activity. The number of EGs was counted.

RESULTS: The intestinal mucosa of UC patients

was infiltrated mainly by neutrophils, lymphocytes, plasmacytes and EGs. The inflammatory infiltration was more severe in the active group than in the remission group. Pathological changes in small vessels and glands in the lamina propria as well as crypt abscess were more severe in the active group than in the remission group, while mesenchymal change was more significant in the remission group than in the active group. A significant negative correlation was found between the number of EGs and neutrophils in remitted patients ($r = 0.568$, $P = 0.001$). In the active group, EG infiltration was positively correlated with lymphadenosis and formation of folliculi lymphaticus ($r = 0.755$ and 0.524 , respectively; both $P < 0.01$), and negatively with focal hemorrhage ($r = -0.385$, $P = 0.010$). In the remission group, EG infiltration was positively correlated with goblet cell disappearance ($r = 0.349$, $P = 0.046$).

CONCLUSION: EG infiltration is a potential parameter for evaluating UC activity.

Key Words: Ulcerative colitis; Eosinophil granulocyte; Intestinal mucosa

Cui Y, Zhang J, Li XF, Chen LL, Zhao X, Lu FG. Clinicopathological significance of eosinophil granulocyte infiltration in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3164-3168

摘要

目的: 探讨嗜酸性粒细胞(EG)与评判溃疡性结肠炎(UC)病情的其他指标的一致性, 病理组织学特征与EG的关系。

方法: 选取2007-11/2008-12就诊于湘雅二医院并诊断为UC患者45例, 将患者分为: 活动组($n = 45$)与好转组($n = 39$, 在治疗6 wk到最后1 d, 经DAI、EAI及组织病理学评分, 完全缓解和部分缓解的患者)。采用CAI积分、EAI积分及组织病理学积分评价疾病活动度, 并进行EG计数。

结果: UC患者结肠黏膜组织中的炎症细胞浸润以中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞以及EG为主, 活动组较好转组为重。固有层小血管病变和腺体病变以及隐窝脓肿的出现均以活动

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

组为重. 间质改变好转组较多. EG计数与中性粒细胞计数在好转组呈负相关($r = 0.568$, $P = 0.001$). EG浸润的出现在活动组与淋巴组织增生、淋巴滤泡形成呈正相关($r = 0.755$, 0.524 , 均 $P < 0.01$), 与灶性出血呈负相关($r = -0.385$, $P = 0.010$). 而好转组患者中, 仅有杯状细胞消失与EG浸润呈正相关($r = 0.349$, $P = 0.046$).

结论: EG可能为判断UC活动或好转的指标.

关键词: 溃疡性结肠炎; 嗜酸性粒细胞; 结肠黏膜

崔熠, 张洁, 李学锋, 陈琳琳, 赵鑫, 卢放根. 嗜酸性粒细胞在溃疡性结肠炎患者中的临床及病理学意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3164–3168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3164.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)就其病理损伤而言, 并不是一种严重的疾病, 大部分仅累及结肠远端的黏膜浅层, 而其令人头痛之处在于疾病的慢性持续性和反复发作的过程. 由于发病原因尚不清楚, 临床治疗仅能达到缓解. 针对病因学的预防和治疗因缺乏明确的治疗靶点而搁浅, 病因学发展的欠缺成为制约溃疡性结肠炎治疗的瓶颈. 因此, 对其发病原因的探索成为医学领域长期关注的重点. 尽管溃疡性结肠炎病因尚不清楚, 从患者结肠黏膜损伤特点中提示免疫学损伤是引起结肠黏膜炎症的重要原因之一. 黏膜组织中浸润了大量淋巴细胞和浆细胞, 并可检测出TNF- α , IL-6, IL-8, IL-16, IL-18等多种促炎细胞因子的表达^[1-4]. 用抗TNF- α 抗体阻止促炎细胞因子和抗IL-10抗炎细胞因子治疗溃疡性结肠炎疗效显著^[5-6]. 除此之外, 黏膜防御有另一重要保护机制. 在黏膜屏障和病原体模式分子识别体系完整的情况下, 当肠道内抗原物或有害物透过黏膜屏障, 黏膜内的免疫细胞将会将其清除^[7]. 近年来研究提示, 嗜酸性粒细胞(eosinophile granulocyte, EG)大量存在于肠道黏膜中, 参与组织的修复和重建过程以及参与宿主的黏膜防御功能^[8-10], 但其在UC中的作用仍不清楚. 在DSS诱导的实验结肠炎和引起的胃肠功能紊乱中发现, EG经历了细胞溶解性的脱颗粒现象, 发现EG的染色质溶解和细胞膜破裂, 邻近EG细胞的间隙中存在游离的EG颗粒成分, 说明EG可能在结肠黏膜的病理损伤中起重要作用^[11-12]. 因此, 本研究从UC患者结肠黏膜中原位检测EG数量, 深入分析EG与UC患者的病

情活动, 结肠镜下、大体病理现象和镜下组织改变的关系. 由于对药物治疗的反应不同, 个体处在病程发展中的不同点, 用临床疾病活动指数(clinical activity index, CAI)、内镜下的疾病活动指数(endoscope activity index, EAI)和组织病理学积分及EG计数反应UC处于在治疗中好转这一动态病程中的一点, 再分析EG浸润数量与其组织病理学的关系, 以期发现EG在UC中的临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-11/2008-12就诊于湘雅二医院消化内科, 确诊为急性溃疡性结肠炎患者45例, 其中男26例, 女29例, 年龄18-53(平均34)岁. 病例诊断参照2000年成都会议制定的溃疡性结肠炎的诊断标准^[13]. 外周血EG计数正常. 近1 mo来未使用过抗生素、激素及免疫抑制剂且未饮酒者入选.

1.2 方法

1.2.1 分组: 根据2000年成都会议制定的对炎症性肠病诊断治疗规范的建议^[13], 将入选患者分为: 活动组, 确诊的活动期患者, 共45例; 好转组, 在治疗6 wk到最后1 d, 经DAI、EAI及组织病理学评分, 完全缓解和部分缓解的患者, 定义为好转组, 共39例.

1.2.2 治疗及组织病理学分析: 所有入选患者连续服用美沙拉嗪(艾迪莎)1 g qid治疗6 wk, 在治疗前和治疗6 wk最后1 d进行临床疾病活动评价和结肠镜检查并做活检组织病理学分析. 以CAI评价患者的临床疾病活动程度^[14], EAI评价患者的肠镜下疾病活动程度^[14]. 每个切片随机选取至少5个高倍视野(400倍)进行计分, 取平均值作为结肠病理学积分^[15]. 组织病理学特征包括: 黏膜上皮细胞间炎症细胞浸润: 中性粒细胞浸润, 淋巴组织增生, 淋巴滤泡形成, EG浸润, 浆细胞浸润; 固有层小血管病变: 小血管炎, 血管壁纤维素样坏死, 血栓形成, 灶性出血; 腺体病变: 腺体异常, 上皮再生, 上皮不典型增生, 杯状细胞消失, 潘氏细胞化生; 间质改变: 肉芽组织增生, 纤维组织增生, 假息肉; 隐窝脓肿. 每个切片随机选取至少5个高倍视野(400倍)进行EG计数和杯状细胞计数, 取平均值.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 细菌浓度数据转换为对数值, 表达为mean \pm SD. 计量资料比较用配对样本 t 检验和方差检验, 计数资料比较用卡方检验, 相关性研究用两样本相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

■ 研究前沿

溃疡性结肠炎病因学发展的欠缺成为制约溃疡性结肠炎治疗的瓶颈. 因此, 对其发病原因的探索成为医学领域长期关注的重点.

■相关报道

有研究发现EG受多种细胞因子的趋化,其中主要受Th2型免疫细胞分泌的IL-5, IL-3, IL-4, GM-CSF以及eotaxin的趋化,同时也受IL-8的趋化,使其在炎症部位聚集和活化。

表 1 CAI, EAI, 组织病理学积分及EG计数的比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	CAI	EAI	组织病理学积分	中性粒细胞计数	EG计数
活动组	45	6.68 \pm 3.02	8.73 \pm 1.76	2.94 \pm 0.86	38.06 \pm 21.69	52.19 \pm 21.45
好转组	39	2.00 \pm 1.48 ^b	5.32 \pm 2.22 ^b	1.76 \pm 0.90 ^b	15.20 \pm 14.91 ^b	14.13 \pm 6.93 ^b

^b*P* < 0.01 vs 活动组。

表 2 组织病理学指标出现率 *n*(%)

分组	活动组	好转组
中性粒细胞浸润	45(100.00)	36(92.31)
淋巴组织增生	42(93.33)	30(76.92) ^a
淋巴滤泡形成	31(68.89)	18(46.15) ^a
EG浸润	40(88.89)	24(61.54) ^a
浆细胞浸润	42(93.33)	30(76.92) ^a
小血管炎	14(31.11)	10(25.64) ^a
血管壁纤维素样坏死	1(2.22)	0(0.00) ^a
血栓形成	0(0.00)	0(0.00) ^a
灶性出血	4(8.89)	2(5.13) ^a
腺体异常	33(73.33)	19(48.72) ^a
上皮再生	9(20.00)	3(7.69) ^a
上皮不典型增生	9(20.00)	3(7.69) ^a
杯状细胞消失	14(31.11)	7(17.95) ^a
潘氏细胞化生	0(0.00)	0(0.00)
肉芽组织增生	2(4.44)	2(5.13)
纤维组织增生	8(17.78)	11(28.21)
假息肉	3(6.67)	3(7.69)
隐窝脓肿	20(44.44)	7(17.95) ^a

^a*P* < 0.05 vs 活动组。

2 结果

2.1 CAI、EAI、组织病理学积分、中性粒细胞计数及EG计数的比较 CAI, EAI, 组织病理学评分和中性粒细胞计数、EG计数在活动与好转组之间存在显著统计学差异(*P* < 0.01)。他们在评价溃疡性结肠炎的活动程度上具有高度的一致性(表1)。

2.2 组织病理学特征 在溃疡性结肠炎的活动期和好转期,其结肠黏膜组织中的炎症细胞浸润都以中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞以及EG为主,2组都存在90%以上中性粒细胞浸润,在活动组达100%,淋巴组织增生在活动组达到93.33%,好转组的淋巴滤泡形成率低于活动组,浆细胞浸润好转组明显少于活动组,EG的浸润率在60%以上,好转组明显低于活动组。在固有层小血管病变中,除所检标本各视野中未见血栓形成(0例,0%)外,小血管炎、血管壁纤维素样坏死和灶性出血均为活动组多于好转组。腺体病

表 3 EG计数与CAI、EAI及组织病理学积分的相关性

	活动组		好转组	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
CAI积分	0.013	0.938	0.137	0.447
EAI积分	-0.125	0.429	0.290	0.101
组织病理学积分	-1.590	0.314	0.194	0.280
中性粒细胞计数	0.018	0.897	0.568	0.001*

变中,除外所检标本各视野中均未见潘氏细胞化生(0例,0%),其余腺体异常及杯状细胞消失,上皮再生或不典型增生,均为活动组多于好转组,说明活动组腺体病变较好转组严重。间质改变中,肉芽组织增生、纤维组织增生及假息肉形成均以好转组稍多,但无统计学意义。隐窝脓肿的出现以活动组为多,且明显多于好转组,其差异具有统计学意义(表2)。

2.3 EG与UC各项积分的相关性分析 在活动组,EG计数与各项积分及中性粒细胞、杯状细胞计数的相关性不明显,但在好转组,EG计数与中性粒细胞计数存在正相关,与杯状细胞计数负相关(表3)。

2.4 EG浸润与组织病理学特征的相关性分析 活动期患者中,EG浸润的出现与淋巴组织增生、淋巴滤泡形成具有明显正相关(*r* = 0.755, *P* < 0.01; *r* = 0.524, *P* < 0.01),与灶性出血呈明显负相关(*r* = -0.385, *P* = 0.010),而与其他组织病理学特征之间无明显相关关系。在好转期患者中,仅有杯状细胞消失与EG浸润呈正相关(*r* = 0.349, *P* = 0.046),而其余各项组织病理学特征均无明显统计学相关性(表4)。

3 讨论

特征性的病理组织学改变,不仅是疾病诊断的重要依据,也是对疾病鉴别,活动性,严重程度及预后判断的良好指标。然而,一种病因可引起多种病理学损伤,多种病因也可以引起相同的病理学损伤。有些疾病是由多因素共同作用的结果,甚至有的疾病病因和发生机制不够明确,

表 4 EG浸润与其他组织病理学指标的相关性分析

	活动组		好转组	
	r值	P值	r值	P值
淋巴组织增生	0.755	0.000 ^b	0.146	0.410
淋巴滤泡形成	0.524	0.000 ^b	-0.218	0.215
浆细胞浸润	0.187	0.224	0.101	0.572
小血管炎	-0.063	0.685	0.280	0.109
血管壁纤维素样坏死	0.055	0.725	0.000	0.000
血栓形成	0.000	0.000	0.000	0.000
灶性出血	-0.385	0.010 ^b	0.045	0.801
腺体异常	0.102	0.509	0.249	0.156
上皮再生	0.182	0.238	0.158	0.371
上皮不典型增生	0.182	0.238	0.158	0.371
杯状细胞消失	0.148	0.339	0.349	0.046 ^a
潘氏细胞化生	0.000	0.000	0.000	0.000
肉芽组织增生	-0.266	0.081	0.089	0.618
纤维组织增生	-0.017	0.913	0.197	0.265
假息肉	0.097	0.532	-0.098	0.581
隐窝脓肿	0.183	0.234	0.079	0.655

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 活动组.

使其病理学损害复杂化. UC是一种病因和发病机制不明确疾病, 尽管其病理学损伤有其特异性, 这种特异性甚至在疾病的不同阶段千差万别, 一直困扰着临床及病理学医师, 也使UC的病理学诊断提供不了“金标准”, 大部分是综合临床、内镜下表现及排除其他疾病的综合诊断方法^[16]. 在疾病活动性判断和预后评价方面遇到同样问题.

本研究结果表明, EG在以CAI、EAI积分定义为活动性UC患者中明显增高, 在其定义为好转的患者中黏膜中EG数量减少, 而在病理组织学积分中也有类似的结果. 但与杯状细胞数量恰好相反, 杯状细胞消失的患者EG数量明显增多. CAI和EAI以及组织病理学积分是目前临床上UC诊断, 活动期判断和用于UC治疗研究的国际通用标准, EG在结肠黏膜中的数量变化与其同步发展. 给UC的组织学诊断提供了又一指标. 该指标简便易行, 在同一HE染色的病理切片中计数. 另外, 也解决了一个困扰, 因为, 在常规UC病理学诊断时, 发现有的组织中有大量EG细胞的存在, 而有的组织中EG很少的现象.

杯状细胞是结肠黏膜中的主要细胞之一, 也是构成结肠黏膜屏障的主要成分, 更是结肠黏液产生的场所, 是黏蛋白产生的主要细胞. 结肠黏液屏障的主要成分是黏蛋白. 换言之, 结肠黏膜中的杯状细胞是构成结肠黏膜和黏液双重

屏障的重要因素, 对结肠黏膜的保护起重要作用. UC患者存在杯状细胞消失, 由于杯状细胞数量是通过染色其胞内黏液成分实验来反映, UC活动期杯状细胞的减少是其死亡还是胞内黏液排出后合成障碍, 有待进一步研究. 有趣的是, 本研究发现EG浸润与杯状细胞消失存在负相关关系, 两者是否存在相互作用, 还是在UC发生机制中的一种结果, 尚有待实验研究证实.

EG在活动期UC黏膜中增多, 随着CAI、EAI及组织病理学积分的下降而减少的结果. 提示EG可能参与UC黏膜组织学损伤, 另外也可作为临床疾病诊断和疾病活动性及好转的判断指示. 在消化系EG与疾病关系的研究中尚有诸多矛盾的现象, 如胃溃疡患者, 胃黏膜的溃疡中央区EG很少, 而边缘区EG增多. 研究者解释为EG参与了溃疡的修复. 深究其试验方法发现所建的溃疡模型为乙酸损伤模型, 溃疡中央应为化学损伤, 黏膜层已破坏. 黏膜反应明显的是边缘组织, 因此难以定义为EG的功能在于组织损伤的修复. 同时也有研究发现EG的浸润与其黏膜慢性炎症, 炎症的活动有明显关系, 也与我们的结果类似. 说明EG可能参与结肠黏膜的炎症损伤, 是主动参与还是继发性改变有待更多实验证实. 因为, 现有研究发现EG受多种细胞因子的趋化, 尽管主要受Th2型免疫细胞分泌的IL-5, IL-3, IL-4, GM-CSF以及eotaxin的趋化, 同时也受IL-8的趋化, 使其在炎症部位聚集和活化. 活化的EG通过其自身分泌作用而行使其功能. EG主要分泌ECP、EPO和EDN引起组织损伤, 同时也分泌大量的细胞因子, 趋化因子和生长因子, 促使炎症的放大过程^[17-20]. 从其分泌的细胞因子和主要颗粒成分中, 不难发现EG参与了黏膜炎症的启动、放大、效应和修复多个环节. 本研究结果显示的仅仅是UC结肠黏膜中EG的数量变化, 有一定的临床意义和指导进一步研究的价值. EG主要起到效应作用还是起始放大作用需要更多实验研究支持.

为了提高EG参与炎症及与疾病关系更深层的机制, 本试验深入分析了UC结肠黏膜组织具有一定特征性改变的结构成分与EG的关系. 活动期UC患者结肠黏膜的组织学特征以中性粒细胞浸润、淋巴细胞浸润、淋巴滤泡形成, 浆细胞和EG浸润以及腺体异常为主要特征. 其次为小血管炎, 杯状细胞消失, 隐窝脓肿, 纤维组织增生. 好转期患者除纤维组织增生外, 其余主要特征均有明显减轻. 在其与EG相关性分析中发

■应用要点

本研究提示, EG在疾病诊断及活动性判断是有一定意义的. 由于其功能的多样性和UC发生机制的复杂性, EG在UC疾病中的作用地位仍有待进一步研究确定.

■同行评价

本文研究了嗜酸性粒细胞在溃疡性结肠炎患者中的临床和病理学意义,认为其对溃疡性结肠炎诊断及活动性判断有一定意义,有较好的研究价值。

现,活动期UC患者黏膜组织中EG与淋巴组织增生及滤泡形成是正相关而与组织中灶性出血呈负相关,提示EG与免疫相关的淋巴细胞有一定关系。因为淋巴细胞分泌趋化因子与EG浸润有关,而EG并不是主要分泌淋巴细胞趋化因子的细胞。这一现象说明EG可能参与炎症放大,可能不是UC黏膜炎症损伤的起始细胞。从与灶性出血呈负相关的事实中,提示EG并不参与炎症部分的血管性损伤。而在好转及缓解期患者中EG仅与杯状细胞消失呈负相关性,而与其他成分无明显相关,是否能提示杯状细胞数量减少,黏膜的黏液层不完整有些抗原物质甚至过敏原性物质,可能诱发EG浸润。因为长期认为EG在黏膜过敏时浸润明显。从上述EG的相关性研究提示,EG可能以免疫细胞功能的身份参与UC黏膜损伤。除黏膜屏障不完整引起的黏膜过敏外,可能还有其他机制参与UC的黏膜炎症过程。

尽管EG与CAI、EAI和组织学评分在UC黏膜炎症过程中具有同步的表现,这些积分增加时EG浸润增多,表面上看EG是UC黏膜损伤及由此而产生一系列表现的主要成分。通过相关性分析发现,EG与CAI、EAI及组织病理学评分中的任一积分无明显相关关系,提示EG参与UC黏膜的组织学损伤的炎症过程,但不起主导作用,另一方面需要增加病例数,精确定量EG细胞数,从而建立其与UC的数量关系。

总之,EG在疾病诊断及活动性判断是有一定意义的。由于其功能的多样性和UC发生机制的复杂性,EG在UC疾病中的作用地位仍有待进一步研究确定。

4 参考文献

- Seeger D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48: 326-332
- Haas SL, Abbatista M, Brade J, Singer MV, Bocker U. Interleukin-18 serum levels in inflammatory bowel diseases: correlation with disease activity and inflammatory markers. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 140-145
- Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1016-1023
- Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P, Taha Y, Thorn M, Loof L, Raab Y, Venge P. IL-5 and TNF- α participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2004-2009
- Levine AD, Fiocchi C. Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16: 306-309
- Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* 2007; 56: 293-303
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 100-113
- Lampinen M, Ronnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Safsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54: 1714-1720
- Al-Haddad S, Riddell RH. The role of eosinophils in inflammatory bowel disease. *Gut* 2005; 54: 1674-1675
- Pensabene L, Brundler MA, Bank JM, Di Lorenzo C. Evaluation of mucosal eosinophils in the pediatric colon. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 221-229
- Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 2004; 172: 5664-5675
- Liacouras CA, Bonis P, Putnam PE, Straumann A, Ruchelli E, Gupta SK, Lee JJ, Hogan SP, Wershil BK, Rothenberg ME, Ackerman SJ, Gomes I, Murch S, Mishra A, Furuta GT. Summary of the First International Gastrointestinal Eosinophil Research Symposium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 370-391
- 欧阳钦, 潘国宗, 温忠慧, 万学红, 胡仁伟, 林三仁, 胡品津. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- Zahn A, Hinz U, Karner M, Eehalt R, Stremmel W. Health-related quality of life correlates with clinical and endoscopic activity indexes but not with demographic features in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1058-1067
- Chen Y, Si JM, Liu WL, Cai JT, Du Q, Wang LJ, Gao M. Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 632-637
- Umeshara Y, Kudo M, Kawasaki M. Endoscopic findings can predict the efficacy of leukocytapheresis for steroid-naive patients with moderately active ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5316-5321
- Kristjansson G, Venge P, Wanders A, Loof L, Hallgren R. Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; 53: 1806-1812
- Carvalho AT, Elia CC, de Souza HS, Elias PR, Pontes EL, Lukashok HP, de Freitas FC, Lapa e Silva JR. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 120-125
- Lampinen M, Backman M, Winqvist O, Rorsman F, Ronnblom A, Sangfelt P, Carlson M. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1392-1399
- Hogan SP, Foster PS, Rothenberg ME. Experimental analysis of eosinophil-associated gastrointestinal diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 239-248

肠易激综合征患者肠黏膜SP、SPR和5-HT的变化

夏 頔, 刘希双, 鞠 辉

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

作者贡献分布: 夏 頔、鞠辉及刘希双对此文所作贡献均等; 此课题由夏 頔、鞠辉及刘希双设计; 研究过程由夏 頔操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由鞠辉提供; 数据分析由夏 頔与刘希双完成; 本论文写作由夏 頔、鞠辉及刘希双完成。

通讯作者: 刘希双, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科. liuxishuang1@sina.com
电话: 0532-82911525

收稿日期: 2009-09-04 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Changes in substance P, substance P receptor and 5-hydroxytryptamine expression in the ileocecal mucosa in patients with irritable bowel syndrome

Di Xia, Xi-Shuang Liu, Hui Ju

Di Xia, Xi-Shuang Liu, Hui Ju, Department of Endoscopy, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopy, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266000, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2009-09-04 Revised: 2009-09-29

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the changes in substance P (SP), substance P receptor (SPR) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) expression in the ileocecal mucosa in patients with irritable bowel syndrome (IBS) and elucidate their possible roles in the development of IBS.

METHODS: The expression of SP and SPR in the ileocecal mucosa was detected by immunohistochemistry using the Envision system. The expression of 5-HT was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method. The staining results were analyzed qualitatively and quantitatively using a color image analyzer.

RESULTS: The positive intensity and area of SP staining in the ileocecal mucosa were significantly

higher in IBS patients than in normal controls ($F = 6.463$, $P < 0.05$). Especially, the positive intensity and area of SP staining in the ileocecal mucosa were greater in IBS-D and IBS-C patients than in control individuals ($Q = 4.231$ and 3.463 , respectively; both $P < 0.01$). The number of SPR- and 5-HT-positive cells in the ileocecal mucosa were significantly higher in patients with IBS than in control individuals ($P < 0.05$). SPR expression was closely correlated with 5-HT expression in the ileocecal mucosa of IBS patients ($r = 0.1579$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: 5-HT, SP and SPR may play a central role in the gut hypersensitivity in both motor response and visceral perception in IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Substance P; Substance P receptor; 5-hydroxytryptamine

Xia D, Liu XS, Ju H. Changes in substance P, substance P receptor and 5-hydroxytryptamine expression in the ileocecal mucosa in patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3169-3173

摘要

目的: 观察肠易激综合征(IBS)患者回盲部肠黏膜P物质(SP)、P物质受体(SPR)及5-羟色胺(5-HT)的改变及其相互关系, 探讨其在IBS病理、生理机制中可能的作用与临床意义。

方法: 采用EnVision免疫组织化学染色法对IBD患者回盲部黏膜组织切片的SP与SPR进行染色, 5-HT用SP免疫组织化学染色法, 用彩色病理图像分析软件及免疫组织化学分析软件进行分析。

结果: 与对照组比较IBS组SP的阳性强度均值、阳性面积均显著增大, 差别有统计学意义($F = 6.463$, $P < 0.05$), 其中IBS-D和IBS-C与对照组比较差别有高度统计学意义($Q = 4.231$ 、 3.463 , 均 $P < 0.01$); IBS组和对照组相比, 回盲部黏膜SPR、5-HT阳性细胞明显增多(均 $P < 0.05$), 且SPR和5-HT密切相关($r = 0.1579$, $P < 0.05$)。

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是一种原因不明的以腹痛或腹部不适及大便习惯改变为主要特征的慢性功能性肠道疾病, 占消化内科门诊总人数的30%左右。神经-免疫-内分泌网络机制是新近提出的IBS发生机制观点。

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

■创新盘点

本研究系统分析了SP、肥大细胞和5-HT在IBS患者中的表达,为IBS发生机制提供了理论依据。

结论: SP、SPR及5-HT相互作用在IBS内脏高敏感的病理生理过程中可能具有重要的作用。

关键词: 肠易激综合征; P物质; P物质受体; 5-羟色胺

夏岷, 刘希双, 鞠辉. 肠易激综合征患者肠黏膜SP、SPR和5-HT的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3169-3173
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3169.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的胃肠道功能紊乱性疾病,是一类具有特殊病理生理基础的身心疾病,是以不明原因的腹痛或腹部不适及大便习惯改变为主要特征的慢性功能性肠道疾病. 神经-免疫-内分泌网络机制是新近提出的观点,在IBS的发生机制中,P物质(substance P, SP)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-HT)是神经、内分泌机制中分别具有代表性的因子,二者分别属于2种不同的神经递质. 有研究报道他们在IBS发病过程中起一定的作用,但是SP、5-HT和P物质受体(substance P receptor, SPR)三者之间的关系,即三者在IBS中的相关性目前尚未阐明. 本研究通过免疫组织化学试验,探讨三者在IBS中的相关性以及对IBS的影响,旨在进一步了解神经-免疫-内分泌机制在IBS发生机制中的作用,为IBS的综合治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-10/2008-05青岛大学医学院附属医院消化内科门诊随机选取IBS患者110例. 其中男48例,女62例,年龄14-74(平均45.3)岁. 诊断参照新近颁布的罗马III诊断标准^[1],罗马III诊断标准根据粪便性状将IBS分为便秘型IBS(IBM-C)、腹泻型IBS(IBM-D)、混合型IBS(IBM-M)和未分型IBS(IBM-U)4种亚型. 其中IBM-D 32例,IBM-C 30例,IBM-M 20例,IBM-U 28例. 对照组30例,为结肠息肉电切术后复查者,男12例,女18例,年龄18-72(平均43)岁,无消化系和神经系统症状和体征,无免疫疾病史、感染病史,无近期服药史. 以上受检者,每例在回盲部取2块黏膜活检标本,用10%甲醛固定备用. 兔抗人5-HT多克隆抗体(中杉金桥生物技术有限公司提供ZA-0231),SPR兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司提供),抗人P物质多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司

提供ZA-0235).

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 取回盲部黏膜2块,10%甲醛固定,石蜡包埋,所有蜡块均行2-3 μm 连续切片,每例各取1张切片HE染色,进行常规病理组织学诊断. SP和SPR采用EnVision免疫组织化学染色法: 2-3 μm 厚的石蜡切片,58℃电热恒温干燥箱过夜,脱蜡至水,梯度乙醇水洗. 3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶,室温置10 min, PBS冲洗. 高压锅120℃修复4 min, PBS冲洗. 滴加一抗(一抗浓度为1:100)37℃水浴2 h, PBS冲洗. 滴加生物素化二抗,37℃水浴1 h, PBS冲洗,室温下DAB显色3-10 min. 水洗,苏木精复染,明胶封片. 5-HT采用SP免疫组织化学染色法,不需要进行抗原修复,其余过程同上。

1.2.2 结果判断: (1)SP应用免疫组织化学分析软件进行分析,染色结果应用计算机病例图像分析系统,对切片中各抗体呈阳性反应的面积、不脱光率密度进行半定量分析,分析SP免疫反应阳性纤维的阳性强度、阳性面积[SP、免疫反应阳性纤维的强度、面积为分析软件的相对值,分析软件高倍视野($\times 400$)下总的视野面积为260100]^[2]. (2)SPR和5-HT阳性细胞采用粗略记分法,染色阳性结果均为细胞内含有棕褐色颗粒,每张切片计数5个高倍视野($\times 400$)中的阳性细胞. 计算每个高倍视野中SPR和5-HT阳性细胞数的均值。

统计学处理 实验数据采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理,采用方差分析,细胞数以每高倍视野的mean \pm SD表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义;两变量间关系运用直线相关分析。

2 结果

2.1 结肠黏膜形态学观察 电子结肠镜下观察110例IBS组与对照组的结肠黏膜均无充血、水肿和渗出等炎症改变. 肠道黏膜组织经HE染色,显微镜下观察见黏膜上皮完整,黏膜下及固有腺体之间可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润,个别可见少量中性粒细胞浸润,各组间及与对照组相比,差异无显著性。

2.2 免疫组织化学染色光镜下观察

2.2.1 IBS组及对照组中5-HT的表达: 5-HT阳性细胞分布于肠黏膜上皮基部及腺泡上皮细胞之间,免疫反应阳性细胞的胞质被染成黄褐色或褐色,细胞核无色或为浅黄色,细胞多为圆形、

表 1 IBS患者肠黏膜5-HT和SPR阳性细胞统计结果 (mean \pm SD)

	IBS-D	IBS-C	IBS-M	IBS-U	对照组
5-HT	35.12 \pm 1.02 ^b	29.01 \pm 1.21 ^b	27.02 \pm 1.01	20.12 \pm 1.43	15.04 \pm 1.42
SPR	6.32 \pm 1.12 ^b	5.61 \pm 1.04 ^b	4.71 \pm 1.21	4.61 \pm 0.25	3.23 \pm 1.32

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

椭圆形、梭形和不规则形. IBS组中IBS-U、IBS-M、IBS-C和IBS-D回盲部肠黏膜5-HT表达呈逐渐升高趋势, IBS组回盲部肠黏膜5-HT免疫反应阳性细胞较对照组明显增多, 差别有统计学意义($F = 12.006$, $P < 0.05$), 其中IBS-D组和IBS-C组患者回盲部肠黏膜5-HT免疫反应阳性细胞较对照组显著增多, 差别有高度统计学意义($Q_D = 12.980$, $Q_C = 10.142$, $P < 0.01$), IBS-D与IBS-C阳性表达比较差别无统计学意义($Q_{DC} = 2.823$, $P > 0.05$). IBS-M和IBS-U与对照组比较阳性表达增多, 但差别无统计学意义($Q_M = 3.210$, $Q_U = 2.745$, $P > 0.05$), IBS-M和IBS-U与IBS-D及IBS-C比较差别无统计学意义($Q_{MD} = 2.341$, $Q_{MC} = 2.173$, $Q_{UD} = 3.219$, $Q_{UC} = 2.215$, $P > 0.05$, 表1).

2.2.2 IBS组及对照组中SPR的表达: SPR免疫反应阳性细胞分布于肠黏膜上皮基部和黏膜固有层, 免疫阳性细胞胞质被染成黄褐色或褐色, 胞核细胞多为圆形、椭圆形、梭形和不规则形. IBS组中IBS-U、IBS-M、IBS-C和IBS-D回盲部SPR表达逐渐升高, 与对照组比较, IBS组回盲部肠黏膜SPR免疫反应阳性细胞增多, 差别有统计学意义($F = 6.050$, $P < 0.05$), 其中IBS-D组和IBS-C组患者回盲部肠黏膜SPR免疫反应阳性细胞较对照组显著增多($Q_D = 6.523$, $Q_C = 4.919$, $P < 0.01$), IBS-D与IBS-C阳性表达比较差别无统计学意义($Q_{DC} = 1.604$, $P > 0.05$). IBS-M和IBS-U与对照组比较差别无统计学意义($Q_U = 2.745$, $Q_M = 3.181$, $P > 0.05$), IBS-M和IBS-U与IBS-D及IBS-C比较差别无统计学意义($Q_{MD} = 3.341$, $Q_{MC} = 1.173$, $Q_{UD} = 3.219$, $Q_{UC} = 2.785$, $P > 0.05$, 表1).

2.3 SP免疫反应阳性纤维的阳性强度和阳性面积 SP免疫反应阳性纤维分布于肠黏膜上皮基部和黏膜固有层, SP染色呈较强的棕黄色反应, 或见散在点状、线状结构, 或见簇集分布. IBS组中IBS-U、IBS-M、IBS-C和IBS-D回盲部肠黏膜SP表达呈逐渐升高趋势, IBS组回盲部肠黏膜SP免疫反应阳性纤维增多、增粗, 染色增强, 与对照组比较IBS组SP的阳性强度均值、阳性

表 2 IBS患者肠黏膜SP免疫阳性纤维测定结果 (mean \pm SD)

分组	SP能神经纤维强度	SP能神经纤维面积
对照组	6.39 \pm 0.70	2091.44 \pm 536.66
IBS-D	7.49 \pm 1.14 ^b	2843.25 \pm 511.32 ^b
IBS-C	7.29 \pm 1.03 ^b	2820.97 \pm 509.39 ^b
IBS-M	7.19 \pm 1.25	2818.56 \pm 507.32
IBS-U	7.13 \pm 1.32	2802.74 \pm 503.42

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

面积均显著增大, 差别有统计学意义($F = 6.463$, $P < 0.05$), 其中IBS-D和IBS-C与对照组比较差别有高度统计学意义($Q = 4.231$, 3.463 , 均 $P < 0.01$), IBS-D与IBS-C相比较差别无统计学意义($Q = 0.769$, $P > 0.05$), IBS-M和IBS-U与对照组比较差别无统计学意义($Q = 2.253$, 1.873 , 均 $P > 0.05$), IBS-M和IBS-U分别与IBS-D及IBS-C比较, 差别无统计学意义($Q = 1.154$, 0.769 , 1.385 , 0.615 , 均 $P > 0.05$, 表2).

2.4 IBS患者回盲部SPR和5-HT阳性细胞的相关性 在SPR、5-HT阳性结果中, 分别任取15组高倍视野下阳性细胞个数做两者的直线相关性分析($r = 0.1579$, $P < 0.05$), 结果显示二者密切相关(表3).

3 讨论

IBS的病因和发病机制尚不完全清楚, 神经-免疫-内分泌网络机制是新近提出的观点. 有研究认为SP、SPR以及5-HT参与IBS的发病过程^[3].

SP是最早发现的一种神经肽, 由11个氨基酸构成, 广泛分布于哺乳动物中枢和周围神经系统以及外周组织中, 以胃肠道和中枢神经系统含量最高, 是一种主要的促炎症性感觉性神经肽^[4]. SP与神经激肽-1受体(neurokinin-1 receptor, NK-1R)、NK-2R和NK-3R结合以发挥作用. 其中以NK-1R的亲合力最大, NK-1R又被特称为SPR. SPR是鸟嘌呤核苷酸结合蛋白偶联受体超家族成员之一, 含有7个跨膜区, 通过G蛋白与细胞效应系统相互作用. 本实验中, IBS组回盲部肠黏膜中SP和SPR阳性表达较对照组

■应用要点

本研究证实, SP、SPR及5-HT相互作用在IBS内脏高敏感的病理生理过程中具有重要的作用, 为深入探讨IBS的发生机制提供理论和实验基础, 可能为今后治疗IBS提供新的途径和方法.

■同行评价

本研究为探讨IBS发病机制以及肠黏膜组织内神经免疫调节提供了重要理论依据,具有一定的应用价值.

表 3 IBS患者回盲部SPR和5-HT的直线相关性分析

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5-HT(x)	35	34	34	38	32	41	38	27	47	40	31	39	36	35	28
SPR(y)	16	17	15	18	14	23	17	18	27	22	19	17	18	17	25

明显增多($P<0.05$),提示SP和SPR在IBS发病机制中起重要作用.国外相关研究认为SP能将感觉信息传递给中枢神经系统外,还具有扩张血管、使肥大细胞(mast cell, MC)释放组胺、浆液外渗、影响巨噬细胞和白细胞等外周生理调节作用^[5].SP具有刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质的作用,可以导致血浆外渗、中性粒细胞浸润^[6].Greenwood-Van *et al*^[7]认为SP能激活SPR致使结肠感觉过敏. Baluk *et al*^[8]发现, SP与SPR结合后,导致中性粒细胞聚集,引发各种炎症介质分子的连锁式释放.有研究提示SPR的变化对急性坏死性胰腺炎病情起到重要的作用, Grady *et al*^[9]发现对NK-1受体(+/+)的小鼠注射SP,胰腺内血浆外渗增加2倍,而对于NK-1R(-/-)的小鼠,SP不起作用.由此我们可以推断SPR的变化可能影响着IBS的严重程度,SP、SPR共同影响IBS的发生.

罗马III标准根据粪便性状将IBS分为4型,其中IBS-M和IBS-U粪便性状介于IBS-C和IBS-D.根据试验结果,IBS-C和IBS-D肠黏膜SP和SPR表达较对照组显著增多($P<0.01$),IBS-M和IBS-U患者回盲部肠黏膜SP合SPR较对照组增多,但没有统计学意义,提示SP及SPR的增多可能导致IBS症状改变显著,这也可以解释IBS-M和IBS-U较对照组有粪便性状的改变,但是没有IBS-C或IBS-D明显.我们认为IBS-D患者回盲部肠黏膜SP和SPR含量升高,这可能与IBS-D患者结肠高动力,黏液分泌增多而致腹泻有关. IBS-C患者回盲部肠黏膜SP含量亦显著高于对照组,但其机制尚不明确.有研究发现,慢性胰腺炎中SP的过度表达与胰腺组织中的神经纤维增粗有关,并指出SP可能参与疼痛的发生^[10].结合目前较为肯定的IBS的病理生理改变,包括肠道动力紊乱、内脏敏感性增加、胃肠激素水平异常等,我们推测IBS-C肠黏膜SP增高可能是由于SP增多导致内脏高敏感性,引起肠道痉挛,而部分肠段的痉挛造成肠道通过时间的延长所致^[11].故可见SP及SPR在IBS的发病中起着重要的作用,且肠黏膜SPR表达增多与SP的作用密切相关.结肠黏膜中SP与SPR的变化对IBS

的严重程度的影响还需进一步研究证实.

5-HT是一种广泛存在与中枢神经系统和胃肠道的神经递质,具有多种生物学功能.既可由内分泌细胞分泌,又可由免疫细胞MC分泌,其对动物消化系的运动、腺体的分泌和血管的收缩具有重要的调节功能.本试验结果显示在IBS-D及IBS-C患者回盲部黏膜内观察到5-HT的表达显著高于对照组,IBS-D略高于IBS-C(但无统计学意义),我们认为5-HT改变可能与肠道动力改变、内脏高敏感性及分泌异常有关.5-HT免疫反应阳性细胞分布于肠黏膜上皮基部、腺泡之间及腺泡上皮细胞之间.5-HT信号的改变可以直接导致IBS肠内和肠外症状^[12].De Ponti *et al*^[13]发现5-HT可促进胃肠道运动,使移行性复合运动(MMC)出现次数增多,并可导致内脏痛觉过敏. Nishiyama *et al*^[14]发现肠道高敏感性以及动力紊乱等因素的影响造成对EC的刺激增加,使其释放过量的5-HT,造成肠道功能紊乱. Spiller *et al*^[15]报道感染后IBS患者直肠黏膜的淋巴细胞和内分泌细胞(主要是肠嗜铬细胞, EC)明显增多,肠道黏膜的通透性明显增加.也有研究^[16]提出5-HT信号的改变可以引起胃肠道动力改变、内脏高敏感性及分泌异常,并有证据开始将其信号的紊乱与IBS及慢传输便秘联系起来,但确切的机制仍需进一步研究.这些研究也证实了5-HT可能在IBS的发病中其重要作用,并且影响SP和SPR在IBS的发病中起协同作用.

根据试验结果,我们发现SPR与5-HT之间存在相关性,也有实验证明在IBS患者结肠黏膜内,SP对EC刺激后,使其释放过量的5-HT,造成肠道功能紊乱. Dong *et al*^[17]报道SP与平滑肌上SPR结合后可激活胆碱能神经元及5-HT神经元,使结肠推进运动增强、排便次数增加. IBS患者结肠黏膜内的EC数目增多,为内分泌系统参与IBS的发病机制提供了直接的证据,可能也是IBS患者内分泌网络调控失常的重要环节.5-HT受体亚型可能通过调节SP、谷氨酸以及甘氨酸,在初级传人终末及外周神经末梢的释放发挥其感觉信息的调节作用.有实验显示5-HT可能是通过旁分泌的方式作用于的Pre-Bötzing复合体

(pre-bötzing complex, PBC)神经元, 间接作用与SPR阳性神经元胞体上的受体^[18]。根据实验结果及以往文献报道, 我们认为SP、SPR和5-HT共同作用, 在IBS的发病机制中起重要作用。

目前, 随着对IBS病理生理机制的深入研究, 神经免疫联系已逐渐被人们所接受, 并已在不同部位的MC胞质内分别发现SP等肽类物质, 且MC表面存在SP等神经肽的受体^[19-20], SP对MC活性具有反向调节作用, 有研究显示^[10]IBS患者MC周围SP免疫反应阳性纤维表达增强, SP免疫反应阳性纤维周围MC簇集出现或沿神经走行分布, 肠黏膜石蜡切片染色结果部分MC呈SPR阳性; 将部分免疫组织化学阳性的切片利用原位包埋法移至透射电镜下观察, 可发现部分毗邻的MC与神经肽免疫反应阳性纤维存在“膜膜”接触。

SP、MC和5-HT是神经、免疫、内分泌机制中分别具有代表性的表达因子, 结合我们的研究以及以往的文献报道, 可以推断神经-免疫-内分泌网络机制可能是导致IBS发病的主要机制, SP、SPR以及5-HT相互联系和相互作用, 在IBS的发病机制中起重要作用。深入细致地研究IBS的分子生物学改变, 将为临床治疗提供崭新的途径。已有研究表明, NK-1R特异性拮抗剂对急性胰腺炎的动物模型具有治疗作用^[11], 该拮抗剂对IBS是否具有治疗作用值得进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466-1479
- 2 董文珠, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 满晓华. 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
- 3 Houghton LA, Atkinson W, Lockhart C, Whorwell PJ, Keevil B. Sigmoid-colonic motility in health and irritable bowel syndrome: a role for 5-hydroxytryptamine. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 724-731
- 4 Horie M, Miyashita T, Watabe K, Takeda Y, Kawamura K, Kawano H. Immunohistochemical localization of substance P receptors in the midline glia of the developing rat medulla oblongata with special reference to the formation of raphe nuclei. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 121: 197-207
- 5 Yokota Y, Sasai Y, Tanaka K, Fujiwara T, Tsuchida K, Shigemoto R, Kakizuka A, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 17649-17652
- 6 石欣, 高乃荣, 霍明东, 胡浩霖, Friess Helmut, Buchler Markus. P物质及其受体在慢性胰腺炎组织的表达和临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 172-176
- 7 Greenwood-Van Meerveld B, Gibson MS, Johnson AC, Venkova K, Sutkowski-Markmann D. NK1 receptor-mediated mechanisms regulate colonic hypersensitivity in the guinea pig. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74: 1005-1013
- 8 Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald DM, Nadel JA. NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am J Physiol* 1995; 268: L263-L269
- 9 Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard C, Gerard N, Bunnett NW, Kirkwood KS. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 505-512
- 10 Büchler M, Weihe E, Friess H, Malfertheiner P, Bockman E, Müller S, Nohr D, Beger HG. Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis. *Pancreas* 1992; 7: 183-192
- 11 詹丽杏, 邹多武, 许国铭, 李兆申, 尹宁, 张梅琴. 功能性便秘和便秘型肠易激综合征的结肠结肠运输试验及直肠感觉阈值的比较. *中华消化杂志* 2002; 22: 19-21
- 12 Crowell MD. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1285-1293
- 13 De Ponti F, Tonini M. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs* 2001; 61: 317-332
- 14 Nishiyama H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Omagari K, Miyahara Y, Murata I, Kohno S. Chronic visceral hypersensitivity renders defecation more susceptible to stress via a serotonergic pathway in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 763-769
- 15 Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 41-47
- 16 Crowell MD, Shetzline MA, Moses PL, Mawe GM, Talley NJ. Enterochromaffin cells and 5-HT signaling in the pathophysiology of disorders of gastrointestinal function. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 55-60
- 17 Dong WZ, Li ZS, Zou DW, Xu GM, Zou XP, Zhu AY, Yin N, Gong YF. [The changes of mucosal mast cells and substance P in patients with irritable bowel syndrome] *Zhonghua Neike Zazhi* 2003; 42: 611-614
- 18 魏晓燕, 刘津平, 刘莹莹, 鞠躬. 成年大鼠Pre-Bötzing复合体5-羟色胺样阳性神经纤维与神经激肽1受体阳性神经元的关系. *神经解剖学杂志* 2006; 22: 262-266
- 19 Marchand JE, Sant GR, Kream RM. Increased expression of substance P receptor-encoding mRNA in bladder biopsies from patients with interstitial cystitis. *Br J Urol* 1998; 81: 224-228
- 20 Pothoulakis C, Castagliuolo I, Leeman SE, Wang CC, Li H, Hoffman BJ, Mezey E. Substance P receptor expression in intestinal epithelium in clostridium difficile toxin A enteritis in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G68-G75

编辑 李军亮 电编 何基才

骨桥蛋白与缺氧诱导因子-1在大肠腺瘤及癌组织中的表达及意义

袁禧先, 马晓颖, 王凤荣, 王 喆, 王 晓, 王树鸿

■背景资料

大肠癌是位居我国第5位的常见恶性肿瘤。近年来随着国人饮食结构及生活习惯等诸多因素的改变, 大肠癌的发病率呈逐年上升的趋势。早期诊断对大肠癌的预后具有重要的意义, 而预测大肠癌的发展趋势和转移潜能对大肠癌治疗具有指导意义。

袁禧先, 佳木斯大学附属第一医院消化二科 黑龙江省佳木斯市 154003

马晓颖, 王凤荣, 王树鸿, 佳木斯大学临床医学院 黑龙江省佳木斯市 154003

王喆, 日本金泽大学大学院医学系研究科 日本金泽 920-8640
王晓, 佳木斯大学附属第一医院病理科 黑龙江省佳木斯市 154003

作者贡献分布: 此课题由袁禧先设计并指导实验的完成; 研究过程由马晓颖、王凤荣、王喆及王树鸿操作完成; 研究所用病理切片制作与观察由王晓指导完成; 数据分析由王凤荣与王喆完成; 本论文写作由袁禧先与马晓颖完成。

通讯作者: 袁禧先, 主任医师, 教授, 154003, 黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学附属第一医院消化二科. yuanxx8862@163.com
电话: 0454-8606525

收稿日期: 2009-08-05 修回日期: 2009-09-25

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-10-28

Significance of osteopontin and hypoxia-inducible factor- α expression in colorectal carcinoma and adenoma

Xi-Xian Yuan, Xiao-Ying Ma, Feng-Rong Wang, Zhe Wang, Xiao Wang, Shu-Hong Wang

Xi-Xian Yuan, the Second Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China
Xiao-Ying Ma, Feng-Rong Wang, Shu-Hong Wang, Clinical Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China
Zhe Wang, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Japan
Xiao Wang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Xi-Xian Yuan, the Second Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China. yuanxx8862@163.com

Received: 2009-08-05 Revised: 2009-09-25

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-10-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of osteopontin (OPN) and hypoxia-inducible factor- α (HIF-1 α) and analyze their correlation with clinical and pathophysiological parameters in colorectal carcinoma and adenoma.

METHODS: The expression of OPN and HIF-1 α in 50 colorectal carcinoma specimens, 24 colorec-

tal adenoma specimens and 12 normal colorectal tissues were examined by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method.

RESULTS: OPN and HIF-1 α expression was not detected in normal colorectal tissues. In contrast, OPN and HIF-1 α were highly expressed in colorectal carcinoma and adenoma. Although no significant difference was noted in OPN expression level between colorectal adenoma and carcinoma, significant difference was found in HIF-1 α expression level between colorectal adenoma and carcinoma (33.33% vs 62.00%, $P < 0.05$). Both OPN and HIF-1 α expression were positively correlated with lymph node metastasis, depth of tumor invasion and Dukes' stage, but not with patients' gender and age. A significant correlation was noted between the expression of OPN and HIF-1 α in colorectal carcinoma ($r = 0.700$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: OPN and HIF-1 α may play an important role in the invasion and metastasis of colorectal carcinoma. Tumors expressing high level of HIF-1 α have greater invasive and metastatic capacity.

Key Words: Osteopontin; Hypoxia-inducible factor- α ; Colorectal carcinoma; Adenoma; Immunohistochemistry

Yuan XX, Ma XY, Wang FR, Wang Z, Wang X, Wang SH. Significance of osteopontin and hypoxia-inducible factor- α expression in colorectal carcinoma and adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3174-3179

摘要

目的: 探讨骨桥蛋白(OPN)及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在大肠癌、大肠腺瘤及大肠正常组织中的表达程度及其与临床病理学之间的关系。

方法: 采用免疫组织化学SABC法检测50例大肠癌及24例大肠腺瘤、12例正常大肠组织病理标本中OPN及HIF-1 α 的表达。

■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

结果: OPN及HIF-1 α 在正常组织中无表达, 在大肠癌组织、腺瘤组织中为高表达. OPN的表达率在腺瘤组与肠癌组间比较差别无显著性. HIF-1 α 的表达率在腺瘤组与肠癌组间比较, 差别有显著性(33.33% vs 62.00%, $P<0.05$). 二者在肠癌组中的表达与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、Dukes分期呈正相关; 与患者的性别、年龄、肿瘤的大小则无相关性. OPN与HIF-1 α 在大肠癌组织中的表达具有明显的相关性($r=0.700$, $P<0.01$).

结论: OPN及HIF-1 α 在大肠癌的浸润和转移中起重要作用; HIF-1 α 高表达的肿瘤组织具有较强的浸润与转移能力.

关键词: 骨桥蛋白; 缺氧诱导因子-1 α ; 大肠腺瘤; 大肠癌; 免疫组织化学

袁禧先, 马晓颖, 王凤荣, 王喆, 王晓, 王树鸿. 骨桥蛋白与缺氧诱导因子-1在大肠腺瘤及癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3174-3179
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3174.asp>

0 引言

大肠癌是位居我国第5位的常见恶性肿瘤, 且以每年4.2%的增长率递增^[1]. 大肠癌患者虽可经过手术、化疗、放疗及其他综合治疗有一定疗效, 但数据显示, 约有30%的患者仍在5年之内死于复发和远处转移. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是最先从骨基质中分离而得到的一种含有特异的Arg-Gly-Asp(RGD)序列的有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白. 有许多研究已证实OPN作为一种整合素连接蛋白, 在各种恶性肿瘤模型中均呈过度表达, 参与肿瘤增殖和转移. 但另有一些研究表明OPN表达阴性的患者其生存期明显短于OPN表达阳性的患者. 故有人称OPN为“肿瘤转移相关基因”. OPN是一个有争议且与肿瘤有密切关系的因子, 故将其作为本试验研究对象之一, 探讨其与大肠癌发生发展之间的关系. 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor- α , HIF-1 α)是在缺氧诱导的细胞核提取物中发现的一种转录因子, 由 α 和 β 2个亚基组成. 其中HIF-1 α 既是氧调节亚基又是活性亚基, 在缺氧条件下, HIF-1 α 蛋白水平和HIF-1的DNA结合活性增加^[2]. 癌肿微环境缺氧是HIF-1活性的一个重要机制, 缺氧环境下, 活化的HIF-1与靶基因上的结合位点相结合, 形成转录起始复合物从而启动靶基因的转录. HIF-1作为迄今为止发现的唯一的一个特异性缺氧状态下发挥活性的

转录因子, 其在肿瘤恶性转化过程中的作用机制正得到系统深入研究. 缺氧是肿瘤发生发展过程中必然要面临的一种环境压力, 有研究报道, 缺氧可诱导OPN的表达^[3-4]. 而HIF-1 α 是肿瘤细胞在缺氧环境下的中心反应组件, 二者之间可能存在某种调节关系. OPN和HIF-1 α 在大肠癌组织中的表达单独研究较多, 但二者在大肠癌组织中的联合研究尚未见报道. 本研究旨在探讨两者的关系, 为进一步阐明大肠癌的发病机制, 制定合理的治疗策略奠定理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2007-09佳木斯大学附属第一医院手术切除并经病理确诊的大肠癌54例, 符合研究标准的50例, 确诊前均无放疗、化疗史. 其中男28例, 女22例, 年龄40-76(中位年龄58.5)岁; 高中分化腺癌33例, 低分化腺癌17例; 有淋巴结转移21例, 无淋巴结转移29例; 按Dukes分期标准, A期10例, B期13例, C期15例, D期12例. 另取大肠腺瘤标本27例, 正常大肠黏膜组织标本12例.

1.2 方法

1.2.1 标本处理及实验步骤: 石蜡切片, 常规处理, DAB显色, 苏木素轻度复染. 采用免疫组织化学SABC法检测OPN及HIF-1 α 的表达(所需试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司).

1.2.2 阳性结果判定标准: OPN表达结果以细胞质内有棕黄色颗粒为阳性, HIF-1 α 蛋白表达结果以细胞核或胞质内有棕黄色颗粒为阳性. 高倍镜下对每张切片随机选择5个视野, 每个视野计数200个细胞, 共计1000个. OPN阳性细胞数 $<5\%$ 为阴性“-”, $5\%-25\%$ 为弱阳性“+”, $26\%-50\%$ 为中度阳性“++”, $>50\%$ 为强阳性“+++”. HIF-1 α 阳性细胞数 $<1\%$ 为阴性“-”, $1\%-10\%$ 为弱阳性“+”, $11\%-50\%$ 为中度阳性“++”, $>50\%$ 为强阳性“+++”.

统计学处理 所有统计资料应用SPSS15.0软件包进行数据分析, 采用四格表 χ^2 检验和Spearman等级相关分析. 检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 OPN、HIF-1 α 在正常大肠组织、大肠腺瘤组织、大肠癌组织中的表达 OPN与HIF-1 α 在正常组织中没有表达, 在大肠癌组中表达率分别为64.00%(32/50)、62.00%(31/50), 在大肠腺瘤组中表达率分别为66.67%(16/24)、33.33%(8/24). OPN在大肠癌组的表达与大肠腺

■相关报道

Yeatman *et al*综合研究出新的肿瘤标志物, 通过筛选大约12 000个基因, 确定OPN为临床上结肠癌首选的标志物.

■应用要点

本研究结果提示, OPN及HIF-1 α 在大肠癌的浸润和转移中起重要作用, 二者可以作为在大肠癌发生和发展过程中发挥重要功能的分子标志物, 以及可靠、有效的治疗靶标。

表 1 OPN与HIF-1 α 在正常组、大肠腺瘤组、大肠癌组中的表达

分组	n	OPN			HIF-1 α		
		-	+	阳性百分比(%)	-	+	阳性百分比(%)
正常组织	12	12	0	0.00	12	0	0.00
大肠腺瘤组	24	8	16	66.70	16	8	33.33
大肠癌组	50	18	32	64.00	19	31	62.00 ^a

^a $P<0.05$ vs 大肠腺瘤组。

表 2 OPN、HIF-1 α 表达与大肠癌临床病理特征之间的关系

参数	n	OPN			HIF-1 α		
		-	+	P值	-	+	P值
性别							
男	28	15	13	0.945	10	18	0.962
女	22	12	10		8	14	
年龄(岁)							
>58	24	13	11	0.982	9	15	0.944
<58	26	14	12		10	16	
淋巴结转移							
有	21	6	15	0.010	4	17	0.005
无	29	19	10		17	12	
分化程度							
高/中	33	22	11	0.012	17	16	0.136
低	17	5	12		5	12	
Dukes分期							
A+B	23	14	9	0.002	13	10	0.005
C+D	27	5	22		5	22	

瘤组相比较差异无显著性($P>0.05$), HIF-1 α 在大肠癌组的表达与大肠腺瘤组相比较差异有显著性($P<0.05$, 表1)。

2.2 肠癌组中OPN与HIF-1 α 的表达与临床病理特征之间的关系 OPN、HIF-1 α 表达率在淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移($P<0.05$); 在组织学分级中, OPN的表达率在低分化组显著高于高中分化组($P<0.05$), HIF-1 α 的表达率在低分化组高于高中分化组, 但没有统计学意义($P>0.05$); 在Dukes分期中, OPN、HIF-1 α 的表达率在C、D期显著高于A、B期($P<0.05$)。二者的表达与患者的性别、年龄均无相关性($P>0.05$, 表2)。

2.3 OPN与HIF-1 α 在大肠癌组织中的相关性 OPN与HIF-1 α 在大肠癌组织中的表达具有相关性($r = 0.700$, $P<0.01$, 表3)。

3 讨论

OPN最初是从大鼠骨骼组织中分离得到的一种分泌型、黏附型的钙结合磷酸化糖蛋白, 具有

许多功能位点, 是一个多功能蛋白, 具有广泛的生物学功能。包括细胞黏附、迁移、钙代谢、血管重塑、免疫调节等。最先描述OPN和肿瘤的关系追溯到1979年Senger首次把OPN描述具有分泌性转化相关的磷酸化蛋白, 1987年他在蛋白激酶C的控制下作为肿瘤启动子诱导基因被克隆。近年来, OPN成了研究者倍加关注的与肿瘤发生发展关系很密切的分子之一。研究发现, 在多种类型肿瘤的发生发展的过程中都伴随OPN的表达, 而且OPN高表达的肿瘤更容易表现出侵袭转移的倾向。Coppola *et al*^[5]检测了350块肿瘤组织、113块正常组织(涉及到人体大多部位)OPN蛋白的表达, 发现OPN的表达尽管在不同的肿瘤中表达的阳性率存在差异, 但在同一类肿瘤组织中, OPN的表达与其恶性程度密切相关。目前, 已在乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肝癌、前列腺癌、肺癌及胃癌等肿瘤组织中, 均发现OPN蛋白和(或)mRNA的表达较正常或癌旁组织明显增加。近期, 研究者还在乳腺癌、

表 3 OPN与HIF-1 α 肠癌组中的相关性 t

OPN	HIF-1 α			χ^2 值	t 值
	+	-	合计		
+	28	3	31	24.533	0.700
-	4	15	19		
合计	32	18	50		

前列腺癌、头颈部鳞癌等肿瘤中研究发现患者血浆中OPN的表达较正常组织普遍升高. 同时也发现, 不仅在一些肿瘤患者血浆中OPN水平较高, 在脓血症、肾病和心血管患者的血浆中OPN水平较健康对照组也普遍升高, 提示血浆中OPN水平升高并不是对肿瘤特异的. Yeatman *et al*^[6]综合研究出新的肿瘤标志物, 主张应用基因表达图谱技术去确定新的肿瘤标志物和肿瘤进展标志物, 通过筛选大约12 000个基因, 确定OPN为临床上结肠癌首选的标志物.

本研究采用免疫组织化学染色的方法检测了OPN在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤组织和大肠癌组织中的表达, 发现OPN在正常大肠黏膜组织中不表达, 阳性表达率在大肠腺瘤组织中为66.67%, 大肠癌组织中为64.00%, 说明OPN在大肠腺瘤和大肠癌组织中的表达与正常大肠黏膜相比较差异具有显著性意义($P<0.05$); OPN的阳性表达在大肠癌淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组, 结果呈显著性差异($P<0.05$), 我们推测OPN的表达可能与大肠癌的浸润、转移相关. 我们的结果与Yeatman *et al*^[6]在大肠癌组织检测的OPN mRNA表达情况基本一致. Ding *et al*^[7]也得出类似的结论. OPN阳性表达率在C、D期显著高于A、B期($P<0.05$), 提示OPN在大肠癌的浸润、转移中扮演重要的角色. 如果按组织类型统计, OPN在高中分化组与低分化组中的表达结果也呈显著性差异($P<0.05$), 肿瘤分化程度越低, OPN表达越高, 表明OPN参与大肠癌分化的调控. Rangaswami *et al*^[8]发现OPN能够刺激肿瘤细胞的生长, 他们首次报告OPN诱导NIK/MEKK1介导的JNK1依赖的和非依赖的, AP-1介导的pro-MMP-9的活性, 并且调控NIK/ERK1/2和MEKK1/JNK1之间的交叉连接起负调控作用. 这个通路最终控制细胞的移动、浸润和肿瘤的生长. 因而也进一步说明OPN在肿瘤的浸润、转移中扮演重要的角色. 现在对OPN促使肿瘤转移的可能机制有几种假设: (1)OPN通过与其配体的相互作用, 参与他们介导的细胞与细胞外

基质的黏附活动, 促使肿瘤转移; (2)OPN能抑制iNOS, 从而抑制炎症细胞的氧爆发, 使得癌细胞在周围循环的生存率提高, 从而容易发生肿瘤转移; (3)OPN能够刺激血管内皮细胞的迁移, 促使新生血管的形成, 而肿瘤转移灶的形成与新生血管密切相关. 我们推测OPN可能通过刺激血管内皮细胞的迁移, 促进血管的生成, 从而促进肿瘤的发生和转移, 此途径也可能是大肠癌发生和转移众多环节中的一部分, 同时也表明OPN在参与肿瘤发生发展过程中作用机制的复杂性.

HIF-1是1992年由Semenza *et al*^[10]发现的由HIF-1 α 和HIF-1 β 组成的异源二聚体转录因子, 其中HIF-1 α 水平主要依赖于细胞间的氧供, 决定了HIF-1的活性. HIF-1作为迄今为止发现的唯一的一个特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子, 参与多种基因的转录, 这些靶基因的启动子或增强子内均含有缺氧反应组件(hypoxia response element, HRE), 他是HIF-1的DNA结合位点. 活化的HIF-1与靶基因上的HIF-1结合位点相结合, 形成转录起始复合物从而启动靶基因的转录. 目前研究已发现包括VEGF在内的六十余种HIF-1的靶基因, 功能涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成、肿瘤转移等方面, HIF-1调控的这些基因均以不同的方式参与了肿瘤细胞对缺氧的适应过程, 从而增强了肿瘤细胞在缺氧环境下的生存能力, 促进肿瘤细胞的恶性转化. 近年来对HIF-1 α 特异性的单克隆抗体进行了大量的免疫组织化学研究, 结果显示, 在绝大多数正常人体组织中未检测到HIF-1 α 蛋白的表达, 而在大多数人类实体肿瘤中存在HIF-1 α 的过表达, 且与预后密切相关.

Zhong *et al*研究认为HIF-1 α 表达是前列腺癌的早期事件, 可作为预测前列腺癌的指标^[11]. 也有研究表明在乳腺癌的形成中, HIF-1 α 表达与肿瘤细胞高增殖状态、VEGF表达升高呈正相关, 与肿瘤病理分期和分化程度有关, 分化差的HIF-1 α 表达率比分化好的高, 认为HIF-1 α 可作为乳腺癌患者新的预后判断指标之一^[12]. Birner *et al*^[13]在宫颈癌的研究中不仅得到类似的结果, 而且还进一步证实HIF-1 α 表达水平越高, 预后越差, HIF-1 α 可作为评估肿瘤预后的参考因子. Schindl *et al*^[14]对206例淋巴结转移阳性的乳腺癌标本的HIF-1 α 表达进行分析, 免疫组织化学显示HIF-1 α 阳性表达率为66.2%, 表明HIF-1 α 也是高度侵袭性疾病的一个生物标志.

■名词解释

骨桥蛋白(OPN): 是最先从骨基质中分离而得到的一种含有特异的Arg-Gly-Asp(RGD)序列的有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白, 具有广泛的生物学功能, 包括: 细胞黏附、迁移、钙代谢、血管重塑、免疫调节等.

同行评价

本文研究了OPN和HIF-1 α 在大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达及意义,设计合理,有一定学术价值。

本研究观察了正常大肠黏膜组织,大肠腺瘤组织及不同分期大肠癌组织中HIF-1 α 表达,结果显示, HIF-1 α 在正常大肠黏膜组织中无表达,在大肠腺瘤组织中阳性表达率为33.33%,在大肠癌组织中阳性表达率为62.00%,三者之间表达率差异有显著性($P<0.05$),这与刘岷 *et al*^[15]在大肠癌中的研究结果相类似. 这一结果显示在人类大肠癌组织中存在缺氧状态, HIF-1 α 参与了大肠癌的发生发展. 同时我们还观察到HIF-1 α 表达水平在正常大肠黏膜-大肠腺瘤-大肠癌组织中不断增高,这表明细胞缺氧出现在大肠癌变之前并持续到肿瘤发生发展的全过程. 部分腺瘤高表达HIF-1 α ,提示HIF-1 α 可能通过激活多种下游基因的表达,促进大肠癌的发生. 同时也进一步说明了在腺瘤癌变早期阶段使用HIF-1 α 特异性拮抗阻止大肠腺瘤恶变进程的重要价值及意义.

本研究实验表明: HIF-1 α 阳性表达率在有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者,表达差异具有显著性($P<0.05$). Chen *et al*^[16]和 Takahashi *et al*^[17]发现HIF-1 α 在胃癌组织中的表达与淋巴结转移有关,有淋巴结转移者HIF-1 α 和VEGF的表达率明显高于无淋巴结转移者,且二者具有相关性. Jiang *et al*^[18]在大肠癌组织中也得到了类似的结论. HIF-1 α 阳性表达率在C、D期显著高于A、B期($P<0.05$),说明随着Dukes分期进展, HIF-1 α 表达率逐渐增高,表明HIF-1 α 在大肠癌的浸润、转移中起重要作用, HIF-1 α 高表达的肿瘤组织具有较强的浸润与转移能力. Fan *et al*^[19]用免疫组织化学方法研究HIF-1 α 在肺癌组织中的表达,也得出类似的结论. 另外,在本研究中患者的性别、年龄与HIF-1 α 的表达无相关性($P>0.05$).

OPN和HIF-1 α 在大肠癌组织中的表达单独研究较多,但二者在大肠癌组织中的联合研究尚未见报道. 分析前人的研究结果, OPN和HIF-1 α 在大肠癌组织中的表达不是独立的事件,而是有内在联系的. 缺氧是实体肿瘤发生发展的过程中不可避免的一种肿瘤微环境. 前人的研究充分证实OPN在缺氧的微环境中扮演了很重要的角色^[3-4]. 而HIF-1 α 是肿瘤细胞在缺氧环境下的中心反应组件,能激活众多缺氧反应基因的表达. OPN可通过与 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体结合介导激活PI3-K/AKT信号通路. 而PI3-K/AKT、MAPK等信号通路在调节HIF-1 α 活性中起重要作用^[20-21]. 因此,采用统计学方法分析我们的实

验结果,发现OPN和HIF-1 α 的表达水平呈明显相关($r = 0.700, P<0.01$). 我们推测OPN可能通过启动PI3-K/AKT信号通路上调HIF-1 α 蛋白的水平,促进大肠癌细胞存活. 但是否是唯一的信号途径以及是否依赖缺氧环境,还需要进一步深入研究.

本研究结果提示, OPN及HIF-1 α 在大肠癌的浸润和转移中起重要作用,二者可以作为在大肠癌发生和发展过程中发挥重要功能的分子标志物,以及可靠有效的治疗靶标. 两者的联合检测可以为预测大肠癌的发展趋势和转移潜能提供依据,并为大肠癌的基因治疗提供新的靶点.

参考文献

- 1 袁禧先, 张丹, 王凤荣, 张琦玮. 基质金属蛋白酶-9与抑癌基因PTEN在大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1132-1136
- 2 Terashi T, Aishima S, Taguchi K, Asayama Y, Sugimachi K, Matsuura S, Shimada M, Maehara S, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Decreased expression of osteopontin is related to tumor aggressiveness and clinical outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2004; 24: 38-45
- 3 Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes* 2001; 50: 1482-1490
- 4 Li P, Oparil S, Feng W, Chen YF. Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1550-1558; discussion 1549
- 5 Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 184-190
- 6 Yeatman TJ, Chambers AF. Osteopontin and colon cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 85-90
- 7 Ding L, Zheng S. [Expression and clinical significance of osteopontin in colorectal cancer and liver metastatic tissues] *Zhonghua Waike Zazhi* 2002; 40: 773-775
- 8 Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. JNK1 differentially regulates osteopontin-induced nuclear factor-inducing kinase/MEKK1-dependent activating protein-1-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 19381-19392
- 9 Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression-implications for malignant progression and therapy. *Acta Oncol* 1998; 37: 567-574
- 10 Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;

- 88: 5680-5684
- 11 Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 88-93
 - 12 Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1573-1581
 - 13 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4693-4696
 - 14 Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1831-1837
 - 15 刘岷, 卞胜利, 史成章. HIF-1 α 和VEGF在大肠癌组织中的表达及其与血管生成的关系. *实用癌症杂志* 2004; 19: 142-144
 - 16 Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 207-213
 - 17 Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Haruma K, Chayama K. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003; 10: 797-802
 - 18 Jiang CQ, Fan LF, Liu ZS, Qian Q, Xia D, Diao LM, He YM, Ai ZL. Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1541-1546
 - 19 Fan LF, Diao LM, Chen DJ, Liu MQ, Zhu LQ, Li HG, Tang ZJ, Xia D, Liu X, Chen HL. [Expression of HIF-1 alpha and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer] *Ai Zheng* 2002; 21: 254-258
 - 20 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545
 - 21 Richard DE, Berra E, Gothi   E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 32631-32637
 - 22 Song G, Ming Y, Mao Y, Bao S, Ouyang G. Osteopontin prevents curcumin-induced apoptosis and promotes survival through Akt activation via alpha v beta 3 integrins in human gastric cancer cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 1537-1545

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 •

汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-10-28)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

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

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

丁惠国 主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

丁佑铭 教授
武汉大学人民医院肝胆腔镜外科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

房林 副教授
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高泽立 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

郭晓钟 教授
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

季国忠 教授
南京医科大学第二附属医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医院消化科

刘冰熔 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘占举 教授
同济大学附属第十人民医院胃肠内科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

田字彬 教授
青岛大学医学院附属医院消化内科

王蒙 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

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

杨维良 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科

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

张晓岚 教授
河北医科大学第二医院消化内科

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科