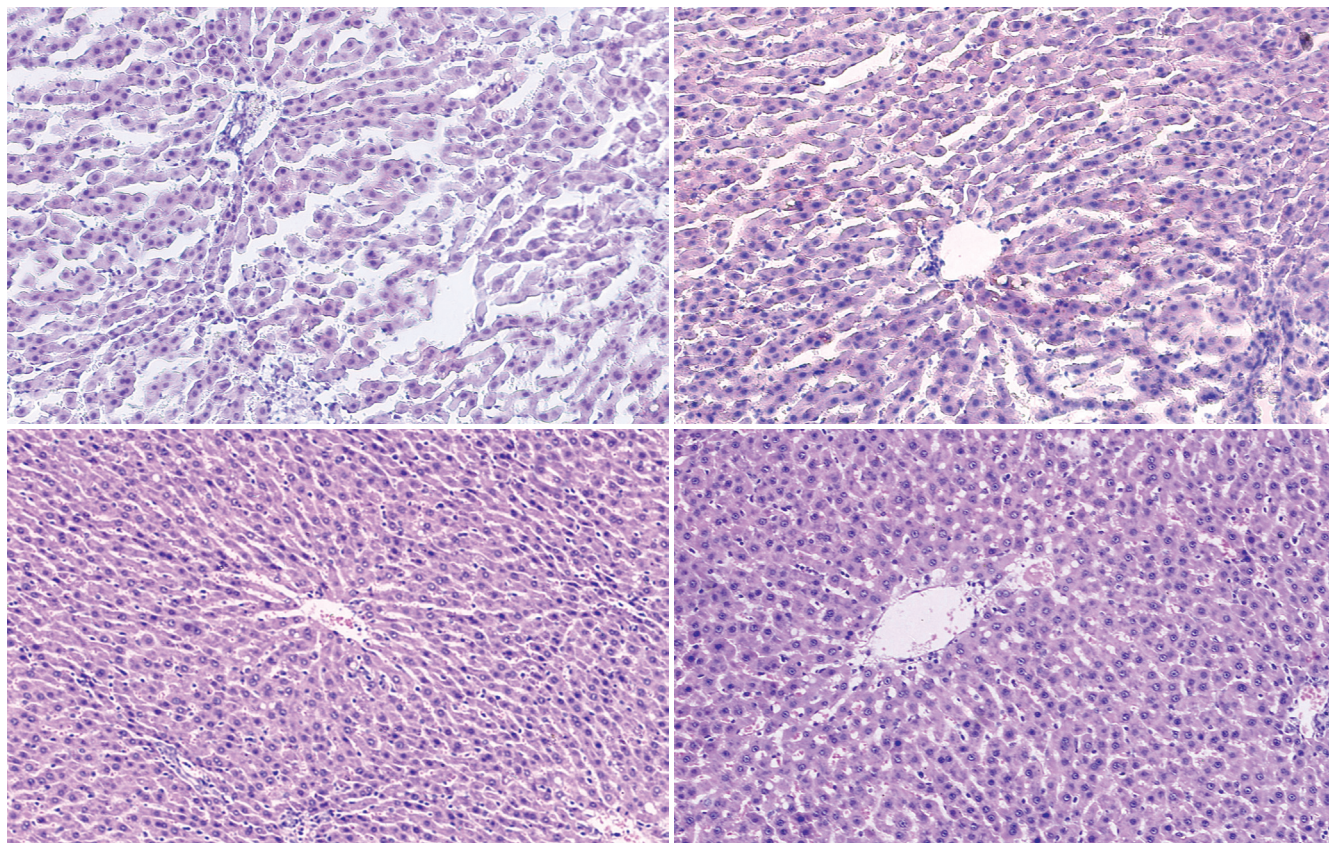


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年11月28日 第17卷 第33期 (Volume 17 Number 33)



33 / 2009

ISSN 1009-3079



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  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
岳茂兴教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 常务编委

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

### 编委

消化内科学  
白爱平副教授  
聂新明教授  
陈洪副教授

陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
崔立红副教授  
邓长生教授  
丁士刚主任医师  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
何松教授  
洪天配教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄晓东副主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李祖国副教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海林主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
马欣主任医师

倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党副教授  
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      | 高泽立副教授   | 沈洪教授       | 消化中西医结合学 | 消化病理学    |
| 王正康教授      | 龚国忠教授    | 唐志鹏研究员     | 唐文富副教授   | 杜祥教授     |
| 王志刚副主任医师   | 管世鹤副教授   | 王富春教授      | 王学美研究员   | 李淳副教授    |
| 王忠裕教授      | 何生松教授    | 王新月教授      | 魏睦新教授    | 刘丽江教授    |
| 吴河水教授      | 胡国信副主任医师 | 谢鸣教授       | 张春虎副教授   | 刘勇钢副主任医师 |
| 吴健雄教授      | 林菊生教授    | 徐列明教授      |          | 马大烈教授    |
| 吴金术教授      | 刘正稳教授    | 许玲副教授      | 消化基础研究   | 潘兴华副主任医师 |
| 吴泰璜教授      | 貌盼勇研究员   | 张声生教授      | 曹洁副教授    | 王鲁平主任医师  |
| 吴志勇教授      | 宁琴教授     |            | 曹鹏副研究员   | 王娅兰教授    |
| 谢敏主任医师     | 钱林学主任医师  | 消化肿瘤学      | 樊红副教授    | 魏蕾教授     |
| 谢晓华副教授     | 孙殿兴主任医师  | 曹秀峰教授      | 高春芳研究员   | 颜宏利副教授   |
| 邢光明教授      | 谭德明教授    | 曹志成院士      | 高国全教授    | 于颖彦教授    |
| 徐大华主任医师    | 汤华研究员    | 陈公琰主任医师    | 高英堂研究员   | 余宏宇教授    |
| 徐迅迪副主任医师   | 唐霓副研究员   | 李璦教授       | 管冬元副教授   | 张锦生教授    |
| 徐泱副主任医师    | 唐晓鹏教授    | 刘宝瑞教授      | 胡旭初副教授   | 赵景民教授    |
| 许戈良教授      | 王凯教授     | 刘彬彬副研究员    | 黄园教授     | 朱亮副教授    |
| 严律南教授      | 王怡主任医师   | 刘云鹏教授      | 黄文林教授    |          |
| 杨柏霖副主任医师   | 魏来教授     | 沈克平主任医师    | 李刚教授     |          |
| 杨家和主任医师    | 吴建国教授    | 肖文华主任医师    | 李杰副教授    |          |
| 杨秋蒙副主任医师   | 吴君主任医师   | 熊斌教授       | 李永哲副研究员  |          |
| 杨维良教授      | 宣世英教授    | 张凤春教授      | 李增山副教授   |          |
| 伊力亚尔·夏合丁教授 | 杨江华副主任医师 |            | 刘克辛教授    |          |
| 殷正丰教授      | 杨林副研究员   | 消化影像学      | 梅林教授     |          |
| 于聪慧教授      | 姚鹏副教授    | 白彬主任医师     | 钱睿哲教授    |          |
| 于则利教授      | 张继明教授    | 陈克敏教授      | 任超世研究员   |          |
| 郁宝铭教授      | 张明辉副主任医师 | 官泳松教授      | 任浩副教授    |          |
| 元云飞教授      | 张占卿主任医师  | 韩新巍教授      | 台桂香教授    |          |
| 张佳林教授      | 赵桂鸣主任医师  | 李健丁教授      | 谭学瑞教授    |          |
| 张进祥副教授     | 赵连三教授    | 龙学颖副主任医师   | 田颖刚副研究员  |          |
| 张俊副研究员     | 周霞秋教授    | 倪才方教授      | 汪思应教授    |          |
| 张群华教授      | 朱传武主任医师  | 魏经国教授      | 吴军研究员    |          |
| 张水军教授      | 庄林主任医师   | 肖恩华教授      | 吴俊华副教授   |          |
| 张宗明教授      |          | 徐爱民副教授     | 徐宁志研究员   |          |
| 周伟平教授      | 消化中医药学   | 徐克教授       | 许文燮教授    |          |
| 邹小明教授      | 蔡淦教授     | 扬业发教授      | 姚登福教授    |          |
|            | 陈治水主任医师  | 杨建勇教授      | 阴赅宏研究员   |          |
| 消化感染病学     | 杜群副研究员   | 赵卫主任医师     | 郁卫东副研究员  |          |
| 陈国凤主任医师    | 黄恒青主任医师  |            | 喻荣彬副教授   |          |
| 陈红松研究员     | 李军祥教授    | 消化内镜及介入治疗学 | 张青云研究员   |          |
| 陈建杰教授      | 李康副教授    | 丁佑铭教授      | 张学教授     |          |
| 陈仕珠主任医师    | 李勇副教授    | 郝俊鸣副主任医师   | 赵平副教授    |          |
| 陈志辉副主任医师   | 李振华教授    | 潘林娜教授      | 周南进研究员   |          |
| 党双锁教授      | 刘成海研究员   | 孙明军教授      | 周士胜教授    |          |
| 丁惠国教授      | 刘孟安教授    | 万军教授       | 周素芳教授    |          |
| 范建高教授      | 刘平教授     | 吴硕东教授      | 周晓东研究员   |          |
| 范小玲主任医师    | 刘绍能主任医师  | 袁友红副教授     | 周晓武副主任医师 |          |
| 高润平教授      |          |            |          |          |

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 11 月 28 日 第 17 卷 第 33 期 (总第293期)

## 述 评

3377 胃镜下经皮胃造瘘的临床应用  
许乐

## 基 础 研 究

3381 PI3K p53 N末端氨基酸过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响  
李坤, 郭红艳, 吴琦, 张梅, 高涵, 孙晓杰

3387 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果  
张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲

3394 饮食调整对非酒精性脂肪肝病的治疗作用及机制  
谭莺, 陈金虎, 张佳妮, 王利娟, 刘慧霞

3402 针刺结合西沙必利对慢传输便秘大鼠结肠肌电的影响  
周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 余芝, 鞠传慧, 马飞翔

## 临 床 研 究

3408 肿瘤浸润淋巴细胞在结直肠癌中的临床病理分析  
秦誉, 耿敬姝, 张大川

## 文 献 综 述

3414 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展  
申川, 高健, 赵彩彦

3420 移植肝抗体介导排斥反应的研究进展  
黄海建, 郑智勇, 余英豪

3426 预处理防治肝缺血再灌注损伤的研究进展  
吴林熹, 曾仲

3431 蛋白质组学在大肠癌研究中的应用  
高丽丽, 孙自勤

## 研 究 快 报

3437 FHIT基因转染对胆管癌细胞增殖与侵袭的影响  
谢放, 黄强

3441 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型组织中c-jun表达的影响  
贺捷, 哈木拉提·吾甫尔, 黄静静, 吴军, 库热西·玉努斯

## 临 床 经 验

3446 错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及意义  
夏岷, 刘希双, 杨堃, 隋爱华

3451 新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态  
王军, 张伟, 李艳红, 郭永, 朱少君, 巩丽, 姚丽, 张丽

3456 Fractalkine在正常人和肝纤维化与肝硬化患者肝脏组织内的表达  
廖欣鑫, 廖彩仙, 黄勇平, 秦安成, 袁杰, 赖勇强, 龚祖元

3460 血清VEGF及CRP表达对肝细胞癌术后早期复发的预测  
马立辉, 周健, 王助新, 胡大为, 史丽民, 敖亚洲, 张海峰

3465 直肠癌腔内超声分期的诊断价值及其与TNM分期关系  
史国红, 王学梅, 于英蛟, 李银燕, 董鲜普



|       |   |
|-------|---|
|       | 3469 铋剂在雷贝拉唑为主的三联疗法中的作用<br>徐娴, 张振玉  |
| 病例报告  | 3472 胃十二指肠复合型溃疡合并空肠异位胰腺1例<br>赵兴文, 王胜, 陶守军, 苏传伟, 刘建斌   |
| 致 谢   | 3474 致谢世界华人消化杂志编委   |
| 消 息   | 3380 《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<br>3393 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081<br>3401 《世界华人消化杂志》数字用法标准<br>3407 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序<br>3413 《世界华人消化杂志》修回稿须知<br>3419 《世界华人消化杂志》英文摘要要求<br>3425 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标<br>3430 《世界华人消化杂志》外文字符标准<br>3436 《世界华人消化杂志》中文摘要要求<br>3440 《世界华人消化杂志》名词术语标准<br>3450 《世界华人消化杂志》参考文献要求<br>3455 WJG成功通过评审被PMC收录<br>3459 《世界华人消化杂志》计量单位标准<br>3464 《世界华人消化杂志》正文要求<br>3473 《世界华人消化杂志》栏目设置 |
| 封面故事  | 谭莺, 陈金虎, 张佳妮, 王利娟, 刘慧霞. 饮食调整对非酒精性脂肪肝病的治疗作用及机制.<br>世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3394-3401<br><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3394.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3394.asp</a>   |
| 本期责任人 | 编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李瑞敏; 审核编辑 李军亮;<br>形式规范 马连生   |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名<br/>陈可冀 题写版权刊名<br/>(旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15<br/>改 刊 1998-01-25<br/>出 版 2009-11-28<br/>原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣<br/>总 编 辑 马连生<br/>常务副总编辑 张海宁<br/>编辑部主任 张海宁<br/>期 刊 名 称 世界华人消化杂志<br/>主 管 单 位 山西省科学技术厅<br/>主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> | <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会<br/>030001, 山西省太原市双塔西街77号<br/>电话: 0351-4078656<br/>E-mail: wcjd@wjgnet.com<br/><a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部<br/>030001, 山西省太原市双塔西街77号<br/>电话: 0351-4078656<br/>E-mail: wcjd@wjgnet.com<br/><a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p>印刷 北京科信印刷厂<br/>发行 国内: 北京报刊发行局<br/>国外: 中国国际图书贸易总公司<br/>(100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局<br/>邮购 世界华人消化杂志编辑部<br/>030001, 山西省太原市双塔西街77号<br/>电话: 0351-4078656<br/>E-mail: wcjd@wjgnet.com<br/><a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></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(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p><b>特别声明</b><br/>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 <b>ISSN 1009-3079</b><br/><b>CN 14-1260/R</b></p>  | <p>邮发代号 <b>82-262</b><br/>国外代号 <b>M 4481</b></p>  | <p>国内定价 <b>每期24.00元 全年864.00元</b><br/>广告经营许可证 <b>1401004000050</b></p>   |

# World Chinese Journal of Digestology

## November 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 33

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>EDITORIAL</b>           | 3377 Clinical applications of percutaneous endoscopic gastrostomy<br><i>Xu L</i>  |
| <b>BASIC RESEARCH</b>      | <p>3381 Overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55<math>\gamma</math> regulatory subunit of PI3K inhibits the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells<br/><i>Li S, Guo HY, Wu Q, Zhang M, Gao H, Sun XJ</i></p> <p>3387 Reversal effects of siRNAs targeting different regions of the <i>mdr1</i> gene on multidrug resistance in two drug-resistant tumor cell lines<br/><i>Zhang M, Li YL, Gao JK, Wang GD, Gao FL</i></p> <p>3394 Therapeutic effects of diet change on nonalcoholic fatty liver disease<br/><i>Tan Y, Chen JH, Zhang JN, Wang LJ, Liu HX</i></p> <p>3402 Effects of acupuncture, cisapride and combined acupuncture and cisapride on colonic electromyography in rats with slow transit constipation<br/><i>Zhou HF, Wang LL, Yi YL, Yu Z, Ju CH, Ma FX</i></p> |
| <b>CLINICAL RESEARCH</b>   | 3408 Clinicopathological characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer<br><i>Qin Y, Geng JS, Zhang DC</i>  |
| <b>REVIEW</b>              | <p>3414 Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: recent advances<br/><i>Shen C, Gao J, Zhao CY</i></p> <p>3420 Advances in research on antibody-mediated rejection after liver transplantation<br/><i>Huang HJ, Zheng ZY, Yu YH</i></p> <p>3426 Preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury: recent advances<br/><i>Wu LX, Zeng Z</i></p> <p>3431 Application of proteomics in colorectal cancer research<br/><i>Gao LL, Sun ZQ</i></p>  |
| <b>RAPID COMMUNICATION</b> | <p>3437 FHIT gene transfection inhibits the proliferation and invasiveness of human cholangiocarcinoma QBC939 cells<br/><i>Xie F, Huang Q</i></p> <p>3441 Xipayi Kui Jie'an downregulates c-jun expression in rat ulcerative colitis<br/><i>He J, Hamulati Wufuer, Huang JJ, Wu J, Kurexi Yunusi</i></p>  |
| <b>CLINICAL PRACTICE</b>   | <p>3446 Significance of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 expression in gastric cancer<br/><i>Xia D, Liu XS, Yang K, Sui AH</i></p> <p>3451 HBV infection status in newborns that are only positive for truncated HBV RNA<br/><i>Wang J, Zhang W, Li YH, Guo Y, Zhu SJ, Gong L, Yao L, Zhang L</i></p> <p>3456 Intrahepatic levels of Fractalkine in healthy individuals and patients with hepatic fibrosis and cirrhosis<br/><i>Liao XX, Liao CX, Huang YP, Qin AC, Yuan J, Lai YQ, Gong ZY</i></p>  |

|   |   |
|---|---|
|   | <p>3460 Use of preoperative serum VEGF and CRP levels for prediction of postoperative early recurrence in patients with hepatocellular carcinoma<br/><i>Ma LH, Zhou J, Wang ZX, Hu DW, Shi LM, Ao YZ, Zhang HF</i></p> <p>3465 Transrectal ultrasonography in preoperative staging of rectal carcinoma: diagnostic value and relationship with TNM staging<br/><i>Shi GH, Wang XM, Yu YJ, Li YY, Dong XP</i></p> <p>3469 Therapeutic effects of colloidal bismuth subcitrate in rabeprazole-based quadruple therapy<br/><i>Xu X, Zhang ZY</i></p> |
| <b>CASE REPORT</b>                        | <p>3472 Concomitant gastric and duodenal ulcers with jejunal pancreatic heterotopia: a report of one case<br/><i>Zhao XW, Wang S, Tao SJ, Su ZW, Liu JB</i></p>   |
| <b>ACKNOWLEDGMENT</b>                     | <p>3474 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>  |
| <b>COVER</b>                              | <p><i>Tan Y, Chen JH, Zhang JN, Wang LJ, Liu HX.</i> Therapeutic effects of diet change on nonalcoholic fatty liver disease. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2009; 17(33): 3394-3401<br/><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3394.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3394.asp</a></p>   |
| <b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b> | <p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i><br/>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Rui-Min Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i><br/>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** November 28, 2009

**NAME OF JOURNAL**  
*World Chinese Journal of Digestology*

**RESPONSIBLE INSTITUTION**  
Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

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

**EDITING**  
Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Telephone: +86-351-4078656  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

**PRINTING**  
Beijing Kexin Printing House

## PUBLISHING

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

## OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

**HONORARY EDITOR-IN-CHIEF**  
Bo-Rong Pan

**EDITOR-IN-CHIEF**  
Lian-Sheng Ma

**SCIENCE EDITORS**  
Director: Hai-Ning Zhang

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

## CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

## COPYRIGHT

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

## SPECIAL STATEMENT

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

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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



# 胃镜下经皮胃造瘘的临床应用

许乐

许乐, 卫生部北京医院消化内科 北京市 100730  
通讯作者: 许乐, 主任医师, 100730, 北京市东单大华路1号, 卫生部北京医院消化内科. xule7200@hotmail.com  
电话: 010-85133834  
收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-11-04  
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Clinical applications of percutaneous endoscopic gastrostomy

Le Xu

Le Xu, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital, the Ministry of Health of the People's Republic of China, Beijing 100730, China  
Correspondence to: Le Xu, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital, the Ministry of Health of the People's Republic of China, 1 Dongdan Dahua Road, Beijing 100730, China. xule7200@hotmail.com  
Received: 2009-10-16 Revised: 2009-11-04  
Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

### Abstract

Since the first published report of a percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) in 1980, the procedure has been used widely in clinical practice. It has now replaced the surgical gastrostomy which was associated with a markedly higher rate of complications. Placement of a PEG/PEJ (percutaneous endoscopic jejunostomy) tube is simple, safe and well-tolerated by patients. In this article, we will review the indications, contraindications, preparation, technique and complications of PEG.

**Key Words:** Percutaneous endoscopic gastrostomy; Indications; Contraindications

Xu L. Clinical applications of percutaneous endoscopic gastrostomy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(33): 3377-3380

### 摘要

1980年非手术经皮内镜下胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)被介绍应用于临床, 其优点是操作简便、并发症少。近30年来, PEG临床应用的范围不断扩展,

越来越受到重视。该项技术已在欧美、日本等国家替代外科胃造瘘。目前PEG已经成为需要长期肠内营养支持患者的首选方法。本文介绍了PEG技术, PEG的适应证、禁忌证、并发症以及处理方法。

**关键词:** 经皮内镜下胃造瘘; 适应证; 禁忌证

许乐. 胃镜下经皮胃造瘘的临床应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3377-3380  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3377.asp>

### 0 引言

对因吞咽困难、吞咽机能丧失或吞咽机能受损至呛咳而消化道功能正常的患者, 临床常采用鼻胃管饲以维持患者营养。充足的营养支持可以减少危重患者的并发症及改善其预后。肠内营养可以经鼻胃管、鼻肠管、胃造口和空肠造口等多种途径进行。肠内营养最常用的方法是放置鼻胃管, 该法尽管有效, 但在临床应用时也有许多困难及并发症。因为这些营养管经常出现堵塞管腔而迫使不停换管, 且管子会经常移位, 给患者带来许多不适。管壁长期刺激食管黏膜而易发生食管炎, 而且由于营养管破坏了正常的贲门功能, 经常发生胃食管反流。频繁的反流容易导致吸入性肺炎。鼻胃管的长期使用也容易导致腮腺炎和鼻软骨的破坏。因此, 危重患者需要长期肠内营养时, 通常进行胃造口或空肠造口, 患者耐受较好。传统使用手术胃造口, 缺点是需要麻醉及开腹放置胃造瘘管, 既增加患者痛苦也增加了手术风险, 且费用高。1980年非手术经皮内镜下胃造口术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)被介绍应用于临床, 优点是操作简便, 并发症少<sup>[1]</sup>。近30年来, PEG临床应用的范围不断扩展, 越来越受到重视。2009年中华神经科杂志神经系统疾病营养支持工作组发布了《神经系统疾病营养支持共识》, 共识意见提出脑卒中伴吞咽困难患者, 发病4 wk后不改善在有条件情况下采用PEG喂养(A级推荐)。痴呆晚期患者可采用PEG喂养(B

### 背景资料

PEG是指在内镜下, 用套管针经腹壁穿刺入胃腔, 置入导丝, 引导胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔, 从而形成的胃造瘘。1980年应用于临床, 优点是操作简便, 并发症少。近30年来, PEG的临床应用范围不断扩展, 越来越受到重视。

### 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

#### 应用要点

本文提示,在决定实施PEG前应仔细分析患者的具体情况,权衡利弊,防止并发症的发生,以给患者带来最大的利益。

级推荐)。其他神经系统疾病如脑肿瘤、神经变性疾病(运动神经元病和多系统萎缩等)、脊髓痨、多发性周围神经和肌肉疾病导致持续吞咽困难者,发病4 wk后不改善推荐PEG喂养(A级推荐)。任何原因引起的昏迷患者,发病4 wk后不恢复如持续植物状态,推荐PEG喂养(B级推荐)。目前PEG已经成为需要长期肠内营养支持患者的首选方法。

### 1 PEG的概念

PEG是指在内镜下,用套管针经腹壁穿刺入胃腔,置入导丝,引导胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔,从而形成的胃造瘘。PEG具有操作简单(5-15 min),可在患者床边放置,只需局部麻醉,安全,造瘘管留置时间长,可达6 mo以上,并发症少的特点<sup>[2-3]</sup>。患者出院后可以继续行家庭肠内营养、胃肠减压或胆汁回输。能在体质差、营养情况差、危重患者进行该项治疗,改善患者的营养状况。PEG已在欧美、日本等国家广泛开展,2002年美国有大约40万例患者施行该项技术,并替代外科胃造瘘。国内近年来也成功地开展了此项技术<sup>[4-5]</sup>。

### 2 PEG的适应证

PEG适应证广泛,包括脑血管病后遗症、帕金森氏病、头颈部肿瘤等。主要适应证:各种神经系统疾病及全身性疾病所致经口进食困难引起营养不良,而胃肠道功能正常,需要长期营养支持者,均适合PEG。特别适用于下列情况:咽喉痹;脑血管意外、外伤、肿瘤或脑部手术后意识不清;经口腔或鼻饲补充营养有困难者;各种肌病所致的吞咽困难,以及完全不能进食的神经性厌食及神经性呕吐患者。利用PEG进行胃肠减压的患者包括:胃瘫;胃幽门梗阻;恶性肿瘤导致的肠梗阻。去除鼻胃管改用PEG,可以改善患者的生活质量,简化护理,易于在家中进行治疗,比鼻胃管更舒适和美观<sup>[6-10]</sup>。

### 3 PEG的禁忌证

PEG的主要禁忌证包括不能通过胃镜、生存时间不超过数天或数周、操作中胃腔经充气后不能保证胃壁与腹壁紧密接触。相对禁忌证包括大量腹水、巨胖、胃次全切除术后、腹膜透析、无法纠正的凝血障碍、肝肿大、胃底静脉曲张、胃壁肿瘤或受肿瘤侵犯、巨大裂孔疝、腹壁皮肤有感染、心肺功能衰竭等<sup>[6-10]</sup>。

### 4 PEG的技术

PEG有3个基本方法: Ponsky-Gauderer拖出(pull)法、Sacks-Vine推入(push)法、Russell插入(Introducer)法<sup>[1]</sup>。所有方法的基本原理相似,拖出法是PEG最主要的置管方法。主要步骤:正确的术前准备有助于减少并发症的发生。术前对口腔、牙齿、咽部进行广泛清洁。患者应术前8 h禁食。放置胃造瘘管前、后均常规应用抗生素预防感染。主要针对G<sup>+</sup>菌的抗生素,头孢唑啉能很好地杀灭此类细菌及其他常见的微生物。患者应采取仰卧位及抬高头部15度来减少误吸,由于该体位不容易使胃镜插入到食管,因而开始时通常采用左侧卧位,然后再恢复成仰卧位。吸引器应及时吸出口咽部的分泌物,并保证患者维持足够的氧供应量,选用静脉麻醉时整个操作过程中应有1名助手监测血压、脉搏和氧分压。1名助手协助操作。胃造瘘部位定位于左锁骨中线,剑突至脐上1/3处。胃镜插入胃腔后充气使胃充分膨胀,使肝叶上移及横结肠下移,确定胃壁及腹壁紧密接触后,关闭胃镜室灯光,通过腹壁观察胃镜灯光,将胃镜灯光调整至拟造瘘部位后,造瘘部位局部消毒、铺巾。20 g/L普鲁卡因4 mL局部麻醉穿透腹壁至胃腔,造瘘部位做皮肤切口约0.5 cm,用套管针经腹壁穿刺入胃腔,拔除针芯,置入导丝进入胃腔,通过胃镜活检孔放入息肉切除套圈,抓住导丝连同胃镜一同拔出。将导丝与胃造瘘管连接后,从腹壁牵引导丝使胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔。再次插入胃镜至胃内观察造瘘管情况,使胃造瘘管蘑菇头与胃壁紧密接触后,腹壁局部消毒固定胃造瘘管,并使造瘘管盘片与腹壁保持轻度紧张状态。造瘘后24 h禁食,之后少量、多次逐渐增加喂食量。每天局部消毒更换敷料1次直至造瘘口形成。每次管饲后予30 mL净水冲洗导管,保证导管畅通。每次喂食抬高床头使患者处于半卧位或坐位。喂食完毕后保持此姿势30-60 min,以减少胃食管反流的发生。

### 5 经皮内镜下空肠造瘘(percutaneous endoscopic jejunostomy, PEJ)

PEJ主要用于严重的胃食管反流或胃动力障碍的患者。可在原胃造瘘管上再附加一空肠喂饲管,用内镜将空肠喂饲管经幽门送入空肠。为了达到胃肠减压和肠道营养的目的,并能防止食管反流及吸入性肺部感染,因此最好将饲管置入十二指肠远端。由于易在胃内结圈,难以进入

十二指肠, 因此通常在内镜及导引钢丝辅助下完成. 即首先通过PEG管将软导丝在内镜及X线透视监视下插入十二指肠及屈氏韧带远端, 然后在导丝引导下插入软细管. 拔出导丝. 注射造影剂证实为空肠上端后, 即完成操作. 此方法可置入较粗的24F饲管, 更有利于胃肠道营养.

## 6 PEG的并发症及其处理

PEG的并发症发生率低, 13%为轻微并发症, 仅3%发生严重并发症如胃穿孔、腹膜炎、胃出血, 死亡率为0.3%-1%. 严重并发症主要与麻醉、误吸、喉痉挛、腹膜炎、心力衰竭等有关. 有报道, 误吸的发生率高达35%, 是导致死亡最常见的原因. 轻微并发症包括切口感染、导管移位、造口旁渗漏、导管堵塞、切口血肿等<sup>[11-18]</sup>. 最常见的并发症是造瘘口周围皮肤感染. (1)造瘘口周围感染: 细菌多来源于消化道, 与造瘘管周围皮肤固定过紧或过松有一定的关系, 术前预防性使用抗生素, 可明显减少此项并发症的发生. 抗生素的选择目前尚无统一意见. 我们建议预防感染可用头孢唑啉或奎诺酮类抗生素. 一旦确定有皮肤感染, 可考虑换用二或三代头孢类抗生素及局部加强换药, 常短期内恢复. 如抗炎治疗无效则要考虑真菌感染的可能. 为预防造瘘口感染, 应每天观察造瘘口周围皮肤、换药清洁伤口. 同时应注意胃造瘘管蘑菇头与胃壁及造瘘管固定盘片与腹壁接触的松紧度, 保持轻度紧张以避免腹部皮肤及胃黏膜坏死, 同时也避免胃壁与腹腔壁有空隙而发生腹腔感染. (2)PEG营养管堵塞: 如导管堵塞, 则须更换, 切勿用高压冲洗或导丝再通. (3)胃肠道出血: 较少见, 可能与穿刺点偏于大弯侧有关, 而此处胃浆膜血管丰富, 可通过接紧造瘘管或内镜下处理. (4)包埋综合征: 指过度牵拉PEG管道, 导致胃黏膜坏死, 从而内垫片从胃腔移行至胃壁内或腹壁内. 包埋综合征的发生率为1.5%-1.9%. 胃黏膜发生凝固性坏死, 然后新生的黏膜再覆盖在内垫片上, 一般需要4 mo以上. 内镜下无法找到内垫片. 为避免包埋综合征的发生, 建议在PEG管外卡口和腹壁间留有0.5 cm的距离, 以减少内垫片对胃黏膜的压力. 对于包埋综合征, 局麻下于皮肤切一小口取出即可. (5)造瘘管漏: 由于造瘘口大于造瘘管, 或因造瘘管移位, 胃内容物及灌入营养液沿管周漏出, 称为外漏; 也可漏入腹腔内, 为内漏. 前者可更换大号造瘘管止漏, 后者为一种严重的并发症, 应手术处理. (6)胃结肠瘘: 可因穿刺针同时刺入结肠和胃或造瘘管

压迫结肠引起坏死, 以致胃与结肠相通. 较小的瘘在拔除导管后可自愈, 大的胃结肠瘘可出现更加严重的营养不良和中毒症状, 应手术治疗. (7)吸入性肺炎: 可能与食管反流有关. 发生吸入性肺炎后, 应积极给予抗感染治疗. 同时采取以下措施: 逐渐增加每次营养液的输入量, 不可操之过急; 抬高床头, 加快胃排空, 服用促胃肠动力药; 或将造瘘管头端放入空肠, 以减少反流.

## 7 PEG与鼻胃管饲的比较

尽管鼻胃管饲仍为一种有效的管饲营养方法, 特别是短期管饲营养. 但鼻胃管饲影响患者的外观形象, 对患者心理造成不良影响. 同时由于鼻胃管需每30 d换管1次造成患者痛苦, 易使患者拒绝继续管饲及自行拔管. PEG除可避免上述影响外, 只需每6 mo换管1次, 如护理得当, 可留置1年以上. 鼻胃管饲因管径小易发生堵塞, 而PEG导管内径粗不易发生堵塞. 鼻胃管且易发生导管脱落及置管失败. 2001年一项涵括122例神经性持续吞咽困难患者的前瞻多中心队列研究显示: PEG喂养生存率、误吸率及脱管率均优于鼻胃管喂养组<sup>[19]</sup>. 我们对32例行PEG老年患者进行回顾性分析, 采用同组对照的方法比较PEG术前及PEG术后2 mo体质量、血红蛋白、血白蛋白的变化. 与鼻胃管饲(NGT)相比患者平均体质量、血红蛋白、血白蛋白在PEG术后无明显变化<sup>[20]</sup>. 而Park *et al*报道一项纳入90例吞咽困难患者的研究表明PEG喂养组患者体质量增加优于鼻胃管组, 两者比较差异显著( $P<0.05$ )<sup>[21]</sup>. 对脑血管病、长期卧床的老年患者, 吸入性肺炎致死率高达40%, 鼻胃管饲吸入性肺炎发生率为43%<sup>[22]</sup>. 我们的经验PEG术后吸入性肺炎发生率较鼻胃管饲显著降低( $P<0.05$ )<sup>[20]</sup>. 但有文献报道, PEG并不能有效防止口腔分泌物、胃内容物反流所致的吸入性肺炎<sup>[22]</sup>. 对于吸入性肺炎的发生情况, 尚需更多临床资料加以证实. 因长期鼻胃管饲影响贲门下括约肌功能, 易发生反流性食管炎. 我们的调查显示PEG术后较鼻胃管饲反流性食管炎严重程度减轻, 发生率明显降低( $P<0.05$ )<sup>[20]</sup>.

## 8 结论

虽然PEG是一项安全有效的治疗方法, 但在适应证的选择上对那些基础疾病严重、预期寿命短暂的患者, PEG并不能为患者带来根本的利益. 因此在决定实施PEG前应仔细分析患者的具体

**同行评价**  
本文有助于人们清晰认识PEG, 也便于PEG在临床上推广应用, 具有较大的临床借鉴意义.



情况, 权衡利弊, 防止并发症的发生, 以给患者带来最大的利益。

## 9 参考文献

- 1 Gauderer MW, Ponsky JL, Izant RJ Jr. Gastrostomy without laparotomy: a percutaneous endoscopic technique. *J Pediatr Surg* 1980; 15: 872-875
- 2 Byrne KR, Fang JC. Endoscopic placement of enteral feeding catheters. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 546-550
- 3 Ljungdahl M, Sundbom M. Complication rate lower after percutaneous endoscopic gastrostomy than after surgical gastrostomy: a prospective, randomized trial. *Surg Endosc* 2006; 20: 1248-1251
- 4 陈建, 王春明, 赵幼安, 李延青. 经皮内镜胃造瘘术10例临床分析. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 298-299
- 5 许乐, 崔桂兰, 罗庆峰, 王秀娣, 石蕾. 胃镜下经皮胃造瘘临床应用. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 405-406
- 6 Gutt CN, Held S, Paolucci V, Encke A. Experiences with percutaneous endoscopic gastrostomy. *World J Surg* 1996; 20: 1006-1008; discussion 1108-1109
- 7 Foutch PG, Haynes WC, Bellapravalu S, Sanowski RA. Percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG). A new procedure comes of age. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8: 10-15
- 8 Stellato TA, Gauderer MW. Percutaneous endoscopic gastrostomy for gastrointestinal decompression. *Ann Surg* 1987; 205: 119-122
- 9 Marks JM, Ponsky JL. Access routes for enteral nutrition. *Gastroenterologist* 1995; 3: 130-140
- 10 Stellato TA. Expanded applications of percutaneous endoscopic gastrostomy. *Gastrointest Clin N Am* 1992; 2: 249-257
- 11 Nicholson FB, Korman MG, Richardson MA. Percutaneous endoscopic gastrostomy: a review of indications, complications and outcome. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 21-25
- 12 Radhakrishnan NV, Shenoy AH, Cartmill I, Sharma RK, George R, Foster DN, Quest L. Addition of local antiseptic spray to parenteral antibiotic regimen reduces the incidence of stomal infection following percutaneous endoscopic gastrostomy: A randomized controlled trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1279-1284
- 13 Faias S, Cravo M, Claro I, Lage P, Nobre-Leitao C. High rate of percutaneous endoscopic gastrostomy site infections due to oropharyngeal colonization. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2384-2388
- 14 Dormann AJ, Wejda B, Kahl S, Huchzermeyer H, Ebert MP, Malfertheiner P. Long-term results with a new introducer method with gastropexy for percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1229-1234
- 15 Chen W, Kawahara H, Takahashi M, Matsushima A, Takase S. Marked pneumoperitoneum 3 weeks after percutaneous endoscopic gastrostomy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 919-921
- 16 Mainie I, Loughrey A, Watson J, Tham TC. Percutaneous endoscopic gastrostomy sites infected by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact on outcome. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 297-300
- 17 Douzinas EE, Tsapalos A, Dimitrakopoulos A, Diamanti-Kandarakis E, Rapidis AD, Roussos C. Effect of percutaneous endoscopic gastrostomy on gastro-esophageal reflux in mechanically-ventilated patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 114-118
- 18 Will U, Wegener C, Graf KI, Wanzar I, Manger T, Meyer F. Differential treatment and early outcome in the interventional endoscopic management of pancreatic pseudocysts in 27 patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4175-4178
- 19 Dwolatzky T, Berezovski S, Friedmann R, Paz J, Clarfield AM, Stessman J, Hamburger R, Jaul E, Friedlander Y, Rosin A, Sonnenblick M. A prospective comparison of the use of nasogastric and percutaneous endoscopic gastrostomy tubes for long-term enteral feeding in older people. *Clin Nutr* 2001; 20: 535-540
- 20 许乐, 罗庆峰. 内镜下经皮胃造瘘对老年患者生活质量的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 294-297
- 21 Park RH, Allison MC, Lang J, Spence E, Morris AJ, Danesh BJ, Russell RI, Mills PR. Randomised comparison of percutaneous endoscopic gastrostomy and nasogastric tube feeding in patients with persisting neurological dysphagia. *BMJ* 1992; 304: 1406-1409
- 22 Ciocon JO, Silverstone FA, Graver LM, Foley CJ. Tube feedings in elderly patients. Indications, benefits, and complications. *Arch Intern Med* 1988; 148: 429-433

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《中国期刊引证报告(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 2009-11-28)

# PI3K p55 $\gamma$ N末端氨基酸过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响

李 琰, 郭红艳, 吴 琦, 张 梅, 高 涵, 孙晓杰

李琰, 郭红艳, 吴琦, 张梅, 高涵, 孙晓杰, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161006  
李琰, 2003年广西医科大学硕士, 主要从事分子生物学研究。  
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. ZA2006-04  
黑龙江省教育厅基金资助项目, No. 11531431  
作者贡献分布: 本课题由孙晓杰设计; 研究过程由李琰与郭红艳等操作完成; 数据采集、分析由李琰、吴琦、张梅及高涵完成; 本论文写作由李琰与郭红艳完成, 孙晓杰进行批评性审阅。  
通讯作者: 孙晓杰, 教授, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市建华区卜奎大街333号, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室。  
sunxj97@yahoo.com.cn  
电话: 0452-2663151  
收稿日期: 2009-10-11 修回日期: 2009-11-09  
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

## Overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 $\gamma$ regulatory subunit of PI3K inhibits the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells

Shen Li, Hong-Yan Guo, Qi Wu, Mei Zhang, Han Gao, Xiao-Jie Sun

Shen Li, Hong-Yan Guo, Qi Wu, Mei Zhang, Han Gao, Xiao-Jie Sun, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China, No. ZA2006-04; and the Foundation of Heilongjiang Educational Committee, No. 11531431

Correspondence to: Professor Xiao-Jie Sun, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical University, 333 Bokui North Street, Jianhua District, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. sunxj97@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-11 Revised: 2009-11-09

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 $\gamma$  regulatory subunit (N24p55 $\gamma$ ) of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) on the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells.

**METHODS:** MGC803/GFP-N24 and MGC803/GFP cell lines stably expressing N24p55 $\gamma$ -GFP

fusion protein (GFP-N24) and GFP protein alone were generated by transfection of MGC803 cells with pEGFPN24 plasmid and control plasmid pEGFPC1, respectively. The impact of GFP-N24 overexpression on cell motility and migration was detected by wound healing assay and Transwell migration assay. The expression and secretion of tumor metastasis-related protein matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were determined by gelatin zymography. The effect of GFP-N24 overexpression on the activity of the PI3K-Akt signaling pathway was analyzed by Western blot.

**RESULTS:** The MGC803/GFP-N24 cell line steadily expressing the GFP-N24 fusion protein and the MGC803/GFP cell line steadily expressing GFP were successfully established. The results of wound healing assay and Transwell migration assay showed that the *in vitro* migration of MGC803/GFP-N24 cells was restricted ( $t = 0.003$ ,  $P < 0.01$ ). GFP-N24 overexpression inhibited the activity of PI3K-Akt signaling pathway by decreasing the expression of phospho-Akt in MGC803 cells. However, GFP-N24 overexpression did not alter the expression and secretion of MMP9 protein.

**CONCLUSION:** Ectopic expression of N24p55 $\gamma$  inhibits cell migration *in vitro* by suppressing the activity of the PI3K-Akt signaling pathway in MGC803 cells. The N24p55 $\gamma$  peptide can potentially be used to treat gastric carcinoma.

**Key Words:** Phosphoinositide 3-kinase; p55 $\gamma$ ; Gastric carcinoma cells; Migration

Li S, Guo HY, Wu Q, Zhang M, Gao H, Sun XJ. Overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 $\gamma$  regulatory subunit of PI3K inhibits the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3381-3386

## 摘要

**目的:** 观察p55 $\gamma$  N末端24个氨基酸的过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响。

**背景资料**  
PI3K参与细胞增殖、分化、凋亡和迁移等功能的调节。p55 $\gamma$ 是近年来新发现的PI3K调节亚基, 其N末端序列能与Rb蛋白结合调节细胞周期的进程。p55 $\gamma$  N末端的过表达能抑制胃癌细胞的生长增殖, 本文进一步研究其对胃癌细胞运动迁移能力的影响。

**同行评议者**  
周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

### 研发前沿

PI3K-Akt信号通路与肿瘤的发生发展均相关,他已经成为当前抗肿瘤药物研发领域的热点。在中国,胃癌死亡率仍居恶性肿瘤死亡率第1位,但现阶段应用于临床的胃癌分子靶向治疗药物仍有许多局限性,因此亟待研发更多高效的靶向治疗药物。

**方法:**通过脂质体介导用pEGFPN24和空载体pEGFPC1质粒进行基因转染,建立稳定表达融合蛋白GFP-N24和GFP的细胞系;通过细胞划痕实验和迁移实验观察GFP-N24的过表达对细胞运动迁移的影响;明胶酶谱实验观察其对肿瘤转移相关基因MMP9表达和分泌的影响;免疫印迹实验检测GFP-N24的过表达对PI3K-Akt信号通路活性的影响。

**结果:**建立了稳定表达融合蛋白GFP-N24的MGC803/GFP-N24细胞系和表达GFP的MGC803/GFP细胞系。细胞划痕实验和细胞迁移实验发现表达GFP-N24的MGC803细胞运动迁移能力下降( $t = 0.003$ ,  $P < 0.01$ )。GFP-N24通过减少磷酸化Akt的表达而抑制PI3K-Akt信号的活性,但其对MMP9的表达和分泌没有影响。

**结论:**PI3K p55 $\gamma$  N末端24个氨基酸通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性而抑制胃癌MGC803细胞的迁移,其在胃癌的治疗上可能具有潜在的应用前景。

**关键词:**磷脂酰肌醇3-激酶; p55 $\gamma$ ; 胃癌细胞; 迁移

李坤, 郭红艳, 吴琦, 张梅, 高涵, 孙晓杰. PI3K p55 $\gamma$  N末端氨基酸过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3381-3386  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3381.asp>

## 0 引言

胃癌在全球常见恶性肿瘤中居第4位,而42%的病例发生在中国。据WHO最新统计,至2005年胃癌仍是居中国癌症死亡率首位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)参与细胞内多种信号转导机制,调节细胞的增殖、分化、迁移、凋亡以及胰岛素刺激的葡萄糖转运等。PI3K活性的异常与多种人类肿瘤的发生相关,近年来大量文献报道PI3K和其下游分子Akt所组成的信号通路(PI3K-Akt信号通路)与肿瘤侵袭转移的主要事件如肿瘤细胞的迁移黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等相关。作为PI3K的调节亚基, p55 $\gamma$ 以其独特的N末端与视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白相互作用,调节细胞周期的进程<sup>[2-3]</sup>。前期研究发现, p55 $\gamma$ 参与生长因子介导的细胞迁移过程,其N末端24个氨基酸(N-terminal 24 amino acid, N24)的过表达在体内和体外均能抑制胃癌细胞的生长,表现为细胞生长速度减慢、细胞周期阻滞、克隆形成能力以及在裸鼠中的成瘤能力

降低等<sup>[4-5]</sup>。在此基础上,我们进一步研究N24的过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响,并初步探讨其作用的分子机制,为开发以PI3K信号通路为靶点的抗肿瘤药物奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究所用细胞MGC803为胃低分化黏液腺癌细胞系,由中国医学科学院肿瘤医院所提供。细胞用含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液在50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养。本实验所使用的空载体质粒pEGFPC1和重组质粒pEGFPN24由美国霍普金斯大学医学院夏献民博士惠赠,该质粒转染真核细胞后分别表达绿色荧光蛋白GFP和融合蛋白GFP-N24。RPMI 1640和Pestained protein marker为Gibco BRL公司产品, GFP多克隆抗体购自BD公司, pAkt(473Ser)多克隆抗体为Cell signaling公司产品,  $\beta$ -actin mAb、Fibronectin和Collagen为Sigma公司产品,细胞培养瓶、Transwell培养板为Costar公司产品, Wortmannin购自生物晶美公司,为Upstate公司产品,结晶紫和Gelatin为鼎国生物技术公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因转染:**采用Lipofectamine进行基因转染,具体操作按说明书进行。生长良好的细胞于转染前1 d接种到培养板中,经16-18 h后,细胞总面积达到60%-70%时用pEGFPN24重组质粒和空载体质粒pEGFPC1各3  $\mu$ g进行基因转染。用含G418的选择性培养基筛选抗性克隆(浓度前3 d为600 mg/L,以后为400 mg/L),建立稳定表达融合蛋白GFP-N24的803/GFP-N24多克隆pooled细胞系和表达GFP的803/GFP空载体多克隆pooled细胞系,通过Western blot方法鉴定融合蛋白GFP-N24的表达。稳定转染的细胞系用含200 mg/L G418的培养液扩大培养用于实验。

**1.2.2 免疫印迹:**收集生长状态良好的细胞,用含PMSF的PBS洗2遍。加入蛋白裂解液RIPA (50 mmol/L Tris pH7.5, 1.0 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 g/L SDS, 10 g/L TritonX-100, 10 g/L去氧胆酸钠),冰浴30 min。4℃12000 r/min离心10 min,取上清,采用Bradford法进行蛋白定量后进行SDS-PAGE及转膜。50 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h;加一抗4℃过夜(GFP和pAkt为1:1000,  $\beta$ -actin为1:5000);TTBS漂洗3次后加二抗,室温孵育45 min;TTBS漂洗3次后进行ECL显色,显影于X光片上,用Umax2100XL扫描及Quantity



One图像分析系统测定吸光度值(A值).

**1.2.3 细胞划痕实验:** 将生长状态良好的细胞按每孔 $1 \times 10^5$ 种植于6孔培养板上, 细胞长至60%-70%汇合, 形成单细胞层. 对照组细胞先用200 nmol/L的Wortmannin处理30 min再种植于6孔培养板上. 分别观察MGC803、MGC803+WT、MGC803/GFP、MGC803/GFP-N24 4组细胞0、24和48 h的增殖速度. 同时用塑料加样器在另外4组单层细胞上划过一个创伤口. 继续培养48 h, 在0、24和48 h分别观察伤口愈合情况<sup>[6]</sup>.

**1.2.4 细胞迁移实验:** 细胞培养至良好状态, 常规胰酶消化. 计数 $1 \times 10^5$ 细胞, 加入Transwell迁移小杯, 对照组细胞先用200 nmol/L的Wortmannin处理30 min后再加入迁移小杯. 将迁移小杯放入含RPMI 1640的24孔板中, 于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养8 h. 取出迁移小杯, 以PBS轻轻冲洗后, 用棉花棒轻轻擦去杯底膜上层的细胞. 950 mL/L乙醇固定细胞10 min, 2 g/L结晶紫染色20 min, PBS冲洗, 10 g/L SDS 200  $\mu$ L于37℃溶解1 h后, 酶标仪测A<sub>620</sub>值, 结果进行统计学分析<sup>[7]</sup>.

**1.2.5 明胶酶谱实验:** 在6孔板中接种相同数量的各组转染细胞, 进行无血清培养, 48 h后收集上清. 按Fridman *et al*<sup>[8]</sup>方法, 在分离胶的配制中, 加10 g/L明胶使之终浓度为1 g/L, 100 g/L非还原性SDS-PAGE电泳, 进行基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)酶谱实验. 样品不经加热变性, 与非还原性上样缓冲液混合上样. 电泳结束后, 取下胶, 蒸馏水漂洗后, 于25 g/L TritonX-100中室温轻摇2 h. 蒸馏水漂洗后, 将胶放入明胶酶缓冲液中, 置于37℃摇床缓慢摇动5-12 h. 2.5 g/L考马斯亮蓝R250染色4 h, 脱色液中脱色, 直至出现负染带.

**统计学处理** 实验数据均以mean $\pm$ SD表示, 使用SPSS13.0 for Windows软件包进行t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 N24p55 $\gamma$ 在MGC803细胞中的表达** 由于pEGFP-C1载体表达绿色荧光蛋白GFP, 用抗GFP的抗体通过Western blot方法对稳定转染的多克隆pooled细胞中外源基因的表达进行了检测. 结果发现N24p55 $\gamma$ 能够在MGC803细胞中得到表达, 但融合蛋白GFP-N24的表达量低于空载体中GFP的表达量(图1).

**2.2 细胞划痕实验** 在无血清培养的条件下观察

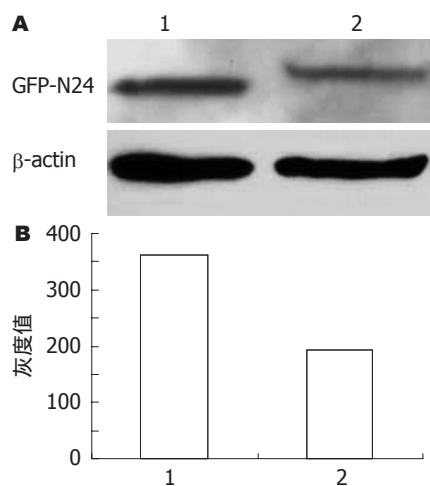


图1 转染细胞中N24p55 $\gamma$ 的表达. A: 免疫印迹方法鉴定N24p55 $\gamma$ 在MGC803细胞中的表达; B: N24p55 $\gamma$ 在MGC803细胞中的表达灰度值水平, 经 $\beta$ -actin校正; 1: 803/GFP细胞; 2: 803/GFP-N24细胞.

细胞的运动迁移, 结果各组细胞的生长速度都很缓慢, 细胞不发生迁移, 伤口在0、24和48 h没有明显变化, 各组细胞之间没有明显差异. 而给细胞添加血清后细胞发生迁移(图2), 但MGC803/GFP-N24组细胞迁移速度缓慢, 在划痕24 h后创伤口变化与0 h差异不大, 但此时对照MGC803/GFP细胞和亲本细胞伤口则已有部分愈合, 其迁移速度明显大于MGC803/GFP-N24组. 在划痕后48 h, 亲本细胞和对照组细胞伤口已经基本愈合, 但MGC803/GFP-N24组细胞伤口尚未愈合. 可见GFP-N24的表达抑制了MGC803细胞的运动迁移, 但其抑制作用低于PI3K抑制剂Wortmannin.

**2.3 细胞迁移实验** Transwell细胞迁移实验显示, 亲本细胞和对照空载体组细胞有大量细胞穿过, 而MGC803/GFP-N24组穿过膜的细胞明显减少, 经PI3K抑制剂Wortmannin处理后的亲本细胞于镜下仅见少量的细胞穿过, 经检测MGC803、MGC803+WT、MGC803/GFP以及MGC803/GFP-N24细胞的A<sub>620</sub>值分别为 $0.466 \pm 0.041$ 、 $0.217 \pm 0.053$ 、 $0.471 \pm 0.033$ 、 $0.270 \pm 0.046$ , MGC803/GFP-N24组与空载体相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $t = 0.003$ , 图3).

**2.4 N24p55 $\gamma$ 对磷酸化Akt表达的影响** 由于p55 $\gamma$ 与催化亚基p110结合后能表现PI3K的活性, 进而通过磷酸化作用激活其下游靶蛋白PKB(Akt), 导致PI3K-Akt信号通路的活化, 进而调节细胞的增殖、分化和迁移. 因此在没有其他因素的影响下, 可以用细胞中磷酸化Akt(pAkt)的表达水平代表PI3K-Akt信号通路的活性<sup>[9]</sup>. 实验中收

**创新盘点**  
本文通过基因转染方法研究了N24p55 $\gamma$ 的过表达对胃癌MGC803细胞运动迁移的影响, 初步探讨了其作用的分子机制, 为开发以PI3K信号通路为靶点的抗肿瘤药物奠定基础.

## 应用要点

本研究发现N24p55 $\gamma$ 的过表达通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性,从而抑制胃癌MGC803细胞的迁移,在胃癌的靶向治疗方面具有潜在的应用前景.

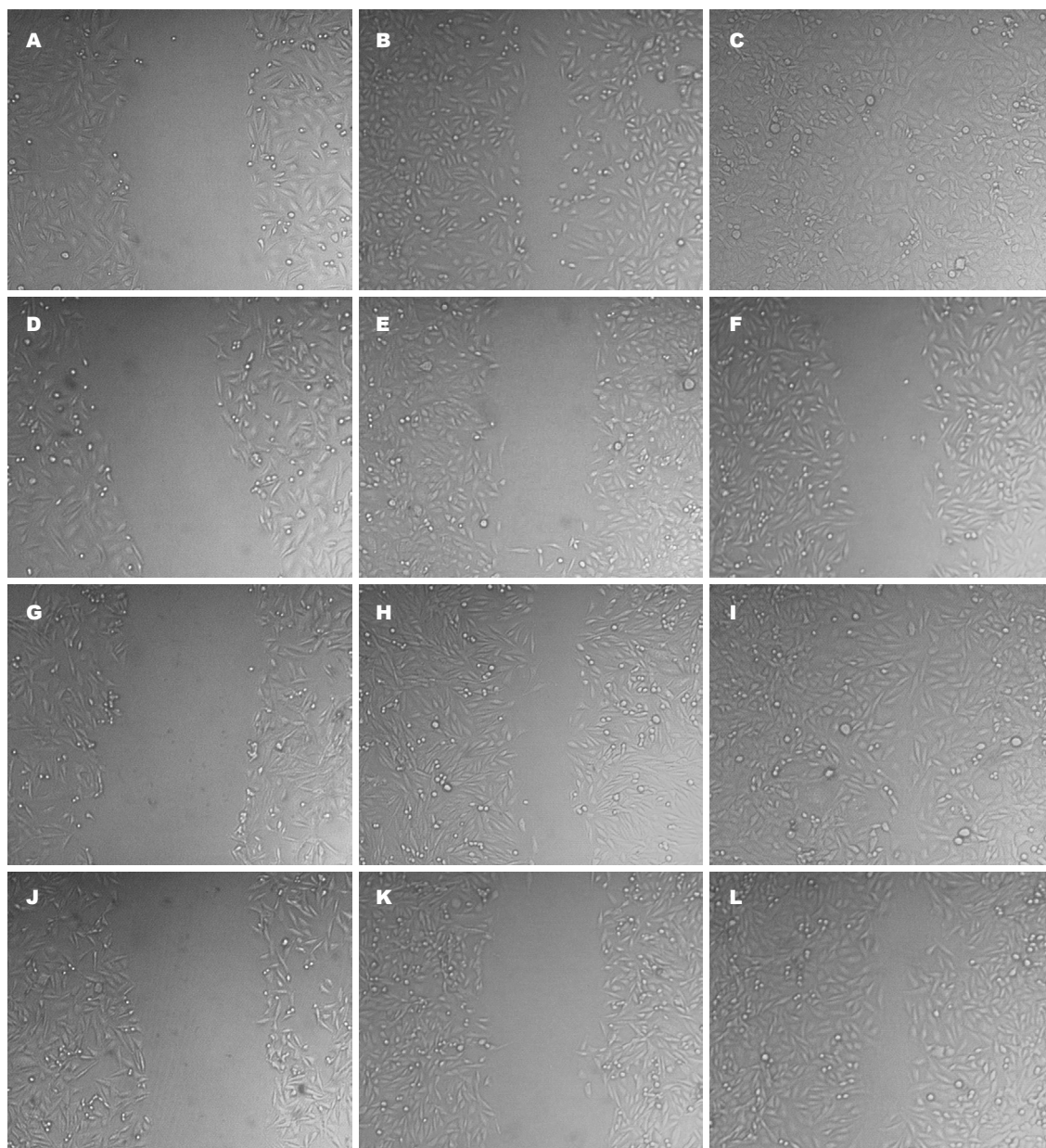


图2 N24p55 $\gamma$ 的过表达对MGC803细胞迁移的影响. A-C: MGC803; D-F: MGC803+WT; G-I: MGC803/GFP; J-L: MGC803/GFP-N24; A, D, G, J: 0 h; B, E, H, K: 24 h; C, F, I, L: 48 h.

集对数生长期的各组转染细胞,分别提取细胞总蛋白,通过免疫印迹方法检测细胞中总pAkt的表达.结果与对照空载体细胞相比,MGC803/GFP-N24细胞中,pAkt的表达量明显减少(图4),表明融合蛋白GFP-N24的过表达对PI3K信号通路下游蛋白激酶PKB(Akt)的活化具有抑制作用.

### 2.5 N24p55 $\gamma$ 对基质金属蛋白酶9表达的影响

肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤组织产生MMP的能力存在密切的正相关性.明胶酶谱实验结果显示:在各组细胞上清中均检测到相对分子质量为82 kDa的活化型MMP9,3组细胞在表达量上没有明显差异,但未检测到92kDa的酶原型MMP9(图5).表明融合蛋白GFP-N24的表达没有影响细胞中

MMP9的表达和分泌.

### 3 讨论

p55 $\gamma$ 是Pons *et al*<sup>[10]</sup>于1995年通过筛选鼠cDNA表达文库分离得到的新的PI3K调节亚基.在结构上p55 $\gamma$ 与调节亚基P85 $\alpha$ 和P85 $\beta$ 在C末端70%同源,能与催化亚基P110结合表现PI3K的活性,不同之处是其N末端缺乏SH3、BCR以及富脯氨酸基序等蛋白结合结构域,但却含有具有潜在磷酸化位点Tyr-22的YXXM基序.关于p55 $\gamma$ 在细胞中的功能目前尚不完全清楚.

本研究建立了稳定表达N24p55 $\gamma$ 的MGC803细胞系,此24个氨基酸序列为MDRD



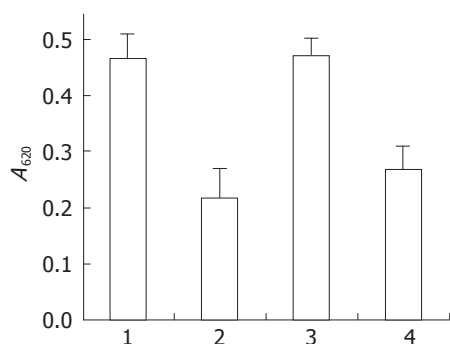


图 3 N24p55 $\gamma$ 过表达对细胞迁移的影响. 1: MGC803; 2: MGC803+WT; 3: MGC803/GFP; 4: MGC803/GFP - N24.

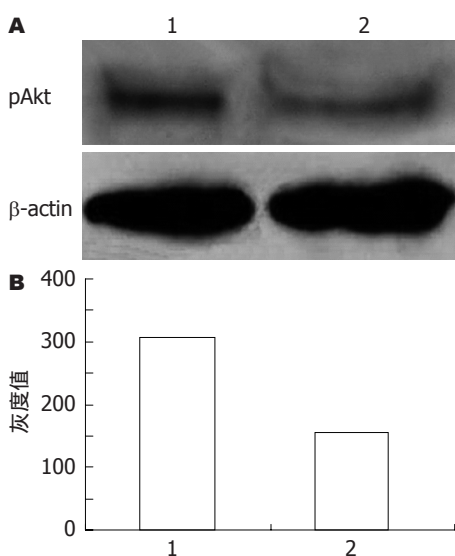


图 4 N24p55 $\gamma$ 的过表达对PI3K-Akt信号通路活性的影响. A: 免疫印迹方法观察N24p55 $\gamma$ 基因转染对MGC803细胞pAkt表达的影响; B: N24p55 $\gamma$ 基因转染对MGC803细胞pAkt表达灰度值水平, 经 $\beta$ -actin校正; 1: MGC803/GFP细胞; 2: MGC803/GFP - N24细胞.

DADWREVMMPYSTELIFYIE. 我们发现N24的过表达能抑制MGC803细胞的运动迁移能力. 大量文献报道在肿瘤侵袭转移过程中常伴随着PI3K-Akt信号通路的组成性活化<sup>[11]</sup>. 作为PI3K的下游靶分子, Akt通过PDK1的磷酸化作用而被激活, 活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白如Bad、caspase9、NF- $\kappa$ B、GSK-3、FKHR、P21Cip1和P27 Kip1等, 调节细胞的存活、生长、分化、血管形成和迁移等功能. 本研究发现转染N24p55 $\gamma$ 的细胞中pAkt的表达量明显减少, 推测GFP-N24通过下调细胞中pAkt的表达而抑制PI3K-Akt信号通路的活性, 这不仅使由Akt活化所导致的细胞增殖受阻, 而且在某种程度上也可能对PI3K-Akt信号通路所参与的肿瘤的侵袭和转移行为有所抑制. MMP是肿瘤侵袭转移过程中细胞外基质重建或降

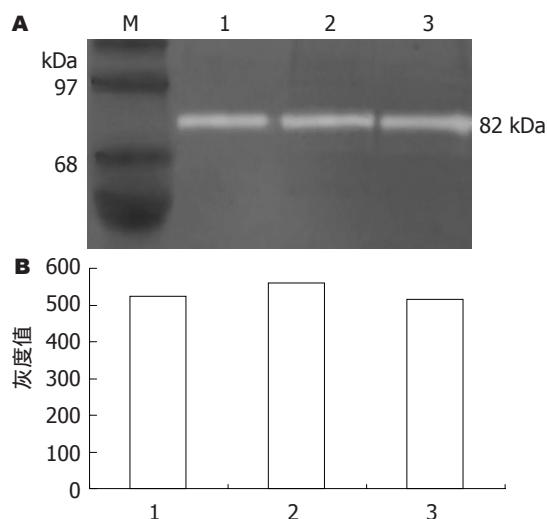


图 5 N24p55 $\gamma$ 的过表达对肿瘤转移相关基因MMP9表达的影响. A: 明胶酶谱实验检测N24p55 $\gamma$ 基因转染对MGC803细胞MMP9表达的影响; B: N24p55 $\gamma$ 基因转染对MMP9表达的灰度值水平; M: Marker; 1: MGC803细胞; 2: MGC803/GFP细胞; 3: MGC803/GFP - N24细胞.

解、去除细胞迁移屏障的关键酶, 肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤组织产生MMP的能力呈正相关性, 而MMP9与多种人类肿瘤的侵袭和转移都相关<sup>[12-13]</sup>, 但本研究中GFP-N24的过表达并没有影响细胞中MMP9的表达. 上述结果表明, 抑制PI3K-Akt信号通路关键分子pAkt的表达可能是N24p55 $\gamma$ 抑制MGC803细胞运动迁移的主要机制.

据报道<sup>[14]</sup>, 正常情况下细胞中内源性p55 $\gamma$ 的蛋白表达量却极低, 几乎检测不到, 而本实验中在MGC803细胞中亦未检测出内源性p55 $\gamma$ 的蛋白表达, 所以本实验可以忽略胃癌MGC803细胞野生型PI3K p55 $\gamma$ 调节亚基的微量mRNA对实验结果的影响. 另外, 本实验融合蛋白GFP-N24的表达量虽然不高, 但细胞划痕实验和迁移实验结果良好, 我们经过数次努力未将表达量提高, 这将是我们将来努力的方向, 相信高表达量的载体将会带来更好的抑制细胞迁移能力.

目前PI3K-Akt信号通路已成为抗肿瘤药物研究领域的热点<sup>[15-16]</sup>, 在肝癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌<sup>[18]</sup>、肾脏肿瘤<sup>[19]</sup>的靶向治疗中都有较深入的研究. 胃癌分子靶向治疗已经成为优于手术、放疗、化疗三大传统治疗方案的新趋势, 具有高分子特异性、高选择性、高效性、低副作用的优点<sup>[20]</sup>. 而且现阶段应用于临床的20多类靶向药物具有耐药时间不够长、种类少、造价高等缺点, 临床上急需更多高效的靶向治疗药. 用于抑制该信号通路的策略包括发展和应用小分子抑制剂、

**名词解释**  
显性负效应(DN): 抑癌基因突变的拷贝在另一野生型拷贝存在并表达的情况下, 仍可使细胞出现恶性表型和癌变, 并使野生型拷贝功能失活, 这种作用称为显性负效应.



## 同行评价

本研究通过观察PI3K调节亚基N24p55 $\gamma$ 对胃癌MGC803细胞迁移的影响,以探讨其作用机制,有一定的科学性和参考价值。

反义核酸、RNA干扰以及显性负效应蛋白的表达等。Xia *et al*<sup>[2]</sup>发现N24p55 $\gamma$ 抑制内源性p55 $\gamma$ 的表达,因此认为其具有显性负效应的作用。本研究发现N24p55 $\gamma$ 通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性抑制胃癌细胞的迁移,Wortmannin作为PI3K的抑制剂虽然能有效抑制PI3K的活性,但因其细胞毒作用较大因此一直用于实验研究未能进入临床,本研究中GFP-N24对细胞迁移的抑制作用虽然低于Wortmannin,但因其来源于细胞对人体没有毒性,而且提高质粒表达量应该会增加疗效,提示其在胃癌的治疗上具有潜在的应用前景。

## 4 参考文献

- WHO. The Impact of Cancer. Emerg Infect Dis serial online, 2007-11-11, cited 2009-10-11; 1(1): 24 screens. Available from: URL: [http://www.who.int/ncd\\_surveillance/infobase/web/InfoBasPolicyMaker/reports/ReporterFullView.aspx?id=5](http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/web/InfoBasPolicyMaker/reports/ReporterFullView.aspx?id=5)
- Xia X, Cheng A, Akinmade D, Hamburger AW. The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1717-1725
- Hu J, Liu S, Wang J, Luo X, Gao X, Xia X, Feng Y, Tao D, Wang G, Li X, Zhao J, Ding H, Reed E, Li QQ, Gong J. Overexpression of the N-terminal end of the p55gamma regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase blocks cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1321-1327
- 孙晓杰, 赵玫, 袁兴华, 余权, 郑利民, 方明镜, 黄常志. PI3Kp55PIK调节亚单位N末端抑制胃癌细胞株MGC803生长及其机制. *癌症* 2006; 25: 264-268
- 孙晓杰, 赵玫, 袁兴华, 余权, 黄常志. 磷酸酰肌醇3激酶p55 $\gamma$ 调节亚单位对胃癌细胞系MGC803细胞迁移的影响. *中华医学杂志* 2006; 86: 3269-3271
- Trifonova R, Small D, Kacer D, Kovalenko D, Kolev V, Mandinova A, Soldi R, Liaw L, Prudovsky I, Maciag T. The non-transmembrane form of Delta1, but not of Jagged1, induces normal migratory behavior accompanied by fibroblast growth factor receptor 1-dependent transformation. *J Biol Chem* 2004; 279: 13285-13288
- Diehl D, Hoeflich A, Wolf E, Lahm H. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res* 2004; 64: 1600-1603
- Fridman R, Fuerst TR, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Kraus S, Komarek D, Liotta LA, Berman ML, Stetler-Stevenson WG. Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J Biol Chem* 1992; 267: 15398-15405
- Choi YA, Lim HK, Kim JR, Lee CH, Kim YJ, Kang SS, Baek SH. Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 36579-36585
- Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4453-4465
- Mukherji A, Janbandhu VC, Kumar V. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 37-44
- Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H, O'Malley BW, Xu J. The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5937-5950
- Martin MD, Carter KJ, Jean-Philippe SR, Chang M, Mobashery S, Thiolloy S, Lynch CC, Matrisian LM, Fingleton B. Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background. *Cancer Res* 2008; 68: 6251-6259
- Xia X, Serrero G. Multiple forms of p55PIK, a regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase, are generated by alternative initiation of translation. *Biochem J* 1999; 341 ( Pt 3): 831-837
- Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008; 27: 5511-5526
- Nagl F, Schönhof K, Seidler B, Mages J, Allescher HD, Schmid RM, Schneider G, Saur D. Retinoic acid-induced nNOS expression depends on a novel PI3K/Akt/DAX1 pathway in human TGW-nu-I neuroblastoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C1146-C1156
- Park SJ, Sohn HY, Yoon J, Park SI. Down-regulation of FoxO-dependent c-FLIP expression mediates TRAIL-induced apoptosis in activated hepatic stellate cells. *Cell Signal* 2009; 21: 1495-1503
- Chen Y, Guggisberg N, Jorda M, Gonzalez-Angulo A, Hennessy B, Mills GB, Tan CK, Slingerland JM. Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3396-3405
- Lee DH, Szczepanski MJ, Lee YJ. Magnolol induces apoptosis via inhibiting the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 1113-1122
- Mahalingam D, Mita A, Sankhala K, Swords R, Kelly K, Giles F, Mita MM. Targeting sarcomas: novel biological agents and future perspectives. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 937-949

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲, 新乡医学院组织胚胎学教研室 河南省新乡市 453003

张敏, 2008年新乡医学院硕士研究生, 主要从事肿瘤耐药研究.

河南省科技攻关计划基金资助项目, No. 072102310073

作者贡献分布: 此课题由高福莲与张敏设计; 研究过程由张敏、李勇莉及高建凯操作完成; 研究所用试剂及分析工具由高福莲提供; 数据分析由张敏、李勇莉及王国栋完成; 论文由张敏完成.

通讯作者: 高福莲, 教授, 453003, 河南省新乡市金德大道东段, 新乡医学院组织胚胎学教研室. gfl@xxmu.edu.cn

电话: 0373-3029243

收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-11-09

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Reversal effects of siRNAs targeting different regions of the mdr1 gene on multidrug resistance in two drug-resistant tumor cell lines

Min Zhang, Yong-Li Li, Jian-Kai Gao, Guo-Dong Wang, Fu-Lian Gao

Min Zhang, Yong-Li Li, Jian-Kai Gao, Guo-Dong Wang, Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Henan Province, No. 072102310073

Correspondence to: Professor Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, East Jinsui Avenue, Xinxiang 453003, Henan Province, China. gfl@xxmu.edu.cn

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

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of four siRNAs targeting different regions of the multidrug resistance 1 (mdr1 gene) on multidrug resistance (MDR) of SGC7901/VCR and K562/A02 cells.

**METHODS:** Four siRNAs (mdr1si326, mdr1si1513, mdr1si2631 and mdr1si3071) targeting the mdr1 gene were designed and transfected into SGC7901/VCR and K562/A02 cells, respectively. The expression level of mdr1 mRNA was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression

level of P-glycoprotein (P-gp) was detected by immunohistochemistry. The accumulation of intracellular adriamycin (ADR) was examined by flow cytometry. The cell sensitivity to ADR was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

**RESULTS:** The best reversal effects on MDR of SGC7901/VCR cells were achieved with mdr1si326, followed by mdr1si2631, mdr1si3071 and mdr1si1513. Similarly, the best reversal effects on MDR of K562/A02 cells were also achieved with mdr1si326, followed by mdr1si2631, mdr1si3071 and mdr1si1513.

**CONCLUSION:** The four siRNAs exerts similar reversal effects on multidrug resistance of both SGC7901/VCR and K562/A02 cells.

**Key Words:** Small interfering RNA; Multidrug resistance 1 gene; SGC7901/VCR cells; K562/A02 cells; Target site

Zhang M, Li YL, Gao JK, Wang GD, Gao FL. Reversal effects of siRNAs targeting different regions of the mdr1 gene on MDR of siRNA on multidrug resistance in two drug-resistant tumor cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3387-3393

## 摘要

**目的:** 探讨靶向mdr1 4个不同位点的siRNAs对胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02的作用效果.

**方法:** 设计并体外转录合成4条靶向mdr1的siRNAs(mdr1si326、mdr1si1513、mdr1si2631及mdr1si3071), 分别转染SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞, 用RT-PCR和免疫组织化学检测mdr1 mRNA与P-gp的表达, 流式细胞仪检测细胞内阿霉素(ADR)的蓄积, MTT法检测细胞对阿霉素的敏感性.

**结果:** 4条siRNAs对人胃癌细胞SGC7901/VCR mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依

## 背景资料

RNA干扰(RNAi)是21-23个核苷酸(nt)的小分子干扰RNA(siRNA)诱导细胞同源基因mRNA降解, 而特异性抑制基因表达的过程. siRNA是RNAi过程中重要的中间分子, 其的特异性是诱发RNAi的一个重要因素.

## 同行评议者

吴健雄, 教授, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤医腹部外科

**研发前沿**  
RNAi这一特异、有效的技术已应用于肿瘤多药耐药(MDR)等方面的研究。大量研究表明,靶向同一基因不同靶位点的siRNA的作用效果不同,因此有效靶位点的筛选对于RNAi的成功与否十分重要,成为一项研究热点。

次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071及mdr1si1513;对人红白血病细胞K562/A02 mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071及mdr1si1513。

**结论:** 4条siRNAs对SGC7901/VCR和K562/A02两种耐药细胞作用效果趋势相似。

**关键词:** 小干扰RNA; mdr1基因; SGC7901/VCR细胞; K56/A02细胞; 靶位点

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲. 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3387-3393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3387.asp>

## 0 引言

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是21-23个核苷酸(nucleotide, nt)的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)诱导细胞同源基因mRNA降解而特异性抑制基因表达的过程。这一特异、有效的技术已应用于肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)等方面的研究。siRNA是RNAi过程中重要的中间分子, siRNA的特异性是诱发RNAi的一个重要问题。大量研究表明, 靶向同一基因不同靶位点的siRNA的作用效果不同, 因此有效靶位点的筛选对于RNAi的成功与否十分重要。高福莲 *et al*<sup>[1]</sup>用的4条siRNA之一mdr1si326的靶序列相同于Peng *et al*<sup>[2]</sup>用的三条序列之一si-mdr1-1, 高福莲 *et al*研究显示此条siRNA转染SGC7901/VCR细胞后, mRNA表达水平、细胞内ADR蓄积和ADR耐药性逆转三方面的数据变动和转染前比较有统计学意义; Peng *et al*用此条siRNA转染K56/A02细胞后, 发现mRNA表达、P-gp表达和细胞内柔红霉素蓄积、对ADR的敏感性的转染前后数据变化无统计学意义。上述研究显示靶向同一位点siRNA的作用效果和细胞种类有关系, 靶向不同靶位点的siRNA对不同种类细胞的作用效果趋势如何, 尚未见相关报道。本研究选定并合成靶向mdr1 mRNA不同靶位点的4条siRNAs, 分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02, 用RT-PCR检测mdr1 mRNA的表达、免疫组织化学检测mdr1蛋白水平的表达、流式细胞仪检测细胞内化疗药物的蓄积、MTT法检测细胞对化疗药物的敏感性, 判断靶向不同位点的siRNAs对不同细胞作用效果的趋势有

无差别, 探讨高效靶点的通用性, 为靶点的选择提供理论资料, 也为siRNA药物研发提供依据, 具有潜在的临床应用前景。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SGC7901细胞由郑州大学基础医学院组胚教研室惠赠, SGC7901/VCR细胞由中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授惠赠, K562/A02细胞购自协和血液学研究中心, K562细胞由山东大学血研室惠赠。TRIzol试剂购自Nvitrogen公司, AMV第一链cDNA合成试剂盒和PCR扩增试剂盒均购自上海Sangon公司, DAB显色试剂盒和SABC免疫组织化学染色试剂盒(SA2002)购自武汉Boster公司, 兔抗人P-gp多克隆抗体(Mdr(H-241): sc-8313)购自Santa Cruz公司, CodeBreaker siRNA转染试剂和T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System购自美国Promega公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA的siRNA的设计和合成:** 参照高福莲<sup>[3]</sup>的研究选取的靶序列, 用T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System在体外转录分别合成4条siRNAs: mdr1si326, mdr1si1513, mdr1si2631和mdr1si3071。

**1.2.2 siRNAs沉默SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞mdr1效果的检测:** (1)细胞培养: K562/A02和SGC7901/VCR用含10%灭活小牛血清、100 kU/L链霉素、100 kU/L青霉素的RPMI 1640培养基, 置37℃、50 mL/LCO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温孵育箱中培养, 培养基中分别含1 mg/L ADR和1 mg/L VCR以维持其耐药性, 实验前2 wk停药。用CodeBreaker siRNA转染试剂, 分别将siRNAs以20 nmoL的终浓度转染SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞。实验分7组。空白对照组: 只加PBS; 转染试剂组: 转染试剂+PBS; mdr1si326组: 转染试剂+mdr1si326; mdr1si1513组: 转染试剂+mdr1si1513; mdr1si2631组: 转染试剂+mdr1si2631; mdr1si3071组: 转染试剂+mdr1si3071; SGC7901或K562组(亲本组): SGC7901细胞或K562细胞+PBS。 (2)RT-PCR: 用TRIzol试剂按说明书提取转染48h后的细胞总RNA, 测定RNA的纯度和浓度, 判定RNA的完整性。取总RNA 4.5 μg, 用AMV第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA。mdr1引物上游序列为5'-tgactaccaggctcgccaatgat-3', 下游为5'-tgtgccacc aagtaggctccaaa-3', 扩增片段跨越3个内含子, 产



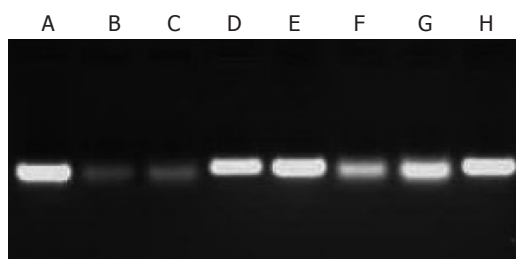


图 1 mdr1si326、mdr1si1513琼脂糖凝胶电泳. A, D: 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L mdr1si326; B: 1.5  $\mu$ L mdr1si326; C: 2.0  $\mu$ L mdr1si326; E, H: mdr1si1513模板; F: 1.5  $\mu$ L mdr1si1513; G: 2.0  $\mu$ L mdr1si1513.

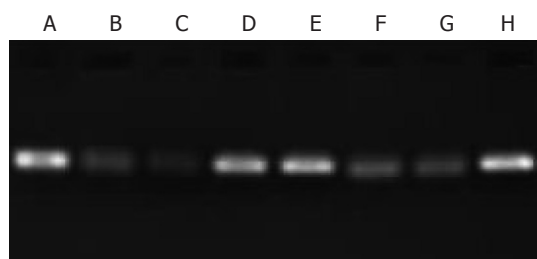


图 2 mdr1si2631、mdr1si3071琼脂糖凝胶电泳. A, D: 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L mdr1si326; B: 1.5  $\mu$ L mdr1si2631; C: 1.0  $\mu$ L mdr1si2631; E, H: mdr1si1513模板; F: 1.5  $\mu$ L mdr1si3071; G: 1.0  $\mu$ L mdr1si3071.

**创新盘点**  
本研究利用RNAi技术, 探讨靶向不同位点的siRNAs对胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02作用效果的趋势。

物457 bp;  $\beta$ -actin引物上游序列为5'-tcctgtggcatc cagcaact-3', 下游为5'-gaagcatttgccgtggacgat-3', 产物314 bp<sup>[3]</sup>. 取5  $\mu$ L cDNA, 用PCR扩增试剂盒进行PCR, 目的和内参片段同管扩增. 以pUC19 DNA/Msp I 作参照, PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 以mdr1和 $\beta$ -actin的比值进行mdr1基因mRNA表达水平的半定量分析. (3)免疫组织化学: 收取转染96 h后的SGC7901/VCR和K562/A02细胞, 细胞涂片, 采用SABC法检测P-gp的表达, 以PBS代替兔抗人P-gp多克隆抗体作阴性对照, 用已知P-gp阳性表达的结肠癌组织作阳性对照, 步骤严格按说明书进行. P-gp免疫组织化学阳性位于细胞膜, 呈棕黄色. 用彩色病理图文分析系统, 对结果进行定量分析. (4)FCM检测细胞内ADR蓄积: 转染72 h后的SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞换用含10 mg/L ADR的RPMI 1640培养液, 作用90 min, 收取细胞行流式细胞仪检测, 激发波长为488 nm, 接受波长为575 nm; 同时设PBS取代ADR的同种细胞为空白对照. 每次检测细胞 $(1-2) \times 10^5$ 个. 用ADR特异荧光阳性强度和特异荧光阳性率代表细胞内ADR蓄积量. (5)MTT法检测细胞对化疗药的敏感性: SGC7901/VCR细胞于转染48 h后收获, 并调节细胞密度至 $5 \times 10^8$ /L, 加200  $\mu$ L/孔入96孔培养板培养24 h后, 加入终浓度分别为1.65、3.3、33、330、660 mg/L的ADR<sup>[3]</sup>, 继续培养48 h, 按常规方法依次加入MTT和二甲基亚砜, 用酶标仪测定各孔的吸光度 $A_{570}$ . K562/A02细胞于转染72 h后收获, 调节细胞密度至 $5 \times 10^8$ /L, 加90  $\mu$ L/孔入于96孔培养板, 同时加入浓度为0.01、0.1、1、10和100 mg/L的ADR<sup>[2]</sup>, 培养48 h, 按改良MTT方法<sup>[4]</sup>依次加入MTT、三联液(10% SDS, 5%异丁醇, 0.012 mol/L HCL)100  $\mu$ L/孔, 于37℃放置过夜, 用酶标仪测定各孔的吸光度 $A_{570}$ . 每种药物浓度接种3个复孔, 设立只加PBS的细胞对照

和无细胞的试剂对照. 用对照组和药物组 $A_{570}$ 分别减去试剂组 $A_{570}$ , 得出校正对照组和药物组 $A_{570}$ , 计算存活率(校正药物组 $A_{570}$ /校正对照组 $A_{570}$ ). 用Origin 7.0软件, 绘制剂量生存曲线, 求出肿瘤细胞对ADR的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), 计算相对逆转率. 相对逆转率 =  $(IC_{50}A - IC_{50}B) / (IC_{50}A - IC_{50}C) \times 100\%$ , 其中 $IC_{50}A$ 为空白对照组耐药细胞,  $IC_{50}B$ 为转染siRNA组耐药细胞,  $IC_{50}C$ 为亲本细胞.

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计软件进行统计学处理, 计量数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两样本均数的比较用 $t$ 检验, 多样本均数的比较采用方差分析, 方差不齐时进行变量转换. 计数资料计算阳性率, 阳性率的比较用 $\chi^2$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 体外转录合成siRNA** 以合成siRNAs的DNA模板为参照, 用2.5%琼脂糖凝胶进行合成siRNAs电泳的结果显示, 尽管合成的siRNAs相对分子质量较DNA模板小使泳动速度快, 但同分子量RNA在琼脂糖凝胶的电泳速度慢于DNA, 而使合成的siRNAs和DNA模板的距离拉开不大; 合成siRNAs的大小与设计相符, 浓度有别(图1-2).

**2.2 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞mdr1 mRNA表达的影响** siRNAs转染48 h后, SGC7901/VCR细胞mdr1 mRNA表达水平在mdr1si2631组的下降最明显, mdr1si326组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si1513组和mdr1si3071组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si1513组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ ). siRNAs转染48 h后, K562/A02细胞mdr1 mRNA表达水平在mdr1si326组下降最明显, mdr1si1513组其次, mdr1si3071组下降最少; 4组之间的差别有统计

## 应用要点

本研究显示,靶向不同位点的siRNAs对两种耐药细胞作用效果趋势相似,为靶点的选择提供理论资料,也为siRNA药物研发提供依据。

表 1 4条siRNAs对SGC7901/VCR和K562/A02细胞mdr1 mRNA和P-gp表达以及对ADR蓄积的影响

| 分组         | 灰度比值(mean ± SD)          |                          | 积分吸光度(mean ± SD)            |                            | 阳性率(%)            |                    |
|------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|
|            | SGC7901/VCR              | K562/A02                 | SGC7901/VCR                 | K562/A02                   | SGC7901/VCR       | K562/A02           |
| 空白对照       | 1.27 ± 0.06 <sup>a</sup> | 1.54 ± 0.03 <sup>a</sup> | 150.19 ± 22.89 <sup>a</sup> | 34.82 ± 11.31 <sup>a</sup> | 0.13 <sup>a</sup> | 23.47 <sup>a</sup> |
| 转染试剂       | 1.23 ± 0.04              | 1.55 ± 0.01              | 138.87 ± 68.76              | 38.27 ± 9.21               | 0.16              | 27.15              |
| mdr1si326  | 1.06 ± 0.02              | 1.07 ± 0.02              | 45.76 ± 9.31                | 8.06 ± 4.76                | 0.25              | 35.17              |
| mdr1si1513 | 1.18 ± 0.08              | 1.28 ± 0.02              | 99.26 ± 24.23               | 17.41 ± 2.86               | 0.16              | 29.20              |
| mdr1si2631 | 0.86 ± 0.03              | 1.37 ± 0.03              | 70.50 ± 6.11                | 17.01 ± 3.17               | 1.40              | 34.26              |
| mdr1si3071 | 1.17 ± 0.06              | 1.50 ± 0.03              | 65.81 ± 5.73                | 23.40 ± 4.86               | 0.32              | 28.95              |
| 亲本         |                          |                          |                             |                            | 7.65 <sup>a</sup> | 36.90 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 各siRNA实验组。

表 2 4条siRNAs转染72 h后SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞对ADR的敏感性

| 分组         | SGC7901/VCR                  |          | K562/A02                     |          |
|------------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
|            | IC <sub>50</sub> (mean ± SD) | 相对逆转率(%) | IC <sub>50</sub> (mean ± SD) | 相对逆转率(%) |
| 空白对照       | 344.21 ± 54.82 <sup>a</sup>  |          | 8.38 ± 1.86 <sup>a</sup>     |          |
| 转染试剂       | 345.54 ± 37.94               |          | 7.50 ± 2.39                  |          |
| mdr1si326  | 92.95 ± 9.58                 | 74.09    | 0.85 ± 0.06                  | 90.61    |
| mdr1si1513 | 66.15 ± 4.08                 | 81.99    | 3.87 ± 0.88                  | 54.27    |
| mdr1si2631 | 217.69 ± 48.38               | 37.31    | 0.37 ± 0.12                  | 96.39    |
| mdr1si3071 | 133.65 ± 42.50               | 62.09    | 1.29 ± 0.18                  | 85.32    |
| 亲本         | 5.09 ± 3.14                  |          | 0.07 ± 0.02                  |          |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs siRNA实验组。

学意义( $P < 0.05$ , 表1)。

2.3 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞P-gp表达的影响 siRNAs转染96 h后, SGC7901/VCR细胞的P-gp表达水平在mdr1si326组下降最明显, mdr1si2631组和mdr1si3071组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si1513组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si2631组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。siRNAs转染96 h后, K562/A02细胞的P-gp表达水平在mdr1si326组的下降最明显, mdr1si1513和mdr1si2631组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si3071组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si1513和mdr1si2631组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

2.4 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞内ADR蓄积的影响 siRNAs转染72 h后, SGC7901/VCR细胞内ADR特异荧光阳性率在mdr1si2631组最高, mdr1si326组和mdr1si3071组次之( $P < 0.05$ ); mdr1si326组和mdr1si3071组两组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。siRNAs转染72 h后, K562/A02细胞内ADR特异荧光阳性率在mdr1si326组最高, mdr1si2631组次之( $P < 0.05$ ),

mdr1si1513和mdr1si3071组最小( $P < 0.05$ ); mdr1si1513和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

2.5 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞对ADR敏感性的影响 siRNAs转染72 h后, SGC7901/VCR细胞对ADR的IC<sub>50</sub>在mdr1si1513组的变动最大, mdr1si326组和mdr1si3071组次之, mdr1si2631组变动最小; mdr1si326组和mdr1si3071组之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 其他组之间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。siRNAs转染72 h后, K562/A02细胞对ADR的IC<sub>50</sub>在mdr1si1513组变动最小, mdr1si326组、mdr1si2631组和mdr1si3071组减少显著( $P < 0.05$ ); mdr1si326组、mdr1si2631组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ ), 与亲本之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表2)。综合mdr1 mRNA和P-gp表达, P-gp功能以及对ADR耐药逆转程度4方面结果: 对人胃癌细胞SGC7901/VCR mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513; 对人红白血病细胞

K562/A02 mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513.

### 3 讨论

2001年Elbashir *et al*<sup>[5]</sup>首次报道siRNA在多种哺乳动物体细胞系内成功抑制特异基因表达后, RNAi能否用于人类疾病治疗引起研究者兴趣. 近年来, 国内外大量研究表明siRNA的作用效果与靶位点密切相关, 靶向不同靶位点的siRNA作用效果不同. 许可慰 *et al*<sup>[6]</sup>用3条siRNAs靶向沉默人膀胱癌细胞株T24的*bcl-2*基因, 研究发现, 其中pGenesil-12042的抑制效果最好. 潘修成 *et al*<sup>[7]</sup>针对HBV C基因序列设计5个siRNA靶位, 其中, 以SEC-492i的RNAi效率最高而SEC-282i相对较差. 赵刚 *et al*<sup>[8]</sup>合成靶向幽门螺杆菌(*H pylori*)*vacA*基因的5对siRNAs, 结果*vacA*-s2和*vacA*-s4的抑制作用最大. 王春光 *et al*<sup>[9]</sup>用载体介导的3条siRNAs转染Lewis肺癌细胞, 结果Psilencer2•1-U6-siRNA-stat3-2对Lewis肺癌细胞中STAT3基因表达的抑制作用最强. 在siRNA逆转mdr1介导的MDR的研究中, Pichler *et al*<sup>[10]</sup>证明针对8个靶位点所设计的siRNAs中, 只有第1条和第7条对降低mdr1 mRNA和P-gp表达水平以及逆转MDR表型有效. 在高福莲 *et al*<sup>[11]</sup>的实验中, 针对胃癌SGC7901/VCR细胞mdr1 4段靶位点所设计的4条siRNAs中, mdr1si326的逆转效果最好, 并且研究提示: 在siRNA靶序列设计和选择中, 除了遵守Tuschl *et al*的设计原则外, 还应考虑靶序列的位置、靶序列结构、siRNA的正义链5'和3'末端碱基的种类, 尤其是靶序列结构, 尽可能选择自身无成茎和成环现象、靶序列和靶序列外碱基配对和氢键的数量最少的部位. 赵澎 *et al*<sup>[11]</sup>针对神经胶质瘤耐药细胞系BT325的mdr1基因所设计的3条短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)中MDR1A和MDR1B对MDR的逆转作用较强; Chen *et al*<sup>[12]</sup>在肝癌细胞HepG2/ADM中转染的2条shRNA中, pGenSil-1/MDRB抑制了P-gp的表达, 而pGenSil-1/MDRA却不起作用; 在Gan *et al*<sup>[13]</sup>的实验中2条shRNAs均能降低乳腺癌耐药细胞MCF7/AdrR mdr1 mRNA和P-gp表达水平并逆转MDR表型, 2条shRNA对MDR表型效果明显不同, 但对降低mdr1 mRNA和P-gp表达水平的效果却无显著差异. Klosek *et al*<sup>[14]</sup>研究显示: 靶向Stat3不同位点的10条siRNAs, 对Stat3表达抑制效果不

同, 10 nmol/L的siRNAs对Stat3表达抑制范围为21%-67%, 1 nmol/L的siRNAs对Stat3表达抑制范围为13%-73%. 对于靶向同一基因不同靶位点的siRNA作用效果不同的现象, Luo *et al*<sup>[15]</sup>试图通过试验证明这种“位点效应”是否主要与靶位点mRNA的二级结构有关. 对此他们提出了“氢键指数(H-bond index)”-在靶位点和mRNA其他位点之间形成的平均氢键数, 并应用计算机方法, 检测Bcl-2, hTF, 和cyclin B1这3种基因的氢键指数, 发现氢键指数与siRNA的效果呈反比, 证明了“位点效应”主要与靶位点mRNA的二级结构有关, 并建议在将来siRNA的设计中参考氢键指数. 本实验选定<sup>[3]</sup>并合成了4条siRNAs, 转染后SGC7901/VCR和K562/A02细胞的mdr1 mRNA和P-gp的表达水平降低, 细胞内ADR蓄积增加, 细胞对ADR的敏感性增加, 提示4条siRNAs均能逆转SGC7901/VCR和K562/A02细胞的MDR. 本研究显示, 在SGC7901/VCR和K562/A02R细胞中, 4条siRNAs的作用效果均不同, 并且都是mdr1si326的逆转效果最强, mdr1si1513的作用最差. 这进一步验证了siRNA的作用效果的“位点效应”.

靶向同一靶序列的siRNA在不同细胞中作用效果不同, siRNA的作用效果与细胞种类密切相关. 张汝钢 *et al*<sup>[16]</sup>研究人端粒酶逆转录酶(hTERT)RNAi对2种肝癌细胞HepG2、SMMC-7221的影响, 将载体介导的siRNA转染2种细胞, 在2种细胞中的抑制效果不同: 2种细胞的老化率分别由0、3.6%增加到20.4%、10.0%, 凋亡率分别由3.5%、4.8%增加到5.2%、7.9%. 孙延霞<sup>[17]</sup>用RNAi沉默胃癌细胞SGC7901的Survivin基因, 所用的Survivin2(166-185)和汤建光 *et al*<sup>[18]</sup>所用的pBSHH1-S(166-184)靶位点仅有1个碱基之差, 抑制效果却不相同: Survivin2和pBSHH1-S对Survivin mRNA表达的抑制率分别为69.24%和74%, 对Survivin蛋白表达的抑制率分别为58.17%和82%. 在siRNA逆转MDR的大量实验中, 高福莲<sup>[3]</sup>用的4条siRNAs之一mdr1si326相同于Peng *et al*<sup>[2]</sup>用的3条序列之一si-mdr1-1, 高福莲研究显示此条siRNA转染后, SGC7901/VCR细胞mRNA表达水平、细胞内ADR积累和ADR耐药逆转3方面的数据变动和转染前比较有统计学意义, Peng *et al*研究显示此条siRNA转染后, K562/A02细胞mRNA表达水平、细胞内DAM积累和ADR耐药性逆转3方面的数据变动和转染前比较无统计学意义; Nieth

**名词解释**  
小分子干扰RNA(siRNA): 是一种小RNA分子(21-23核苷酸), 由Dicer(RNAase家族中对双链RNA具有特异性的酶)加工而成. siRNA是siRISC的主要成员, 激发与之互补的目标mRNA的沉默.



**同行评价**  
本研究紧随目前  
肿瘤药物治疗的  
前沿理念,讨论了  
靶向治疗中的关  
键问题,对于深入  
研究靶向治疗有  
很好的借鉴意义。

*et al*<sup>[19]</sup>实验显示相同的mdr1 siRNA同时转染胰腺癌细胞(EPP85-181RDB)和胃癌细胞(EPG85-257RDB)时,2种细胞对柔红霉素的耐药性分别降低89%和58%;Chen *et al*<sup>[12]</sup>实验中所选用的pGenSil-1/MDR-A与Yagüe *et al*<sup>[20]</sup>逆转白血病耐药细胞KD30 MDR实验中所2条shRNAs中的1条相同,在Yagüe *et al*的实验中此条shRNA的RNAi作用显著,在Chen *et al*<sup>[12]</sup>的实验中对肝癌细胞HepG2/ADM却不起作用。本实验以靶向mdr1不同靶位点的4条siRNAs,分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02。本研究显示,转染mdr1si2631 72 h后,SGC7901/VCR细胞内ADR荧光阳性率由0.13%增加至1.40%,耐药相对逆转率达37.31%;K562/A02细胞内ADR荧光阳性率由23.47%增加至34.26%,耐药相对逆转率达96.39%。本研究进一步验证了siRNA的作用效果与细胞种类有关。

孙延霞<sup>[17]</sup>用载体介导的siRNA-Survivin1和siRNA-Survivin2沉默Survivin基因在人胃癌细胞SGC7901和人白血病细胞K562的表达,结果siRNA-Survivin1具有抑制人胃癌细胞SGC7901增殖活性的作用,siRNA-Survivin2对细胞的抑制作用较弱;在siRNA-Survivin-1作用下,Survivin蛋白表达明显减少(Survivin/ $\beta$ -actin灰度比为0.21),抑制率为78.25%,在siRNA-Survivin-2作用下,Survivin蛋白表达也有所减少(Survivin/ $\beta$ -actin灰度比为0.58),抑制率为42%。总体来讲,在人胃癌细胞SGC7901和人白血病细胞K562中均是siRNA-Survivin1的抑制作用较强。Xu *et al*<sup>[21]</sup>以scAAV vector(Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus Vector)介导的2条siRNAs AAV-siMDR28mer和AAV-siMDR25mer转染人乳腺癌细胞NCI/ADR-RES和口腔癌细胞KB-C1,均能降低2种细胞P-gp表达,并逆转耐药表型,同研究表明scAAV vector介导的siRNA的抑制作用具有剂量和时间依赖性,但是未研究2条siRNAs的抑制作用是否有差别。Lu *et al*<sup>[22]</sup>为了研究前列腺肿瘤诱导基因1(prostate tumor-inducing gene 1, PTI-1)在人类前列腺癌中的作用,构建了载体介导的3条siRNAs pSlencer3.1-neo-Yu Lei[YL]1-2, -YL3-4 and -YL5-6,分别转染人前列腺癌细胞DU145和PC3,研究表明,仅siRNA pSlencer3.1-neo-YL1-2可以几乎完全抑制PTI-1在两种细胞中的表达,并可以阻止2种前列腺癌细胞的生长,而且在2种细胞的作用效果相似。

靶向同一基因不同靶位点的siRNA在不同细胞中作用效果的趋势如何尚未见报道。本实验针对高福莲 *et al*<sup>[1]</sup>和Peng *et al*<sup>[2]</sup>的研究,为探讨靶向mdr1不同靶位点的siRNAs对不同细胞作用效果的趋势如何,设计靶向mdr1 mRNA不同靶位点的4条siRNAs,分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02,用RT-PCR检测mdr1 mRNA的表达、免疫组织化学检测mdr1蛋白水平的表达、流式细胞仪检测细胞内化疗药物的蓄积量、MTT法检测细胞对ADR的敏感性。综合mdr1 mRNA、P-gp表达以及P-gp功能和对ADR耐药逆转程度4方面结果显示,对SGC7901/VCR细胞mdr1介导MDR逆转效果由高到低的siRNAs依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513,这与高福莲<sup>[3]</sup>的实验结果相一致;对K562/A02细胞mdr1介导MDR逆转效果由高到低的siRNAs依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513。针对同一基因不同靶位点的4条siRNAs在2种肿瘤耐药细胞SGC7901/VCR和K562/A02中作用效果的趋势相似。

#### 4 参考文献

- 1 高福莲, 朱晓燕, 王峰, 吴景兰, 张钦宪. siRNA对SGC7901/VCR细胞mdr1基因沉默效果的影响因素分析. 肿瘤防治研究 2006; 33: 151-155
- 2 Peng Z, Xiao ZJ, Wang Y, Liu P, Cai YL, Feng WL, Han ZC. [Reversal of multi-drug resistance in K562/A02 cells by small interference RNA of mdr1 gene] *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2004; 25: 5-7
- 3 高福莲. siRNA逆转人胃癌细胞mdr1介导的多药耐药. 郑州: 郑州大学, 2006: 5-6
- 4 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 杨蔚怡. 评价抗癌物质活性的改良MTT方法. 中国医药工业杂志 1993; 24: 455-457
- 5 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 6 许可慰, 黄健, 林天歆, 郭正辉, 胡明, 尹心宝, 潘秋辉. RNAi技术沉默Bcl-2基因对人膀胱癌细胞株T24增殖影响的研究. 中华泌尿外科杂志 2007; 28: 26-29
- 7 潘修成, 陈智, 倪勤, 羊正纲, 徐宁, 金晗英. tRNA-(val)-shRNA表达框在筛选HBV C基因小干扰RNA靶位中的应用. 浙江大学学报(医学版) 2006; 35: 154-160
- 8 赵刚, 詹文华, 严燕国, 马晋平, 彭俊生, 董文广, 蔡世荣, 何裕隆. 靶向siRNA抑制幽门螺杆菌vacA表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 470-475
- 9 王春光, 孙梅, 王荣有, 赵雪俭, 张兴义. RNAi沉默STAT3基因表达对Lewis肺癌细胞生长影响的实验研究. 中国老年学杂志 2006; 26: 210-213
- 10 Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnicka-Worms D. In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4487-4494
- 11 赵澎, 胡微, 张亚卓, 孙梅珍, 何乐. RNA干扰技术逆转神经胶质瘤细胞多药耐药性. 中华肿瘤杂志 2006; 28:

- 183-187
- 12 Chen XP, Wang Q, Guan J, Huang ZY, Zhang WG, Zhang BX. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3332-3337
- 13 Gan HZ, Zhang GZ, Zhao JS, Zhang FC, Bu LS, Yang SJ, Piao SL, Du ZW, Gao S, Zheng DM. Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance using short hairpin RNA expression vectors. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 893-902
- 14 Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, Goda H, Hamakawa H. Stat3 as a molecular target in RNA interference-based treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 20: 873-878
- 15 Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 303-310
- 16 张汝钢, 房殿春, 罗元辉, 郭丽萍. 人端粒酶逆转录酶干扰对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导肝癌细胞凋亡的影响. *中华肝病杂志* 2006; 14: 435-440
- 17 孙延霞. RNAi沉默survivin基因对胃癌及白血病细胞生长的抑制作用. 长春: 吉林大学, 2006: 31
- 18 汤建光, 唐北沙, 谭利明, 张玉虎, 曹立, 江泓. 质粒介导的RNAi对神经母细胞瘤细胞Survivin基因表达的抑制作用. *中国医师杂志* 2005; 17: 748-750
- 19 Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003; 545: 144-150
- 20 Yagüe E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther* 2004; 11: 1170-1174
- 21 Xu D, McCarty D, Fernandes A, Fisher M, Samulski RJ, Juliano RL. Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Ther* 2005; 11: 523-530
- 22 Lu PY, Xie FY, Woodle MC. siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 225-234

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 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 2009-11-28)

# 饮食调整对非酒精性脂肪肝病的治疗作用及机制

谭莺, 陈金虎, 张佳妮, 王利娟, 刘慧霞

**背景资料**  
研究表明, 高脂饮食是NAFLD发病的危险因素, 可导致肥胖及IR, 而IR是NAFLD发病的关键环节。因而肥胖、IR和NAFLD之间关系密切。通过饮食疗法来减轻肥胖及IR能有效地改善NAFLD, 但具体机制尚未完全阐明。

谭莺, 陈金虎, 张佳妮, 王利娟, 刘慧霞, 中南大学湘雅医院老年病科 湖南省长沙市 410008  
谭莺, 中南大学湘雅医院临床医学专业在读博士, 主要从事代谢综合征及相关疾病的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30670945  
作者贡献分布: 谭莺与刘慧霞对此文所作贡献均等; 此课题由谭莺、陈金虎及刘慧霞共同设计; 实验流程操作由谭莺、陈金虎、张佳妮及王利娟完成; 数据分析由谭莺与刘慧霞完成; 本文写作由谭莺与刘慧霞完成。  
通讯作者: 刘慧霞, 教授, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院老年病科. lhx900@yahoo.com.cn  
电话: 0731-84327652 传真: 0731-84327652  
收稿日期: 2009-09-28 修回日期: 2009-11-02  
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Therapeutic effects of diet change on nonalcoholic fatty liver disease

Ying Tan, Jin-Hu Chen, Jia-Ni Zhang, Li-Juan Wang, Hui-Xia Liu

Ying Tan, Jin-Hu Chen, Jia-Ni Zhang, Li-Juan Wang, Hui-Xia Liu, Department of Geriatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670945

Correspondence to: Professor Hui-Xia Liu, Department of Geriatrics, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. lhx900@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-28 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic effects of diet change on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and explore potential mechanisms involved.

**METHODS:** Eighty Sprague-Dawley male rats were randomly and equally divided into five groups: two normal control groups (NG8 and NG12 groups; fed a normal diet for 8 and 12 weeks, respectively), two high-fat diet groups (HG8 and HG12 groups; fed a high-fat diet for 8 and 12 weeks, respectively), and one diet change group (DG group; fed a high-fat diet for 8 weeks and a normal diet for another 4 weeks). The glucose infusion rate (GIR) was detected by the euglycemic hyperinsulinemic clamp test. The levels of ALT, AST, TG, TC, FFAs, FBS, FIns, TNF- $\alpha$ ,

SOD and MDA in the serum or liver were tested using a biochemistry automatic analyzer or by radioimmunoassay (RIA). The expression of c-Jun N-terminal protein kinase 1 (JNK1), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and phospho-IRS-1 Ser307 (p-IRS-1<sup>Ser307</sup>) was detected by Western blot.

**RESULTS:** Compared with the two matched NG groups, the body weight, liver index, the levels of ALT, AST, TG, TC, FFAs, FIns and TNF- $\alpha$  in the serum and TG, TC, FFAs and MDA in the liver increased (all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ), the level of SOD in the liver and GIR decreased ( $t = 4.88$  and  $7.92$ , respectively; both  $P < 0.05$ ), and the expression of JNK1 protein and p-IRS-1<sup>Ser307</sup> in the liver was upregulated in the two HG groups ( $t = 4.39$ ,  $5.81$ ;  $4.60$ , and  $6.48$ , respectively). Significant differences were also noted in the above parameters between the HG8 and HG12 groups (all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). A positive correlation was found between the expression intensity of JNK1 and insulin resistance (IR). The fatty degeneration of hepatocytes was aggravated in the HG groups with the prolongation of feeding time. In the DG group, all the above parameters were improved but did not return to normal levels as those in the NG groups (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** A rat model of NAFLD and a rat model of NASH are established by feeding rats a high-fat diet for 8 weeks and 12 weeks, respectively. Diet change can improve NAFLD induced by a high fat diet.

**Key Words:** c-Jun N-terminal kinase; Nonalcoholic fatty liver disease; Insulin resistance; High-fat diet; Diet change

Tan Y, Chen JH, Zhang JN, Wang LJ, Liu HX. Therapeutic effects of diet change on nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3394-3401

## 摘要

**目的:** 观察饮食调整对SD大鼠非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的治疗作用, 并探讨其作用机制。

**方法:** SD大鼠, ♂, 80只, 随机分为8 wk对

**同行评议者**  
宣世英, 教授, 山东省青岛市立医院肝病内科



照组(NG 8 wk组)、12 wk对照组(NG 12 wk组)、8 wk高脂组(HG 8 wk组)、12 wk高脂组(HG 12 wk组)及饮食调整组(DG组)各16只。NG组喂饲普通饲料, HG组喂饲高脂饲料, DG组喂饲高脂饲料, 8 wk后改普通饲料继续喂饲4 wk。正糖高胰岛素钳夹实验检测葡萄糖输注率(GIR), 放射免疫法和生化法检测血清及肝匀浆生化指标; Western blot检测肝组织c-jun氨基末端激酶(JNK)1、胰岛素受体底物-1(IRS-1)、胰岛素受体底物-1丝氨酸307磷酸化(phospho-IRS-1<sup>Ser307</sup>, p-IRS-1<sup>Ser307</sup>)的表达。

结果: HG组与同期NG组大鼠比较, 体质量、肝指数、血清ALT、AST、TG、TC、FFAs、FIns、TNF- $\alpha$ 及肝匀浆TG、TC、FFAs、MDA均明显升高( $P<0.05$ 或 $0.01$ ), 肝匀浆SOD降低( $t=4.88, 7.92$ ); GIR降低(均 $P<0.05$ ); 肝组织JNK1蛋白表达、p-IRS1<sup>Ser307</sup>水平增高( $t=4.39, 5.81; 4.60, 6.48$ ), JNK1蛋白表达强度与胰岛素抵抗呈正相关; HG 12 wk组和HG 8 wk组大鼠上述各项指标比较, 差异均具有统计学意义( $P<0.05$ 或 $0.01$ ); 随着喂养时间的延长, HG组大鼠肝细胞脂肪变性明显加重; 而DG组大鼠的上述各项指标均得到明显改善, 但仍未达到同期NG组大鼠水平(均 $P<0.05$ )。

结论: 高脂饮食喂养8 wk及12 wk分别能够构建SD大鼠NAFLD及NASH模型, 仅恢复正常饮食对于高脂饮食诱导的NAFLD有一定的治疗作用。

关键词: c-Jun氨基末端激酶; 非酒精性脂肪肝病; 胰岛素抵抗; 高脂饮食; 饮食调整

谭莺, 陈金虎, 张佳妮, 王利娟, 刘慧霞. 饮食调整对非酒精性脂肪肝病的治疗作用及机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3394-3401

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3394.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)目前已经成为全球最常见的慢性肝病之一<sup>[1-2]</sup>。NAFLD的流行与肥胖症患病率的上升密切相关, 肥胖可引起胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 而IR是NAFLD发病机制的中心环节, 因而肥胖、IR和NAFLD之间关系密切<sup>[3-4]</sup>。近年来研究发现, c-jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在肥胖引起的IR中起重要作用, 但JNK信号通路如何导致IR及NAFLD的发生发展确切机制不明<sup>[5-6]</sup>。

高脂饮食等摄入热量过多的不良饮食方式容易导致肥胖、IR及NAFLD<sup>[7-8]</sup>, 而通过饮食疗法来减轻肥胖及IR能有效地改善NAFLD, 但具体机制尚未完全阐明<sup>[9-11]</sup>。尽管限制热量摄入的饮食疗法是有效的, 但目前尚无明确的饮食疗法方案确立, 研究表明, 过度限制热量摄入的饥饿疗法虽然减质量的疗效明显, 但却会加重NAFLD甚至进展为肝纤维化<sup>[12]</sup>; 而节食对于大多数患者来说难以坚持, 因而目前需要一种缓和、安全有效的饮食方案来改善NAFLD。本研究通过喂饲SD大鼠高脂饮食构建NAFLD模型后, 提高脂饮食为正常饮食的方法, 观察饮食调整对NAFLD的治疗作用并探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠80只, 体质量150-180 g, 由中南大学实验动物学部提供。凯基全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Sigma公司)、JNK1小鼠IgG mAb、胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)小鼠mAb、胰岛素受体底物1丝氨酸307磷酸化(phospho-IRS-1<sup>Ser307</sup>, p-IRS-1<sup>Ser307</sup>)兔多克隆抗体及驴抗鼠二抗、驴抗兔二抗(美国Santa Cruz公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立: 实验动物普通饲料适应性喂养1 wk后将SD大鼠随机分为正常饮食组(NG组)32只和高脂饮食组(HG组)48只, NG组喂饲普通饲料, 其成分如下(按100 g计): 玉米粉32 g、小麦麸15 g、大豆粉15 g、芝麻饼10 g、面粉15 g、鸡蛋5 g、骨粉2 g、酵母粉2 g、食盐1 g、植物油1 g、奶粉2 g、复合维生素0.03 g; HG组喂饲高脂饲料, 为普通饲料加2%胆固醇和14%猪油, 2种饲料均为中南大学实验动物中心配制<sup>[13]</sup>。8 wk末随机从2组中各抽取8只行正糖高胰岛素钳夹实验技术<sup>[14]</sup>(简称钳夹技术)、另各抽取8只留取标本做相关指标检测, 称为8 wk对照组(NG 8 wk组)和8 wk高脂组(HG 8 wk组); 余下的NG组继续普通饲料喂养4 wk称为12 wk对照组(NG 12 wk组), 其余HG组再随机分为12 wk高脂组(HG 12 wk组)和饮食调整组(DG组)各16只, HG 12 wk组继续高脂喂养, DG组改以普通饲料喂养, 均持续4 wk。于第12周末将各组大鼠取8只行钳夹技术, 另各抽取8只留取标本做相关指标检测。

1.2.2 血清及肝匀浆生化指标检测: 空腹血

## 研究前沿

目前NAFLD尚无有效的治疗方法, 去脂药物治疗周期长, 不良反应大且费用高。饮食治疗和运动结合能有效改善NAFLD, 但对于现代人来说, 节食和长期运动都难以坚持, 而且节食过度的饥饿疗法又缺乏一定的安全性。故如何开展NAFLD的治疗成为亟待解决的问题。

### 相关报道

Houstis *et al* 研究表明TNF- $\alpha$ 、FFAs、氧化应激反应均可以诱导IR, 他们可以特异性的激活JNK信号通路, 增加IRS-1的丝氨酸磷酸化, 抑制酪氨酸磷酸化来减弱IRS-1的活性, 从而导致IR. 目前认为, JNK1在肥胖及IR的发生发展中起着重要作用.

表 1 各组SD大鼠体重、肝指数 ( $n = 8$ )

| 分组        | 体质量(g)                           | 肝指数                           |
|-----------|----------------------------------|-------------------------------|
| NG 8 wk组  | 370.38 $\pm$ 27.22               | 2.25 $\pm$ 0.25               |
| NG 12 wk组 | 393.50 $\pm$ 27.49               | 2.35 $\pm$ 0.26               |
| HG 8 wk组  | 443.00 $\pm$ 21.71 <sup>d</sup>  | 2.83 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>  |
| HG 12 wk组 | 513.00 $\pm$ 32.63 <sup>bd</sup> | 3.54 $\pm$ 0.37 <sup>bd</sup> |
| DG组       | 453.50 $\pm$ 35.42 <sup>de</sup> | 2.74 $\pm$ 0.17 <sup>de</sup> |

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HG 8 wk组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 同期NG组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs HG 12 wk组.

糖(fasting blood sugar, FBS)、谷丙转氨酶(aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)均使用全自动生化分析仪检测. 空腹胰岛素(fast insulin, FIns)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测采用放射免疫法由全自动放射免疫 $\gamma$ 测量仪测定. 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)采用全波长分光光度计测定.

1.2.3 病理学检查: 部分新鲜肝组织以甲醛溶液固定, 制备冰冻切片及石蜡切片, 采用苏丹IV染色及HE染色. 判断肝脏脂肪变性程度分(-)-(++++ )4个等级和慢性肝炎组织学活动指数(HAI)进行评价<sup>[15-16]</sup>.

1.2.4 钳夹技术: 采用评价IR的金标准钳夹技术评价胰岛素敏感性: 大鼠均禁食过夜12 h, 用戊巴比妥钠1 mg/kg体质量腹腔注射麻醉后, 进行颈动脉和颈静脉插管并留置. 胰岛素、葡萄糖分别用2个微电脑数字式微量泵由颈静脉泵入, 血液标本由颈动脉导管获取. 胰岛素输注率为10.0 mU/(kg $\cdot$ min), 从颈动脉取血, 用微型血糖仪检测血糖值, 维持稳态血糖在(基础血糖值 $\pm$ 0.5)mmol/L的范围内, 持续上述过程达2 h完成. 钳夹实验结束后, 计算灌注2 h的葡萄糖输注率(GIR), 判断大鼠的胰岛素敏感性.

1.2.5 Western blot分析: 肝右叶组织100 mg, 4 $^{\circ}$ C匀浆后提取胞质蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 蛋白变性后, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h, 分别加入JNK1抗体(1:500)、IRS-1抗体(1:100)、p-IRS-1<sup>Ser307</sup>抗体(1:100)室温作用2 h, 洗涤后加入辣根过氧化酶结合的抗鼠IgG(1:4000)或抗兔IgG(1:5000), 作用1 h再洗膜. 然后化学发光试

剂检测, X光片显影. 定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各目的带灰度积分值, 所测结果为扣除背景的积分吸光度.

**统计学处理** 计量资料均以mean $\pm$ SD表示, 两组间比较, 如数据符合正态分布采用 $t$ 检验, 如符合偏态分布则采用秩和检验, 相关分析用秩相关,  $P < 0.05$ 认为有统计学意义. 采用SPSS14.0统计软件进行数据处理分析.

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况、体质量及肝指数的变化 实验过程中各组大鼠均无死亡发生. 与同期NG组比较, HG组大鼠性情温顺, 不喜动, 毛发蓬乱无光泽, 大便稀软次数少; 体质量( $t$ 值: 5.90、7.92), 肝指数( $t$ 值: 5.75、7.42)均明显升高; HG 12 wk组大鼠体质量、肝指数均明显高于HG 8 wk组( $t$ 值: 5.05、5.03); DG组体质量、肝指数较HG 12 wk组明显降低( $t$ 值: 3.49、5.51), 但仍高于NG 12 wk组( $t$ 值: 3.79、3.53), 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ 或0.01, 表1).

2.2 血清及肝匀浆各项指标检测: 与同期NG组比较, HG组大鼠的ALT( $T = 97$ 、 $t = 5.49$ )、AST( $t$ 值: 4.99、5.31)、TG( $T = 96$ 、 $t = 7.37$ )、TC( $t$ 值: 2.30、5.86)、FIns( $t$ 值: 2.64、3.85)、FFAs( $t$ 值: 3.86、6.61)、TNF- $\alpha$ ( $t = 10.53$ 、 $T = 100$ )水平及肝匀浆TG( $t$ 值: 7.07、6.18)、TC( $T = 89.5$ 、 $T = 100$ )、FFAs( $t$ 值: 5.20、6.18)、MDA( $t$ 值: 11.90、17.83)水平均增高, 肝匀浆SOD( $t$ 值: 4.88、7.92)水平降低, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ ); HG 12 wk组与HG 8 wk组比较以上各项指标, 除肝匀浆SOD水平降低外其余指标均增高(血清: ALT:  $t = 2.39$ ; AST:  $t = 2.26$ ; TG:  $T = 95$ ; TC:  $t = 2.19$ ; FIns:  $t = 2.61$ ; FFAs:  $t = 2.22$ ; TNF- $\alpha$ :  $T = 92$ . 肝匀浆: TG:  $t = 3.14$ ; TC:  $T = 93$ ; SOD:  $t = 2.21$ ; MDA:  $t = 8.59$ ; FFAs:  $t = 2.61$ ); DG组与HG 12 wk组比较: 除肝匀浆SOD水平升高外其余指标均降低(血清: ALT:  $t = 4.54$ ; AST:  $t = 2.73$ ; TG:  $t = 4.67$ ; TC:  $t = 4.20$ ; FIns:  $t = 2.41$ ; FFAs:  $t = 2.79$ ; TNF- $\alpha$ :  $T = 90.5$ . 肝匀浆: TG:  $t = 3.77$ ; TC:  $t = 4.15$ ; SOD:  $t = 6.01$ ; MDA:  $t = 9.01$ ; FFAs:  $t = 2.56$ ); 而DG组与NG 12 wk组比较: 除肝匀浆SOD水平降低外其余指标均升高(血清: ALT:  $t = 5.35$ ; AST:  $t = 3.73$ ; TG:  $t = 4.40$ ; TC:  $t = 2.48$ ; FIns:  $t = 3.26$ ; FFAs:  $t = 4.78$ ; TNF- $\alpha$ :  $t = 10.38$ . 肝匀浆: TG:  $t = 6.39$ ; TC:  $T = 96$ ; SOD:  $t = 4.28$ ; MDA:  $t = 3.78$ ; FFAs:  $t = 3.59$ ), 差异均具有



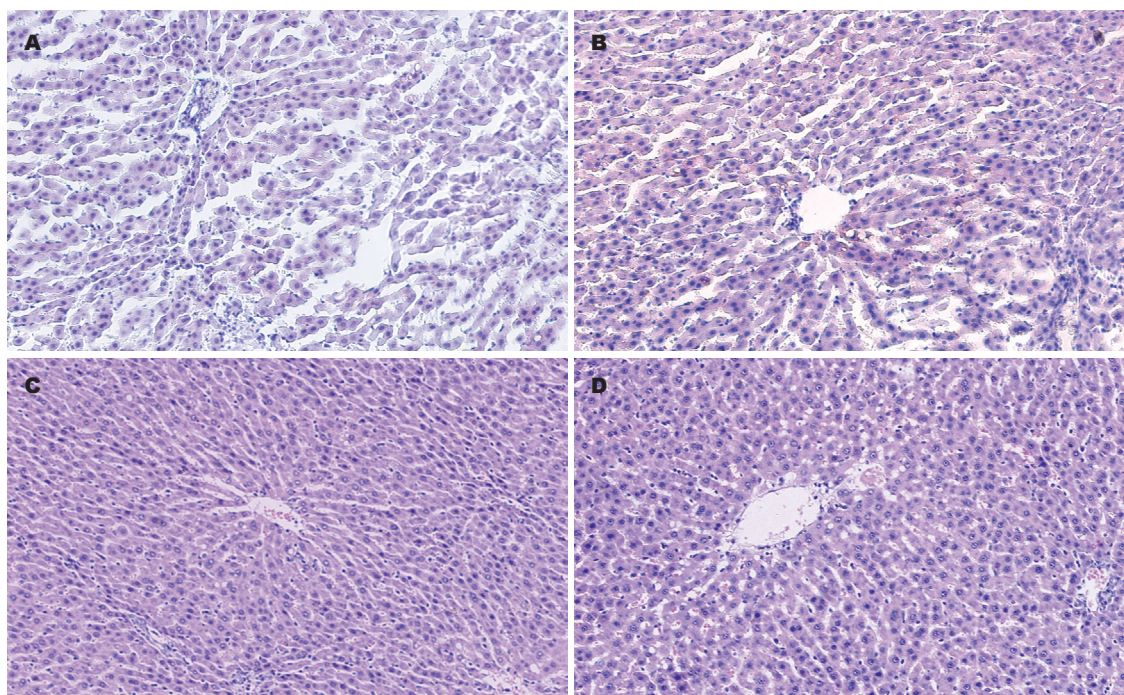


图 1 大鼠肝组织的形态学表现(×100). A: NG 8 wk组(苏丹染色); B: NG 12 wk组(苏丹染色); C: NG 8 wk组(HE染色); D: NG 12 wk组(HE染色).

表 2 血清的各项指标 ( $n = 8$ )

| 分组    | ALT(U/L)                        | AST(U/L)                         | TG(mmol/L)                    | TC(mmol/L)                    | Flns( $\mu$ U/mL)              | FFAs( $\mu$ mol/L)               | FBS(mmol/L)     | TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)    |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| NG组   |                                 |                                  |                               |                               |                                |                                  |                 |                               |
| 8 wk  | 53.23 $\pm$ 10.18               | 120.69 $\pm$ 13.62               | 0.70 $\pm$ 0.26               | 1.73 $\pm$ 0.42               | 9.50 $\pm$ 2.45                | 366.13 $\pm$ 70.73               | 5.68 $\pm$ 0.83 | 0.35 $\pm$ 0.09               |
| 12 wk | 52.00 $\pm$ 8.75                | 123.29 $\pm$ 11.47               | 0.74 $\pm$ 0.25               | 1.88 $\pm$ 0.38               | 10.17 $\pm$ 3.38               | 381.00 $\pm$ 55.42               | 5.11 $\pm$ 0.50 | 0.36 $\pm$ 0.13               |
| HG组   |                                 |                                  |                               |                               |                                |                                  |                 |                               |
| 8 wk  | 84.88 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>   | 149.33 $\pm$ 8.85 <sup>a</sup>   | 1.35 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>  | 2.58 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>  | 13.94 $\pm$ 4.09 <sup>a</sup>  | 510.63 $\pm$ 78.77 <sup>a</sup>  | 5.55 $\pm$ 0.73 | 1.06 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>  |
| 12 wk | 99.31 $\pm$ 8.99 <sup>bc</sup>  | 167.01 $\pm$ 20.28 <sup>bc</sup> | 2.03 $\pm$ 0.43 <sup>bc</sup> | 3.48 $\pm$ 0.68 <sup>bc</sup> | 22.64 $\pm$ 8.50 <sup>bc</sup> | 601.38 $\pm$ 84.37 <sup>bc</sup> | 5.40 $\pm$ 0.60 | 1.34 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup> |
| DG组   | 77.44 $\pm$ 10.22 <sup>ab</sup> | 144.56 $\pm$ 11.34 <sup>ab</sup> | 1.24 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup> | 2.34 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> | 15.08 $\pm$ 2.59 <sup>ab</sup> | 505.38 $\pm$ 48.73 <sup>ab</sup> | 5.45 $\pm$ 0.65 | 1.11 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同期NG组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs HG 8 wk组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG 12 wk组.

统计学意义(均 $P < 0.05$ ); NG 12 wk组与NG 8 wk组比较以上各项指标, 差异均无统计学意义, 各组间的FBS比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ , 表2-3).

**2.3 肝组织病理学变化** 肝标本经苏丹IV及HE染色, 光镜下显示NG组大鼠肝组织形态学表现正常, 而HG 8 wk组、HG 12 wk组所有动物肝组织均出现不同程度的肝细胞脂肪变性, 肝细胞体积增大, 细胞质内可见大小不等的脂滴空泡, 肝组织脂肪变性程度与高脂饮食时间相关; HG 8 wk组为中度脂肪变性; HG 12 wk组为中-重度脂肪变性并小叶内及汇管区有以单核、淋巴细胞为主的炎症细胞浸润, 该组中所有大鼠都已进展为非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepa-

titis, NASH)阶段. 饮食治疗4 wk后DG组肝脂肪变性程度较HG 12 wk组减少, 为轻-中度脂肪变性, HAI积分: DG组 vs HG 12 wk组:  $2.88 \pm 0.35$  vs  $4.00 \pm 0.76$ ,  $t = 3.81$ ,  $P < 0.01$ (图1-2, 表4).

**2.4 GIR** 与同期NG组比较, HG组大鼠GIR[mg/(kg·min)]水平明显降低 (HG 8 wk组 vs NG 8 wk组:  $8.11 \pm 1.09$  vs  $10.77 \pm 1.26$ ,  $t = 4.52$ , HG 12 wk组 vs NG 12 wk组:  $6.31 \pm 1.46$  vs  $10.66 \pm 1.24$ ,  $t = 6.41$ ), HG 12 wk组GIR水平明显低于HG 8 wk组( $t = 2.79$ ), DG组的GIR水平( $7.83 \pm 1.06$ )较HG 12 wk组升高, 但仍低于NG 12 wk组( $t$ 值分别为2.38、4.91), 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ ); NG 12 wk组与NG 8 wk组GIR水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

#### 创新盘点

本研究通过喂饲SD大鼠高脂饮食构建NAFLD模型后, 改高脂饮食为正常饮食的方法, 观察饮食调整对NAFLD的治疗作用, 并探讨其作用机制, 试图为NAFLD的治疗提供理论依据.



## 应用要点

本研究证实了喂饲SD大鼠高脂饮食8 wk可成功构建NAFLD大鼠模型, 12 wk可形成NASH, IR贯穿其发病始终, 而恢复正常饮食对于改善NAFLD, 延缓其发展有明显的效果, 治疗有效安全, 为治疗NAFLD提供了理论依据及新途径, 说明科学合理的饮食方式等健康的生活习惯在NAFLD的防治中起着重要作用。

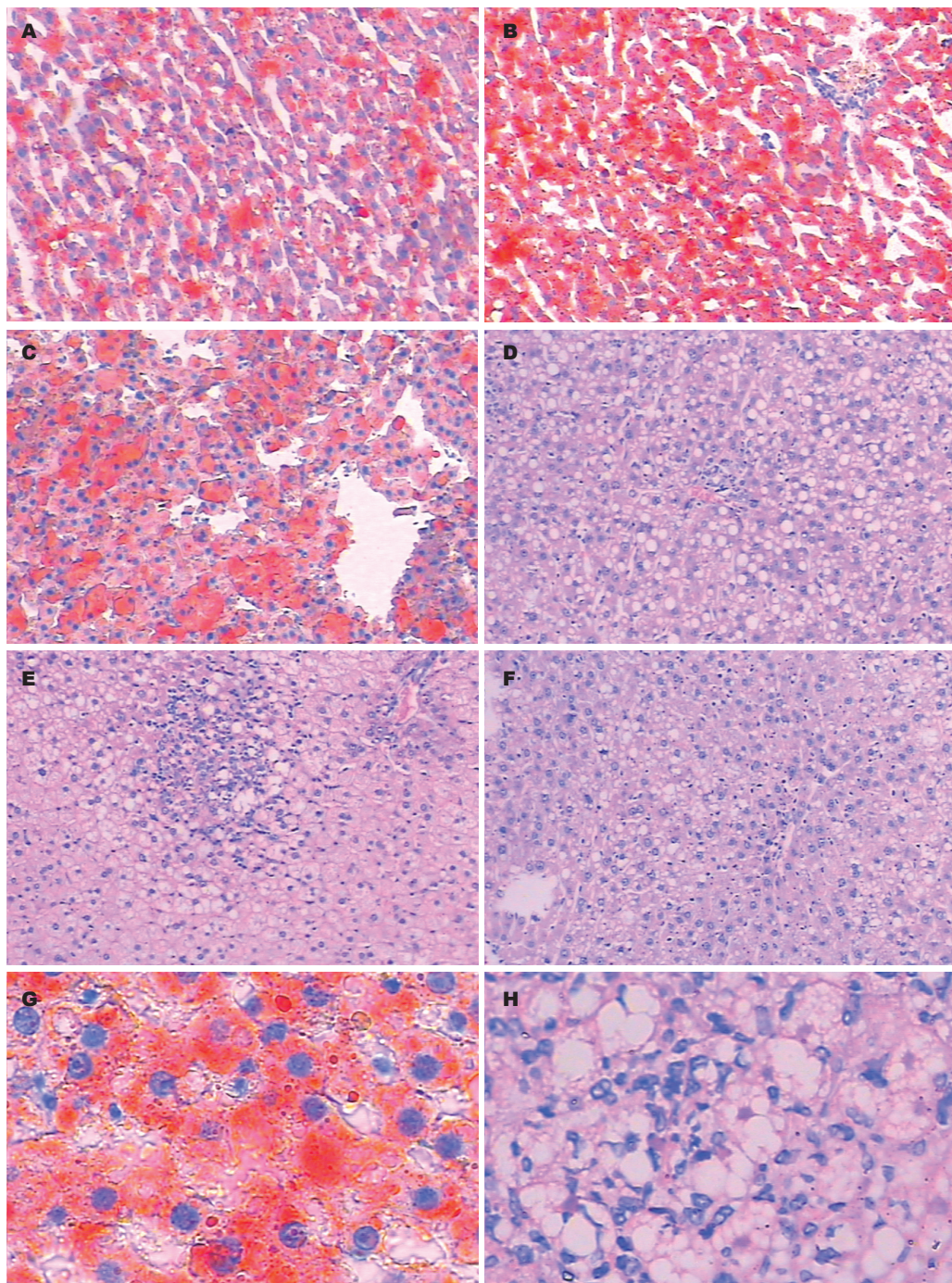


图2 大鼠肝组织脂肪变性。A: HG 8 wk组(苏丹染色 $\times 100$ ); B: HG 12 wk组(苏丹染色 $\times 100$ ); C: DG组(苏丹染色 $\times 100$ ); D: HG 8 wk组(HE染色 $\times 100$ ); E: NG 12 wk组(HE染色 $\times 100$ ); F: DG组(HE染色 $\times 100$ ); G: HG 12 wk组(苏丹染色 $\times 400$ ); H: HG 12 wk组(HE染色 $\times 400$ )。

**2.5 肝组织JNK1蛋白表达、IRS-1蛋白表达及丝氨酸磷酸化** 与同期NG组比较, HG组大鼠肝组织JNK1蛋白表达( $t = 4.39, 5.81$ )、p-IRS-1<sup>Ser307</sup>( $t$ 值: 4.06、6.48)水平增高; 与HG8 wk组比较, HG 12 wk组的JNK1蛋白表达、p-IRS-1<sup>Ser307</sup>水平升高( $t = 2.92, 2.47$ ); DG组较HG 12 wk组JNK1蛋白表达、p-IRS-1<sup>Ser307</sup>水平降低( $t$ 值: 2.41、2.45), 但仍高于NG 12 wk组( $t$ 值: 4.45、6.99), 差异均

具有统计学意义(均 $P < 0.05$ ); 各组间的IRS-1蛋白表达比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ ); NG 12 wk组与NG8 wk组比较以上各项指标, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ , 图3)。

**2.6 肝组织JNK1蛋白表达与IR的相关性** 将HG 8 wk组、HG 12 wk组、DG组的GIR与肝组织JNK1蛋白进行相关性分析后发现: GIR与JNK1蛋白表达呈明显负相关(Pearson: -0.671,

表 3 肝匀浆的各项指标 ( $n = 8$ )

| 分组     | TG(mmol/L)                    | TC(mmol/L)                    | SOD(U/mgpro)                   | MDA(nmol/mgpro)               | FFAs( $\mu$ mol/gpro)              |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| NG     |                               |                               |                                |                               |                                    |
| 8 wk组  | 1.61 $\pm$ 0.23               | 0.76 $\pm$ 0.44               | 21.64 $\pm$ 3.99               | 0.72 $\pm$ 0.14               | 408.32 $\pm$ 70.73                 |
| 12 wk组 | 1.69 $\pm$ 0.15               | 0.90 $\pm$ 0.35               | 22.03 $\pm$ 3.56               | 0.76 $\pm$ 0.27               | 425.61 $\pm$ 61.76                 |
| HG     |                               |                               |                                |                               |                                    |
| 8 wk组  | 3.79 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>  | 1.78 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>  | 13.00 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>  | 3.91 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>  | 598.70 $\pm$ 75.75 <sup>a</sup>    |
| 12 wk组 | 5.48 $\pm$ 1.26 <sup>ac</sup> | 3.20 $\pm$ 0.39 <sup>ac</sup> | 10.06 $\pm$ 2.23 <sup>ac</sup> | 7.98 $\pm$ 1.11 <sup>ac</sup> | 705.56 $\pm$ 87.65 <sup>ac</sup>   |
| DG组    | 3.50 $\pm$ 0.79 <sup>ae</sup> | 2.01 $\pm$ 0.71 <sup>ae</sup> | 16.04 $\pm$ 1.72 <sup>ae</sup> | 2.53 $\pm$ 1.30 <sup>ae</sup> | 580.95 $\pm$ 105.87 <sup>dae</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同期NG组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG 8 wk组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs HG 12 wk组。

表 4 各组大鼠肝脂变程度 ( $n = 8$ )

| 分组     | 肝脂变程度 |   |    |     |      |
|--------|-------|---|----|-----|------|
|        | -     | + | ++ | +++ | ++++ |
| NG     |       |   |    |     |      |
| 8 wk组  | 8     |   |    |     |      |
| 12 wk组 | 8     |   |    |     |      |
| HG     |       |   |    |     |      |
| 8 wk组  | 0     | 0 | 7  | 1   | 0    |
| 12 wk组 | 0     | 0 | 0  | 6   | 2    |
| DG组    | 0     | 3 | 5  | 0   | 0    |

$P < 0.01$ ); 即JNK1蛋白表达与IR水平呈正相关。

### 3 讨论

研究表明, 高脂饮食是NAFLD发病的危险因素, 可导致肥胖及IR, 而IR是NAFLD发病的关键环节<sup>[17-20]</sup>。本研究通过喂饲SD大鼠脂肪占总热量45%的高脂饲料8 wk成功的构建了NAFLD模型, 12 wk形成了NASH。同时观察到NAFLD SD大鼠体质量、肝指数增高, 并伴有IR、高INS血症、高脂血症、血清转氨酶升高等代谢特征, 且随着高脂饲料喂养时间的延长, 以上异常逐渐加重; 病理切片显示肝脏脂肪变性程度增加, 呈明显时间依赖性, 以上研究证实高脂饮食可促进NAFLD的发生发展。

许多研究表明高脂饮食造成营养过剩, 将引起体内糖脂代谢产物及自由基的大量堆积, 这些产物可直接反馈抑制INS所介导的糖脂代谢。同时, 机体往往处于炎症或氧化应激状态, 伴有炎症因子水平升高, 从而激活相应的应激信号通路包括JNK信号通路等, 干扰INS的信号转导而导致IR<sup>[21-22]</sup>。目前认为, JNK信号通路在肥胖引起的IR中起关键作用, 在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中INS敏感组织包括肝脏、脂肪等

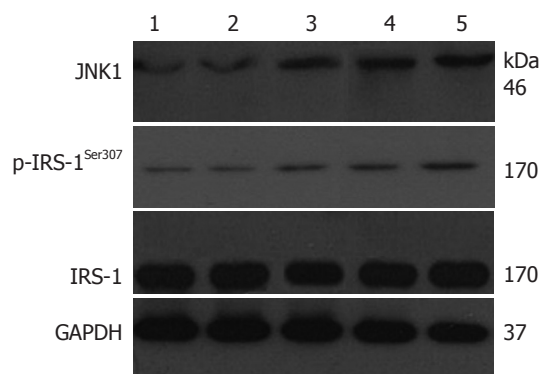


图 3 各组大鼠肝组织蛋白表达。1: NG 8 wk组; 2: NG 12 wk组; 3: HG 8 wk组; 4: DG组; 5: HG 12 wk组。

JNK活性明显升高, 而敲除JNK1基因的高脂饮食肥胖小鼠IR及肥胖明显减轻, 说明JNK1在肥胖及IR的发生发展中起着重要作用<sup>[5,23-24]</sup>。IRS-1是INS信号通路上的关键蛋白, JNK1与IRS-1结合后, 导致p-IRS-1<sup>Ser307</sup>水平增高, 抑制IRS-1的酪氨酸磷酸化, 从而下调INS信号传导, 导致IR<sup>[25-26]</sup>。本研究结果证实, 正常大鼠的肝组织JNK1蛋白表达及p-IRS-1<sup>Ser307</sup>水平较弱, 而以上指标在高脂饮食诱导的NAFLD大鼠明显增高, 且JNK1蛋白表达与IR水平呈正相关, 而各组间肝组织的IRS-1蛋白表达无明显改变, 表明高脂饮食诱导的NAFLD是通过促进肝组织JNK1增高, 其与IRS-1结合后通过影响IRS-1的磷酸化功能, 下调INS信号传导从而导致IR。

研究表明TNF- $\alpha$ 、FFAs、氧化应激反应均可以诱导IR, 他们可以特异性的激活JNK信号通路, 增加IRS-1的丝氨酸磷酸化, 抑制酪氨酸磷酸化来减弱IRS-1的活性, 从而导致IR<sup>[27-28]</sup>。本研究结果显示NAFLD大鼠的TNF- $\alpha$ 、FFAs、MDA水平升高, 而SOD水平降低, 并呈明显时间依赖性, 说明脂肪因子、脂质代谢异常及氧化应激反应通过导致IR而参与了NAFLD的发

#### 同行评价

本研究对于阐明“饮食调节可改善脂肪肝”的理论有一定帮助, 工作量可观, 然而重点不够突出。



生发展过程。

目前NAFLD尚无有效的治疗方法,去脂药物治疗周期长,不良反应大且费用高。大量研究表明,饮食治疗和运动结合能有效改善NAFLD<sup>[29-31]</sup>,但对于现代人来说,节食和长期运动都难以坚持,而且节食过度的饥饿疗法又缺乏一定的安全性,故本研究采取改高脂饮食为正常饮食的方法治疗NAFLD大鼠4 wk来观察其治疗效果。结果表明:高脂饮食形成的NAFLD经饮食调整后能明显减轻体质量,改善血脂异常、肝功能损伤、脂肪因子异常、氧化应激反应及IR水平,延缓肝脂肪变性的发展,其机制可能为正常饮食治疗通过抑制JNK1的活性,减少p-IRS-1<sup>Ser307</sup>水平,增强IRS-1的功能,促进INS信号通路的传导,进而减弱IR,同时降低TNF- $\alpha$ 、FFAs水平,减弱氧化应激反应,从而改善NAFLD。通过饮食调整可以明显的改善NAFLD,但仍无法恢复到正常水平,要达到完全逆转肝损害,可能需视情况合用药物治疗。

本研究证实了喂饲SD大鼠高脂饮食8 wk可成功构建NAFLD大鼠模型,12 wk可形成NASH,IR贯穿其发病始终,JNK信号通路IR密切相关;而恢复正常饮食对于改善NAFLD,延缓其发展有明显的效果,治疗有效安全,为治疗NAFLD提供了理论依据及新途径,说明科学合理的饮食方式等健康的生活习惯在NAFLD的防治中起着重要作用。

#### 4 参考文献

- Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115: 141-150
- Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50: 204-210
- Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45: 600-606
- Patel AA, Torres DM, Harrison SA. Effect of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 970-974
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336
- Yang R, Wilcox DM, Haasch DL, Jung PM, Nguyen PT, Voorbach MJ, Doktor S, Brodjian S, Bush EN, Lin E, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz KT, Trevillyan JM, Rondinone CM, Surowy TK. Liver-specific knockdown of JNK1 up-regulates proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta and increases plasma triglyceride despite reduced glucose and insulin levels in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 22765-22774
- Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1463-1471
- Safwat GM, Pisano S, D'Amore E, Borioni G, Napolitano M, Kamal AA, Ballanti P, Botham KM, Bravo E. Induction of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance by feeding a high-fat diet in rats: does coenzyme Q monomethyl ether have a modulatory effect? *Nutrition* 2009; 25: 1157-1168
- Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2045-2049
- Huang MA, Greenston JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1072-1081
- 钟岚, 刘菲, 王军臣, 袁琼英, 徐文. 饮食调整治疗大鼠非酒精性脂肪性肝炎. *国际消化病杂志* 2006; 26: 208-210
- Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991; 12: 224-229
- 李岚, 刘慧霞, 贺丹, 陈金虎, 张佳妮, 全养雅. 高脂饮食构建胰岛素抵抗脂肪肝大鼠模型. *中国医师杂志* 2009; 11: 865-867
- Kraegen EW, James DE, Bennett SP, Chisholm DJ. In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol* 1983; 245: E1-E7
- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中华肝病杂志* 2006; 14: 161-163
- 王泰岭, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. *中华肝病杂志* 1998; 6: 195-197
- Toshimitsu K, Matsuura B, Ohkubo I, Niiya T, Furukawa S, Hiasa Y, Kawamura M, Ebihara K, Onji M. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 2007; 23: 46-52
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 987-1000
- 张佳妮, 陈金虎, 谭莺, 刘慧霞. 吡格列酮对SD大鼠非酒精性脂肪肝病形成的预防作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 758-776
- 李岚, 刘慧霞, 贺丹, 陈金虎, 张佳妮, 全养雅. IL-18对大鼠非酒精性脂肪肝病形成的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1764-1767
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806
- Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marziani M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-860
- 陈金虎, 刘慧霞, 张佳妮, 全养雅, 郭敏, 谭莺. c-jun氨基末端激酶在非酒精性脂肪肝病胰岛素抵抗大



- 鼠中的表达及意义. 中国现代医学杂志 2009; 19: 1782-1785, 1789
- 24 Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008; 322: 1539-1543
- 25 Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J Biol Chem* 2004; 279: 45803-45809
- 26 Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 371-379
- 27 Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944-948
- 28 Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005; 87: 99-109
- 29 Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Antao N, Baynard T, Woods JA. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E1164-E1171
- 30 Mensink RP, Plat J, Schrauwen P. Diet and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 25-29
- 31 Bellentani S, Dalle Grave R, Suppini A, Marchesini G. Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease: The need for a multidisciplinary approach. *Hepatology* 2008; 47: 746-754

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如 1000-1500 kg,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

# 针刺结合西沙必利对慢传输便秘大鼠结肠肌电的影响

周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 余芝, 鞠传慧, 马飞翔

**背景资料**  
STC是由结肠传输功能障碍引起的一种常见疾病, 随着人们生活水平的提高、工作节奏的加快, 慢传输便秘的发病率逐年上升, 严重影响了人们的生活质量。目前, 对STC的治疗除了饮食调整、按摩等一般治疗外, 主要有各种类型的通便药、生物反馈疗法、手术治疗及中药、针灸治疗等。但针灸治疗STC的实验研究很缺乏。

周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 余芝, 鞠传慧, 马飞翔, 南京中医药大学针药结合实验室 江苏省南京市 210029  
周惠芬, 南京中医药大学第二临床医学院2007级硕士研究生, 主要从事针药结合的临床神经内分泌机制研究。  
国家科技部“十一五”支撑课题基金资助项目, No. 2006BA112B05  
江苏省2008年度普通高校研究生科研创新计划基金资助项目, No. CX08B-189J  
作者贡献分布: 此课题由王玲玲、衣运玲及周惠芬共同设计; 研究过程由周惠芬、衣运玲、余芝、鞠传慧及马飞翔操作完成; 数据分析由周惠芬完成; 本论文写作由周惠芬与王玲玲完成。  
通讯作者: 王玲玲, 教授, 博士生导师, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学针药结合实验室. wanglingl@gmail.com  
电话: 025-86798095  
收稿日期: 2008-12-31 修回日期: 2009-03-18  
接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-11-28

## Effects of acupuncture, cisapride and combined acupuncture and cisapride on colonic electromyography in rats with slow transit constipation

Hui-Fen Zhou, Ling-Ling Wang, Yun-Ling Yi, Zhi Yu, Chuan-Hui Ju, Fei-Xiang Ma

Hui-Fen Zhou, Ling-Ling Wang, Yun-Ling Yi, Zhi Yu, Chuan-Hui Ju, Fei-Xiang Ma, Laboratory of Acupuncture and Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Supported by: the 11<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China, No. 2006BA112B05; and the Scientific Research and Innovation Program for Graduate Students in Higher Institutions in Jiangsu, No. CX08B-189J

Correspondence to: Professor Ling-Ling Wang, Laboratory of Acupuncture and Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wanglingl@gmail.com  
Received: 2008-12-31 Revised: 2009-03-18  
Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of acupuncture, cisapride and combined acupuncture and cisapride on colonic electromyography in rats with slow transit constipation

**METHODS:** A total of 55 rats were used in the study, of which 10 were included in normal control group, and 45 were used to induce STC by intragastric administration of gradually in-

creasing doses of rhubarb suspension. Then the rats underwent acupuncture at ZuSanLi and ZhaoHai, cisapride treatment, or combined acupuncture and cisapride treatment for 14 days. The changes in colonic electromyography were examined.

**RESULTS:** The slow-wave frequency and amplitude decreased to  $5.47 \pm 3.08$  beats/min and  $0.33 \pm 0.19$  mV, respectively, in some STC rats, but increased to  $26.61 \pm 8.99$  beats/min and  $0.69 \pm 0.70$  mV, respectively, in some other STC rats when compared with normal control rats. In STC rats showing decreased slow-wave frequency and amplitude, the slow-wave frequency and amplitude were  $8.36 \pm 5.55$  beats/min and  $0.42 \pm 0.21$  mV in acupuncture-treated rats,  $6.84 \pm 3.44$  beats/min and  $0.20 \pm 0.03$  mV in cisapride-treated rats, and  $12.37 \pm 2.16$  beats/min and  $0.37 \pm 0.05$  mV in rats treated with both acupuncture and cisapride. In STC rats showing increased slow-wave frequency and amplitude, the frequency and amplitude were  $20.86 \pm 4.25$  beats/min and  $0.28 \pm 0.06$  mV in acupuncture-treated rats,  $28.42 \pm 19.79$  beats/min and  $0.47 \pm 0.26$  mV in cisapride-treated rats, and  $21.20 \pm 4.72$  beats/min and  $0.46 \pm 0.17$  mV in rats treated with both acupuncture and cisapride.

**CONCLUSION:** Cisapride alone can only increase slow-wave frequency and amplitude in STC rats, while acupuncture alone and combined acupuncture and cisapride can bi-directionally regulate slow-wave frequency and amplitude in STC rats.

**Key Words:** Acupuncture; Cisapride; Slow transit constipation; Colonic electromyography; Acupuncture in combination with medicine

Zhou HF, Wang LL, Yi YL, Yu Z, Ju CH, Ma FX. Effects of acupuncture, cisapride and combined acupuncture and cisapride on colonic electromyography in rats with slow transit constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3402-3407

## 摘要

目的: 观察针刺、药物西沙必利及二者合用对

同行评议者  
陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

慢传输便秘大鼠结肠肌电的影响, 探讨这3种治疗方法的效应差异, 以及针药结合的优势。

方法: 55只SD大鼠, 随机取10只作为正常组, 其余45只用大黄小剂量递增灌胃造模。测定大鼠结肠肌电慢波, 分别采用针刺足三里和照海、药物西沙必利及二者合用治疗14 d, 然后慢波的变化。

结果: 与正常大鼠比较, 部分模型大鼠慢波频率减慢为每分 $5.47 \pm 3.08$ 次, 振幅降低为 $0.33 \pm 0.19$  mV; 部分频率加快为每分 $26.61 \pm 8.99$ 次, 振幅增高为 $0.69 \pm 0.70$  mV。对频率减慢、振幅降低型慢波的改变, 针刺组频率和振幅为每分 $8.36 \pm 5.55$ 次,  $0.42 \pm 0.21$  mV; 药物组频率和振幅为每分 $6.84 \pm 3.44$ 次,  $0.20 \pm 0.03$  mV; 针药结合组频率和振幅为每分 $12.37 \pm 2.16$ 次,  $0.37 \pm 0.05$  mV。对频率增快、振幅增高型慢波的改变, 针刺组频率和振幅为每分 $20.86 \pm 4.25$ 次,  $0.28 \pm 0.06$  mV; 药物组频率和振幅为每分 $28.42 \pm 19.79$ 次,  $0.47 \pm 0.26$  mV; 针药结合组频率和振幅为每分 $21.20 \pm 4.72$ 次,  $0.46 \pm 0.17$  mV。

结论: 西沙必利只能单向地增快频率、升高振幅, 而针刺、针刺与西沙必利合用对模型大鼠频率与振幅的改变具有双向调整的作用。

关键词: 针刺; 西沙必利; 慢传输便秘; 结肠肌电; 针药结合

周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 余芝, 鞠传慧, 马飞翔. 针刺结合西沙必利对慢传输便秘大鼠结肠肌电的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3402-3407  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3402.asp>

## 0 引言

慢传输便秘(slow transit constipation, STC)是由结肠传输功能障碍引起的一种常见疾病, 占功能性便秘的45.5%<sup>[1]</sup>。表现为排便困难、无便意感或便意感减弱; 每周排便少于2-3次或数天至数十天排便1次; 排便时间延长, 甚至超过每次30 min。随着人们生活水平的提高、工作节奏的加快, 慢传输便秘的发病率逐年上升, 严重影响了人们的生活质量。目前, 对STC的治疗除了饮食调整、按摩等一般治疗外, 主要有各种类型的通便药、生物反馈疗法、手术治疗及中药、针灸治疗等。但不论是药物或手术治疗, 均会产生不良反应或痛苦, 这使得针灸治疗越来越受到重视。但针灸治疗STC的实验研究很缺乏, 不过

在调节胃肠道功能的相关研究中提示针灸可增加肠动力<sup>[2-4]</sup>, 还有研究报道针刺可使便秘大鼠首次排便时间显著缩短, 12 h大便重量和粒数明显增加, 从而改善便秘大鼠的排便功能。目前针对针药结合的研究也正在不断深入和规范, 临床研究涉及的病种多达90多种, 很多学者认为针药结合的效应远非针、药单独运用可比。但针灸与药物结合后的相互作用规律和机制还不够清楚。本研究将关注3种治疗方法对这种异常改变的作用结果, 考虑针刺或针药结合是否可以对异常的慢波频率和振幅产生双向的调整作用; 通过与药物效应的对比, 揭示针刺或针药结合在治疗STC时表现出的多系统整体调整或其他效应特征; 利用该药物较为明确的作用机制和途径, 推测针刺或针药结合的作用机制和途径; 分析针药结合与单纯针刺、单纯药物治疗相比是否还具有其他的优势, 从而推动针药结合临床应用的发展。

慢波是结肠肌电的表现形式之一, 他是相对规律的一种周期性电活动, 控制肠道收缩的节律, 无论肠道收缩与否始终存在。有研究表明其频率异常会导致肠道的推进性收缩频率减慢或收缩不协调, 其振幅降低会导致结肠收缩力下降, 结果表现为结肠运动无力, 肠道传输功能迟缓。近年来的动物实验研究认为, 结肠肌电活动可作为反映结肠功能的一项客观电生理指标。但大多数研究仅仅观察造模后的结肠肌电改变, 并没有用于某种治疗方法效应的观察。目前的慢传输便秘动物实验大多利用接触性泻剂来复制“泻剂结肠”模型<sup>[5-10]</sup>。并且临床上STC患者绝大多数有长期服用接触性泻剂史, 开始时多为小剂量偶尔服用, 逐渐演变为长期服用, 到后期则依靠大剂量泻剂维持排便, 甚至不服泻剂不排便。我们用大黄小剂量递增灌胃复制了这一过程。模型大鼠在经过14 d的治疗后, 我们检测了针刺组、西沙必利药物组及二者合用治疗后大鼠的结肠肌电变化, 旨在从结肠电生理的角度探讨这3种治疗方法的效应差异, 以及针药结合的优势。

## 1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠55只, 雌雄各半, 体质量180-200 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供; 饲料购自江苏南京汤山; 西沙必利由浙江京新药业股份有限公司生产; 生大黄购自江苏省医药公司, 自行打磨成粉, 过200目筛; 环球牌针

**相关报道**  
已有证据表明, STC患者结肠推进性收缩波数目减少, 收缩幅度降低, 也有研究报道长期服用泻剂的便秘患者结肠慢波频率较对照组升高。



### 创新盘点

本研究检测了针刺组、西沙必利药物组及二者合用治疗后大鼠的结肠肌电变化,旨在从结肠电生理的角度探讨这3种治疗方法的效应差异,以及针药结合的优势,为针灸治疗STC提供理论依据。

灸针, 0.20 mm×10 mm, 购于苏州环球针灸医疗器械有限公司; HANS-200E型韩氏穴位神经刺激仪购自南京济生医疗科技有限公司; RM6240型多导生理信号采集处理系统、动物恒温手术台ST-1型、恒温浴槽HSS-1型, 均购自成都仪器厂; 铜丝电极, 自制, 直径0.5 mm, 长5 cm。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠模型的建立及分组:** 55只SD大鼠, 随机取10只作为正常组, 其余45只用大黄小剂量递增灌胃造模。所有大鼠均在代谢笼内饲养, 6只/笼, 予普通干饲料。在造模阶段, 对除正常组以外的大鼠, 用生大黄粉开水冲泡制成的混悬液灌胃, 每日1次, 首次给药剂量为150 mg/(kg·d), 以后每日的递增剂量为150 mg/(kg·d), 达首次腹泻剂量1950 mg/(kg·d)后, 维持此剂量至稀便消失, 此为一个循环, 再按150 mg/(kg·d)的剂量递增, 如此循环共计60 d, 最终剂量2700 mg/(kg·d)。停药6 d后, 所有大鼠用活性炭溶液灌胃测首粒黑便排出时间, 并以大于正常组大鼠首粒黑便排出时间的均数为标准筛选模型, 共39只造模成功, 模型的成功率为86.67%。其中正常组大鼠首粒黑便排出时间为442.80±97.12 min, 模型大鼠首粒黑便排出时间为640.00±69.80 min ( $P<0.001$ )。再将39只模型大鼠随机分为模型组9只、针刺组10只、药物组10只、针药结合组10只。各组间体质量、性别、首粒黑便排出时间无显著性差异。其中, 模型组大鼠首粒黑便排出时间为657.11±49.58 min、针刺组大鼠首粒黑便排出时间为655.00±71.29 min、药物组大鼠首粒黑便排出时间为660.00±64.81 min、针药结合组大鼠首粒黑便排出时间为608.56±75.14 min。

**1.2.2 治疗:** 针刺组大鼠俯卧固定后取一侧足三里、照海(隔日交换对侧), 针灸针刺入后接韩氏电针仪, 参数为: 0.1 mA, 10 Hz, 连续波, 每天每次15 min, 并用生理盐水灌胃(5 mL/kg), 连续14 d; 药物组大鼠用西沙必利溶液灌胃(0.1%, 5 mL/kg), 并采用与针刺组同样的固定方法固定, 每天1次, 连续14 d; 针药结合组大鼠针刺足三里、照海, 并用西沙必利溶液灌胃, 连续14 d, 各参数同上。

**1.2.3 结肠肌电的测定:** 治疗结束后测定大鼠在体结肠肌电(治疗和测肌电期间共死亡2只)。具体步骤为: 大鼠禁食24 h, 200 g/L乌拉坦腹腔注射麻醉(1 mg/kg), 仰卧固定于恒温手术台上, 水浴箱40℃恒温, 剪去腹毛, 消毒后纵行切开下腹

部正中, 切口长约2 cm, 暴露回盲部。在距盲肠2 cm的结肠系膜缘对侧, 安置一对电极, 两电极相距不超过1 cm, 肠管放回腹腔, 导线经切口引出连接RM-6240生物机能实验系统, 腹部切口上覆盖生理盐水纱布块。稳定30 min后开始记录, 灵敏度选择: 标准电压1 mV/cm, 时间常数1 s, 高频滤波30 Hz, 连续记录1 h。

**1.2.4 结肠肌电活动参数分析:** 将每只大鼠的记录结果, 每3 min作为一个时间段, 分别计算出频率和振幅的均数、标准差和变异系数, 以正常大鼠结肠慢波频率为标准, 将模型组、针刺组、药物组和针药结合组大鼠分别分为频率减慢组、频率增快组, 再将各组频率和振幅的均数、标准差和变异系数进行方差齐性检验和单因素方差分析。慢波频率变异系数 = (慢波频率标准差/慢波频率均数)×100%; 慢波振幅变异系数 = (慢波振幅标准差/慢波振幅均数)×100%。

**统计学处理** 数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析进行统计学处理, 统计程序采用SPSS11.5。  $P<0.05$ 表示有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 慢传输便秘大鼠的结肠肌电变化** 通过测定并比较正常组和模型组大鼠的结肠肌电, 发现正常大鼠结肠慢波表现为不规则的近似正弦波样曲线, 少数有切迹, 呈双峰型, 频率为每分钟13.76±1.89次, 振幅为0.44±0.16 mV(图1A)。STC模型大鼠的结肠肌电呈双向变化: 其中有5只频率明显减慢为每分钟5.47±3.08次, 振幅降低为0.33±0.19 mV; 有4只频率明显加快为每分钟26.61±8.99次, 振幅增高为0.69±0.70 mV, 但幅值不等, 节律不规则(图1B-C, 表1)。

**2.2 针刺、药物对STC大鼠结肠肌电的影响** 对模型大鼠分别采用针刺、药物、针药结合进行治疗, 14 d后测首粒黑便排出时间和结肠肌电。(1)针刺组有4只频率减慢为每分钟8.36±5.55次, 振幅增高为0.42±0.21 mV, 波形规整, 首粒黑便排出时间为461.75±126.81 min; 5只频率增快为每分钟20.86±4.25次, 振幅降低为0.28±0.06 mV, 首粒黑便排出时间为478.20±96.07 min。(2)药物组有5只频率减慢为每分钟6.84±3.44次, 振幅降低为0.20±0.03 mV, 首粒黑便排出时间为610.00±234.62 min; 5只频率增快为每分钟28.42±19.79次, 振幅降低为0.47±0.26 mV, 首粒黑便排出时间为498.60±287.11 min。(3)针

表 1 大鼠结肠慢波频率与振幅

| 分组    | <i>n</i> | 频率(次/min)                  | 变异系数(%)                    | 振幅(mv)                    | 变异系数(%)                    |
|-------|----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常组   | 10       | 13.76 ± 1.89               | 19.63 ± 10.43              | 0.44 ± 0.16               | 22.12 ± 8.77               |
| 模型组   |          |                            |                            |                           |                            |
| 频率减慢  | 5        | 5.47 ± 3.08 <sup>ab</sup>  | 38.25 ± 18.94 <sup>a</sup> | 0.33 ± 0.19               | 33.55 ± 16.89              |
| 频率增快  | 4        | 26.61 ± 8.99 <sup>a</sup>  | 23.15 ± 23.92              | 0.69 ± 0.70               | 47.86 ± 47.12 <sup>a</sup> |
| 针刺慢频组 | 4        | 8.36 ± 5.55 <sup>a</sup>   | 26.14 ± 8.37               | 0.42 ± 0.21               | 28.35 ± 11.33              |
| 药物慢频组 | 5        | 6.84 ± 3.44 <sup>ab</sup>  | 24.03 ± 6.94               | 0.20 ± 0.03 <sup>ac</sup> | 29.41 ± 11.38              |
| 针药慢频组 | 4        | 12.37 ± 2.16               | 23.99 ± 11.13              | 0.37 ± 0.05               | 27.23 ± 9.18               |
| 针刺快频组 | 4        | 20.86 ± 4.25               | 34.78 ± 32.11              | 0.28 ± 0.06               | 31.07 ± 10.45              |
| 药物快频组 | 5        | 28.42 ± 19.79 <sup>a</sup> | 11.99 ± 10.04              | 0.47 ± 0.26               | 27.61 ± 11.49              |
| 针药快频组 | 5        | 21.20 ± 4.72               | 24.61 ± 12.90              | 0.46 ± 0.17               | 24.14 ± 10.92              |

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 正常组; <sup>b</sup>*P*<0.05 vs 针刺组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 针药结合组.

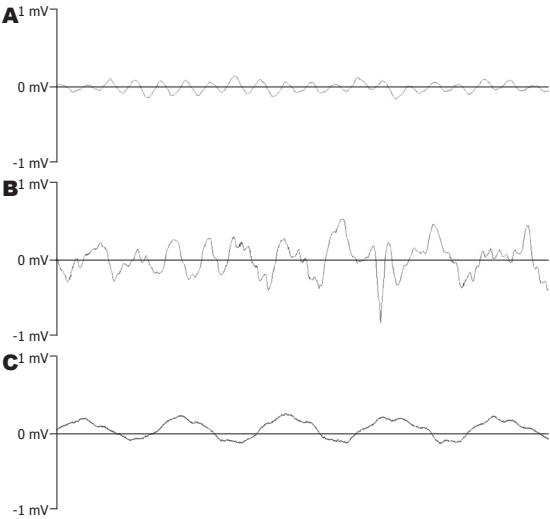


图 1 正常大鼠和模型大鼠结肠肌电. A: 正常大鼠; B: 模型大鼠频率加快组; C: 模型大鼠频率减慢组.

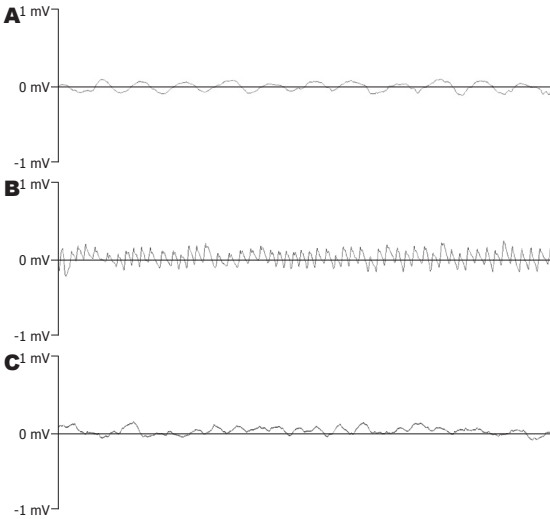


图 2 治疗后大鼠结肠肌电. A: 针刺慢频组; B: 药物快频组; C: 针药结合慢频组.

表 2 治疗后各组大鼠首粒黑便排出时间 (min)

| 分组  | 频率减慢组                         | <i>n</i> | 频率增快组                        | <i>n</i> |
|-----|-------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| 正常组 | 400.75 ± 68.22                | 10       |                              |          |
| 模型组 | 661.60 ± 206.54 <sup>ab</sup> | 5        | 622.50 ± 253.05 <sup>a</sup> | 4        |
| 针刺组 | 461.75 ± 126.81               | 4        | 478.20 ± 96.07               | 5        |
| 药物组 | 610.00 ± 234.62 <sup>a</sup>  | 5        | 498.60 ± 287.11              | 5        |
| 针药组 | 427.75 ± 52.46                | 4        | 460.00 ± 85.02               | 5        |

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 正常组; <sup>b</sup>*P*<0.05 vs 针药结合组.

药结合组有4只频率减慢为每分钟12.37 ± 2.16次, 振幅增高为0.37 ± 0.05 mV, 首粒黑便排出时间为427.75 ± 52.46 min; 5只频率增快为每分钟21.20 ± 4.72次, 振幅增高为0.46 ± 0.17 mV, 首粒黑便排出时间为460.00 ± 85.02 min(图2, 表1-2).

3 讨论

结肠平滑肌的电活动主要表现为2种: 一为基本电节律, 也称为慢波或电控制活动(ECA), 另一种为动作电位, 又称快波或峰电位. 慢波是相对规律的一种周期性电活动, 又有起步电位之称, 不论肠管收缩与否始终存在. 虽然慢波不能像动作电位那样引起平滑肌的收缩, 但他是结肠

**应用要点**  
本研究表明, 西沙必利只能单向地增快频率、升高振幅, 而针刺、针刺与西沙必利合用对模型大鼠频率与振幅的改变具有双向调整的作用, 从结肠动力的角度研究了针刺与西沙比利的效应差异.

#### 同行评价

本研究能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平,具有一定科学性、可读性。

平滑肌动作电位的基础,只有当慢波的电位去极化达到一定水平时,才会引发动作电位并发生扩布。动作电位才是产生结肠推进性收缩的主要始动因素。所以,相应平滑肌位相性收缩(相对于张力性收缩)的节律,就与该部位的慢波节律相同,结肠慢波的频率和振幅也就可以作为反映结肠功能的一项客观电生理指标。在人的结肠<sup>[6]</sup>,其收缩分为短收缩和长收缩,慢波控制的是短收缩,短收缩的频率,也就是慢波的频率为每分钟2-13次。诸多动物实验也表明,正常大鼠的慢波频率为每分钟13±1次,波形为不规则的近似正弦波样曲线,少数有切迹,呈双峰型。

已有证据表明,STC患者结肠推进性收缩波数目减少,收缩幅度降低<sup>[11]</sup>,也有研究报道长期服用泻剂的便秘患者结肠慢波频率较对照组升高( $P<0.05$ )<sup>[12]</sup>。表明慢波频率的异常会导致肠道的推进性收缩频率减慢或收缩不协调,振幅的降低会导致结肠收缩力下降,结果表现为结肠运动无力,肠道传输功能迟缓。

大黄口服10-12 wk,停药后可引起肌间丛神经及肌间丛Cajal间质细胞变性,导致结肠机电慢波频率异常,形成“泻剂结肠”<sup>[13]</sup>。我们采用大黄小剂量递增灌胃复制了“泻剂结肠”模型,结果模型大鼠结肠慢波与正常组出现了显著性差异,表现为双向变化:一类为频率减慢、振幅降低;另一类为频率增快、振幅增高,振幅的变异系数亦增高。我们用活性炭溶液灌胃来模拟临床的结肠传输试验,结果模型大鼠的首粒黑便排出时间延长到了 $640.00\pm 69.80$  min,与正常组比较 $P<0.05$ ,表明我们用大黄灌胃造出的模型符合STC结肠肌收缩力下降的改变。从结肠机电角度分析,发现不仅慢波频率减慢会造成慢传输便秘,慢波频率的增快和节律的不规则,也会引起动作电位发放频率不规整,使有效的推进性收缩减少,从而造成了结肠的慢传输。

西沙必利是5-HT<sub>4</sub>受体激动剂,通过作用于消化系平滑肌肌间神经丛的神经元受体,增加胆碱能神经纤维末端释放乙酰胆碱的时间和数量,由于乙酰胆碱可以增加慢波的振幅、增加动作电位的发生率<sup>[6]</sup>,因此西沙必利可以缩短胃肠通过时间,增加排便次数<sup>[14]</sup>。从我们的实验结果看,西沙必利对STC的治疗是有效的,但效应不如针刺、针药结合。而且西沙必利对发生双向改变的模型大鼠结肠机电慢波,只能单向地

增快频率、降低振幅,不能减慢模型大鼠增快的慢波频率,也不能增高模型大鼠降低的振幅。

综合分析频率、振幅、变异系数以及首粒黑便排出时间的结果,针刺、针药结合对STC都有很好的疗效,也都体现出了双向调整的特性。使发生双向改变的模型大鼠结肠机电慢波的频率、振幅都能向着正常值的方向恢复:对频率减慢、振幅降低的结肠慢波可以增快频率、升高振幅;对频率增快、振幅增高的结肠机电慢波可以减慢频率、降低振幅。并且,针刺结合西沙必利STC,其效应始终优于单纯药物或单纯针刺,通过对变异系数的分析,表明其疗效是普遍而稳定的。因为针刺的作用途径不是单一的,他是一种非特异性、多系统、多靶点的治疗手段,对多种胃肠激素和神经递质、Cajal间质细胞、肠神经系统都会产生作用,具有整体调整的特性。

本实验只从结肠动力的角度研究了针刺与西沙比利的效应差异,但排便障碍是一个复杂病理过程的最终表现,除了存在肠运动问题,还存在排便感觉的异常。西沙必利是促动力剂,可以增快胃肠道的蠕动,改善便秘,但针刺与西沙必利在影响排便困难的感觉方面是否有差异,这还有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 聂玉强,李瑜元. 罗马 功能性胃肠疾病分类及诊断 2001; 28: 147-150
- 2 王宽宇,魏殿龙,孙晓龙. 电针足三里、上巨虚促进腹部术后胃肠功能紊乱恢复40例临床观察. 中国中医药科技 2005; 12: 316-317
- 3 陈兰,刘诗. 高频电针刺刺激足三里穴对大鼠结肠传输功能的影响. 胃肠病学和肝病学杂志 2007; 16: 477
- 4 雷君,李琴,李国成,茹立强. 电针对大鼠胃肠动力障碍的调整作用及其神经化学机制. 针刺研究 2005; 30: 131
- 5 汪兴伟,刘海峰,房殿春,何俊堂,冯早明,陈刚. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌电影响的实验研究. 消化外科 2005; 4: 108-112
- 6 周吕,柯美云. 胃肠动力学. 北京: 科学出版社, 1999: 555, 559
- 7 童卫东,张胜本,刘宝华,张连阳,黄显凯,高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 665-667
- 8 何俊堂,刘海峰,房殿春,龙庆林,王国安. 慢传输型便秘大鼠结肠肌电生理变化及其意义. 解放军医学杂志 2004; 29: 857-858
- 9 刘海峰,何俊堂,汪兴伟,姜利国. 慢传输型便秘大鼠结肠肌电变化机制. 第四军医大学学报 2005; 26: 603
- 10 刘海峰,何俊堂,汪兴伟,姜利国. 大鼠慢传输型便秘模型的建立及其结肠肌电变化检测. 武警医学 2004; 15: 887
- 11 Rao SS, Sadeghi P, Batterson K, Beaty J. Altered periodic rectal motor activity: a mechanism for slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2001;



- 13: 591-598
- 12 Frieri G, Parisi F, Corazziari E, Caprilli R. Colonic electromyography in chronic constipation. *Gastroenterology* 1983; 84: 737-740
- 13 侯家玉. 中药药理学. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 70
- 14 Bak YT, Kim JH, Lee CH. Cisapride in chronic idiopathic constipation: clinical response and effect on colonic transit time. *Korean J Intern Med* 1996; 11: 151-156

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 •

## 2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

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

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

# 肿瘤浸润淋巴细胞在结直肠癌中的临床病理分析

秦 誉, 耿敬姝, 张大川

**背景资料**  
肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)是一种有效的抗肿瘤效应细胞。且他在体外杀伤肿瘤细胞具有一定的特异性,而且, TIL需要少量IL-2就可维持其体内抗肿瘤效应,是继LAK细胞后的又一代高效抗肿瘤效应细胞。近年在动物肿瘤模型和临床应用研究中取得一定成就,因而在肿瘤过继免疫治疗中的作用受到重视。

秦誉, 张大川, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 黑龙江省哈尔滨市 150081  
耿敬姝, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 哈尔滨医科大学医学遗传学实验室 黑龙江省哈尔滨市 150081  
秦誉, 住院医师, 医学硕士, 主要从事肿瘤病理的侵袭与转移研究。  
作者贡献分布: 此课题由耿敬姝与秦誉设计; 研究过程由秦誉与张大川操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由耿敬姝提供; 数据分析由秦誉完成; 论文写作由秦誉完成。  
通讯作者: 耿敬姝, 教授, 主任医师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科, 哈尔滨医科大学医学遗传学实验室. jeangeng2004@yahoo.com.cn  
电话: 0451-86298232  
收稿日期: 2009-10-20 修回日期: 2009-11-08  
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

## Clinicopathological characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer

Yu Qin, Jing-Shu Geng, Da-Chuan Zhang

Yu Qin, Da-Chuan Zhang, Department of Pathology, the Tumor Hospital, Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China  
Jing-Shu Geng, Department of Pathology, the Tumor Hospital, Affiliated to Harbin Medical University; Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Professor Jing-Shu Geng, Department of Pathology, the Tumor Hospital, Affiliated to Harbin Medical University; Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, 150 Haping Road, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. jeangeng2004@yahoo.com.cn  
Received: 2009-10-20 Revised: 2009-11-08  
Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinicopathological characteristics and immunohistochemical features of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) in colorectal cancer, and analyze the correlations between the presence of massive TIL and various pathological parameters in colorectal cancer.

**METHODS:** The histopathological features of tumor-infiltrating lymphocytes in 370 cases of colorectal cancer were detected by light microscopy and immunohistochemistry. The correlations between the presence of massive TIL

and various clinicopathological parameters in colorectal cancer were then analyzed.

**RESULTS:** Of 370 cases of colorectal cancer detected, 303 (81.9%) showed mild infiltration of scattered lymphocytes, and 67 (18.1%) showed massive lymphocyte infiltration. The majority of lymphocytes were infiltrated into both the stromal and epithelial components of carcinoma. TIL were often distributed around cancer tissue, and separated cancer tissue from normal tissue. Immunohistochemical staining showed that TIL were mainly composed of CD3<sup>+</sup> T cells, CD20<sup>+</sup> CD79α<sup>+</sup> B cells, and CD56<sup>+</sup> natural killer cells. T-cell-restricted intracellular antigen-1 (TIA-1) was strongly expressed in TIL. Massive lymphocyte infiltration was correlated with tumor differentiation, invasive depth and lymph node metastasis in colorectal cancer ( $\chi^2 = 4.954, 11.240, 12.768; P = 0.026, 0.001, 0.000$ , respectively).

**CONCLUSION:** The clinicopathological characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer vary significantly. The presence of massive tumor-infiltrating lymphocytes is a positive prognostic factor for colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal cancer; Tumor-infiltrating lymphocytes; Immunohistochemistry; Clinicopathology

Qin Y, Geng JS, Zhang DC. Clinicopathological characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3408-3413

## 摘要

**目的:** 探讨结直肠癌中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的临床病理和免疫组织化学特征, 及大量TIL与各病理因素的关系。

**方法:** 利用光镜和免疫组织化学法对370例结直肠癌中的肿瘤浸润淋巴细胞进行组织病理学观察, 并分析对比其与各临床病理因素的相关性。

**结果:** 81.9%的结直肠癌中可见淋巴细胞散在

**同行评议者**  
姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

分布, 数量少, 18.1%却可见大量的淋巴细胞, 并有一定的临床病理特征. 大量的TIL部分侵入肿瘤实质而部分位于肿瘤组织周围. 免疫组织化学染色显示, 肿瘤浸润淋巴细胞主要是由CD3<sup>+</sup>T细胞、CD20<sup>+</sup>、CD79α<sup>+</sup>B细胞、浆细胞和CD56<sup>+</sup>NK细胞构成, 其中细胞毒性TIA-1均有较高的表达, 并伴有大量淋巴细胞浸润与肿瘤组织的分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关( $\chi^2 = 4.954, 11.240$ 及 $12.768; P = 0.026, 0.001$ 及 $0.000$ ).

**结论:** 结直肠癌组织中TIL的病理形态差异较大并与临床病理因素相关. 在结直肠癌中伴有大量肿瘤浸润淋巴细胞存在时有积极意义.

**关键词:** 结直肠癌; 肿瘤浸润淋巴细胞; 免疫组织化学; 临床病理

秦誉, 耿敬姝, 张大川. 肿瘤浸润淋巴细胞在结直肠癌中的临床病理分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3408-3413  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3408.asp>

## 0 引言

肿瘤的临床病理研究日益重要, 直接与疾病的诊断、治疗方案和预后相关. 在肿瘤的病理研究中发现病变部位有免疫细胞的存在. 曾推测淋巴细胞渗入到肿瘤组织内是体内免疫系统抵抗肿瘤的一种现象, 提出肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的初始概念. 此后, 经免疫组织化学研究证实TIL的存在. Rosenberg *et al*<sup>[1]</sup>在动物肿瘤模型上以及临床应用方面研究TIL的抗癌活性, 使开展免疫生物疗法治疗临床恶性肿瘤患者具有可行性. 而在肿瘤的临床病理研究中, 不同的组织器官及不同的病理类型中免疫细胞特别是TIL存在着细胞成分及表型的差异性. 本研究通过对370例结直肠癌进行组织病理特征观察, 了解TIL的组织病理特点, 并分析各病理相关因素和肿瘤浸润性淋巴细胞的关系. 为肿瘤过继免疫治疗研究提供一些病理基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院2007-2008年结直肠癌370例, 所有病例均经HE染色证实为结直肠癌, 且术前均未接受过抗炎药治疗及放、化疗或其他抗肿瘤治疗. 其中男290例, 女80例, 年龄34-71岁. 所有标本均经40 g/L甲醛溶液固定24 h后取肿瘤中心部分制成蜡块, 连续4 μm切片. 分别用于HE和免疫组织化学染色. 鼠

抗人mAb CD3、CD4、CD8、CD20、CD79α、CD56、TIA-1以及检测试剂盒和DAB显色试剂盒均来自北京中杉金桥生物技术有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 HE染色和免疫组织化学染色步骤:** 石蜡包埋, 4 μm切片, 常规脱蜡, 进行HE染色. 应用免疫组织化学MaxVision™法染色. 石蜡切片常规脱蜡和水化后, 浸于EDTA液(pH9.5), 高压修复组织抗原20 min. PBS洗涤; 封闭内源性过氧化物酶; PBS洗涤; 第一抗体孵育过夜; PBS洗涤; 第二抗体MaxVision™试剂孵育10 min; PBS洗涤; DAB显色; 蒸馏水冲洗; 苏木素复染; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 中性树胶封片. 以PBS液代替一抗作为阴性对照. 用已知阳性淋巴结切片作阳性对照.

**1.2.2 形态观察:** 病理形态学观察和免疫组织化学检测. 每例首先在低倍镜下(×100)观察肿瘤组织的分化程度、浸润深度、淋巴结转移以及肿瘤浸润淋巴细胞分布情况等临床病理特征. 然后在高倍光镜下(×400), 观察肿瘤组织周围浸润淋巴细胞的组织病理特征及免疫表型.

**统计学处理** 全部资料均采用SPSS13.0统计软件进行分析, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验.  $P < 0.05$ 表示差异有显著意义.

## 2 结果

**2.1 TIL在结直肠癌中的组织病理特征** 结直肠癌中浸润性免疫细胞以淋巴细胞为主(淋巴细胞核相对很大, 细胞质极少. 核内染色质多, 染色较深. 核圆形深染, 核周围浅染, 胞质蓝灰色. 在高倍镜下可以识别, 并且通过免疫组织化学CD3、CD20、CD79α、CD56确定和分类). 观察肿瘤浸润淋巴细胞的组织病理学特征, 发现肿瘤组织浸润淋巴细胞的数量和分布情况有很大的差异. 81.9%例病例(303/370)中可以看到淋巴细胞散在分布, 数量少, 有时在一个高倍视野甚至看不到淋巴细胞(图1A). 部分可以散在分布正常组织中或是肿瘤坏死组织里. 但有18.1%例病例(67/370)中却可以见到大量的淋巴细胞(TIL ≥ 50 淋巴细胞/100肿瘤细胞), 并有一定的临床病理特征. 大量的TIL存在有一部分侵入肿瘤实质而部分位于肿瘤组织周围, 浸润在肿瘤组织中和周围, 呈弥漫片状分布(图1B). 常围绕癌组织并将癌组织与正常组织分离, 空隙样存在, 与正常组织界线较清晰(图1C). 这种病理现象的形成不是单有TIL, 较多时候是TIL和大量的中性粒细

**研发前沿**  
近年来, TIL与肿瘤的关系日益受到人们的重视, 应用TIL进行肿瘤免疫治疗的研究也成为热点.



### 创新盘点

近来关于TIL在肿瘤的临床试验和免疫治疗方面的研究较多,而对其临床病理特征的研究及其意义较少并有分歧.本研究针对结直肠癌中TIL进行组织病理及免疫组织化学特点分析研究,并探讨了大量浸润淋巴细胞对肿瘤组织的影响和关系.

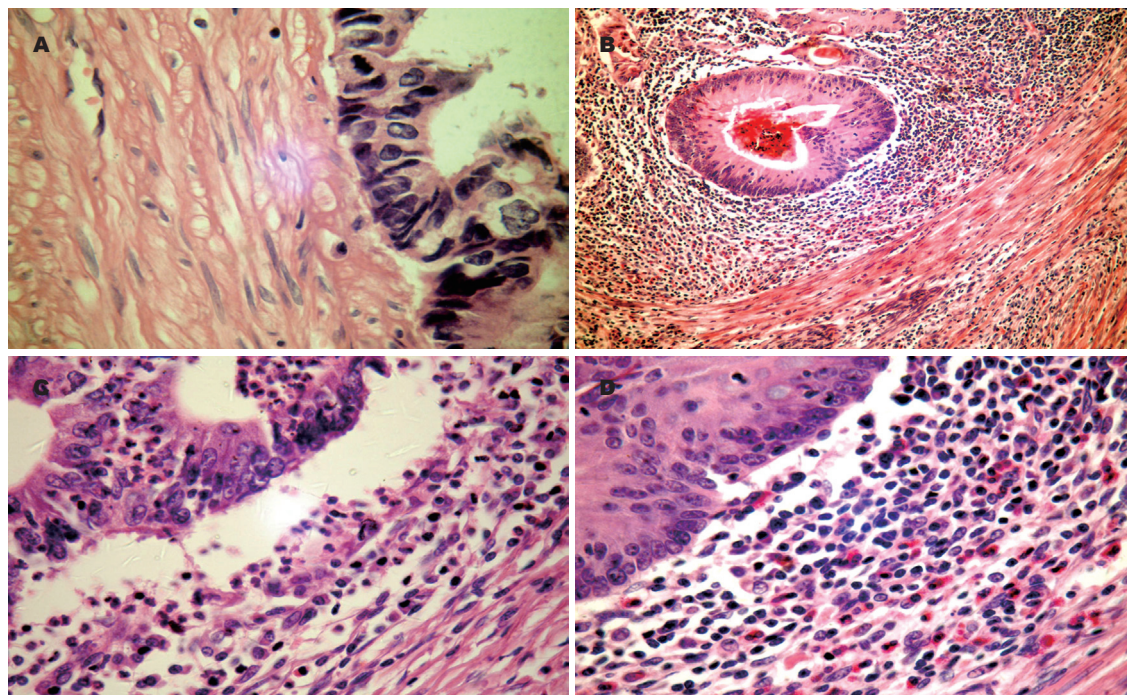


图1 TIL在结直肠癌中的组织病理特征. A: 高倍视野甚至看不到淋巴细胞( $\times 400$ ); B: 浸润在肿瘤组织间质中及周围( $\times 100$ ); C: 将癌组织与正常组织分离, 空隙样存在( $\times 400$ ); D: 可见大量的嗜酸性粒细胞( $\times 400$ ).

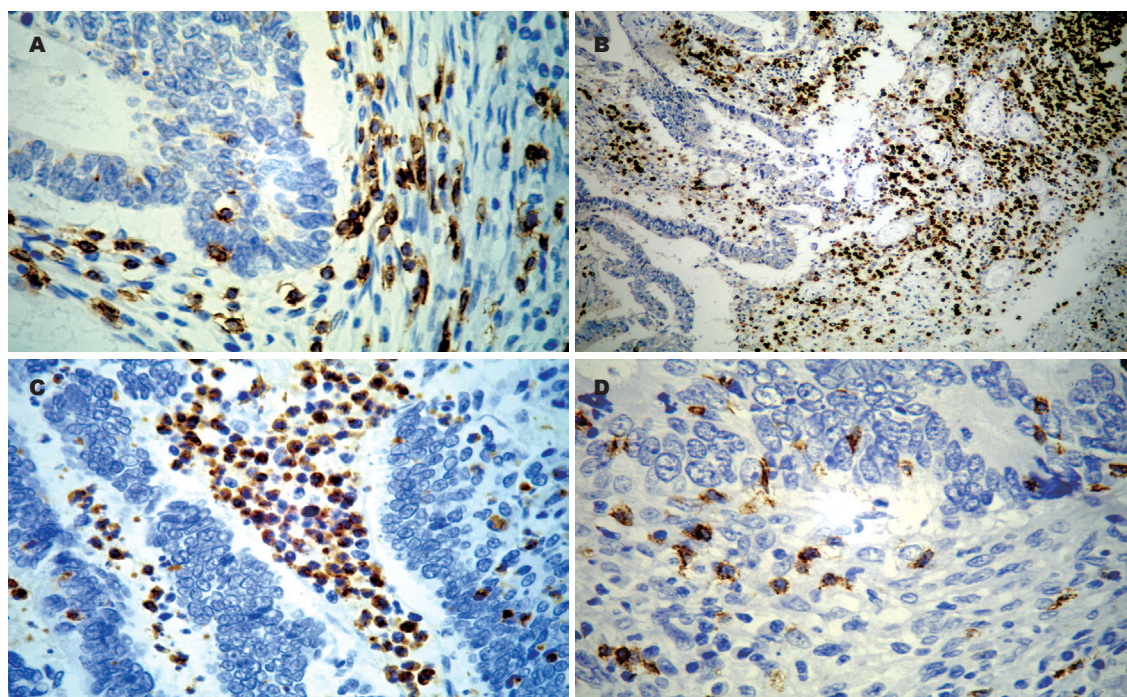


图2 TIL免疫组织化学特征. A:  $CD3^+$  T细胞( $\times 400$ ); B:  $CD79\alpha^+$ B细胞, 浆细胞( $\times 100$ ); C: TIA-1有较高表达( $\times 400$ ); D:  $CD8^+$ 细胞( $\times 400$ ).

胞、嗜酸性粒细胞共同完成(图1D). (中性粒细胞胞质淡红色, 胞核幼稚型的呈杆状或马蹄形, 成熟的呈分叶状, 三叶的较多见. 嗜酸性粒细胞直径13-15  $\mu m$ , 胞质内充满粗大、整齐、均匀、紧密排列的砖红色或鲜红色嗜酸性颗粒, 遮光性强. 细胞核的形状与中性粒细胞相似, 通常有

2-3叶). 与TIL在一起形成了一定特点的大量免疫细胞的病理分布.

**2.2 TIL免疫组织化学特征** 肿瘤浸润淋巴细胞主要是由 $CD3^+$  T细胞、 $CD20^+$ 、 $CD79\alpha^+$ B细胞、浆细胞和 $CD56^+$ NK细胞构成. 其中细胞毒性TIA-1均见有较高表达.  $CD3^+$  T细胞以 $CD8^+$ 细胞为主,



表 1 TIL浸润与临床病理参数

| 临床病理参数 | n   | 伴有大量TIL浸润 |     | $\chi^2$ 值 | P值    |
|--------|-----|-----------|-----|------------|-------|
|        |     | 有         | 无   |            |       |
| 年龄(岁)  |     |           |     |            |       |
| <60    | 234 | 45        | 189 | 0.541      | 0.462 |
| 60     | 136 | 22        | 114 |            |       |
| 性别     |     |           |     |            |       |
| 男      | 290 | 50        | 240 | 0.679      | 0.410 |
| 女      | 80  | 17        | 63  |            |       |
| 浸润深度   |     |           |     |            |       |
| 未及浆膜   | 133 | 36        | 97  | 11.240     | 0.001 |
| 浆膜或以外  | 237 | 31        | 206 |            |       |
| 组织分化   |     |           |     |            |       |
| 高中     | 170 | 39        | 131 | 4.954      | 0.026 |
| 低      | 200 | 28        | 172 |            |       |
| 淋巴结转移  |     |           |     |            |       |
| 有      | 149 | 14        | 135 | 12.768     | 0.000 |
| 无      | 221 | 53        | 168 |            |       |
| 合计     | 370 | 67        | 303 |            |       |

CD4<sup>+</sup>细胞较少(图2)。

**2.3 临床病理因素分析** 对370例结直肠癌组织的各种临床病理因素进行观察。根据肿瘤浸润淋巴细胞的情况把病例分为伴有大量淋巴细胞浸润(TIL $\geq$ 50淋巴细胞/100肿瘤细胞)和无大量淋巴细胞浸润(TIL<50淋巴细胞/100肿瘤细胞)。有无大量淋巴细胞浸润与肿瘤分化程度、淋巴结转移和浸润深度有统计学意义( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。而与年龄和性别无统计学意义( $P>0.05$ , 表1)。

### 3 讨论

在许多疾病中均可以见到淋巴细胞等炎性细胞浸润。是机体对内外因素影响免疫反应, 其有保护也有破坏作用。在免疫性疾病中起到重要作用。随着肿瘤免疫治疗的研究, 发现TIL体外杀伤肿瘤细胞具有一定的特异性, 而且, TIL需要少量IL-2就可维持其体内抗肿瘤效应<sup>[2]</sup>, 与LAK细胞比较TIL具有更强抗肿瘤活性。TIL具有较强的杀伤力, 主要是TIL更具有识别肿瘤细胞的能力。TIL细胞的临床应用是继LAK细胞疗法之后的杀伤自体瘤细胞的又一种免疫疗法。Rosenberg *et al*, Dudley *et al*应用TIL静脉回输并联合IL-2、CTX治疗恶性黑色素瘤, 达到部分或完全消退<sup>[1-3]</sup>。Rosenberg实验室采用TIL对化疗无效的晚期恶性黑色素瘤患者行免疫替代疗法治疗, 结果获得部分缓解和混合性疗效。国内学者报道, 肝癌患者手术后, 采用TIL辅助治疗可以

缓解病人临床症状。王志勇 *et al*<sup>[4]</sup>发现TIL在细胞因子, 特别是IL-2协同下, 瘤灶内注射的局部免疫疗法, 具有较强的抗膀胱癌效应, 并显著提高了机体全身抗癌免疫功能。

目前, 临床应用的TIL细胞主要来源于手术切除或活检所得的瘤体组织、癌性胸水、腹水中淋巴细胞及转移淋巴结。国内外实验室分离培养TIL方法很多, 大多采用淋巴细胞分离液进行非连续密度梯度离心法。

肿瘤浸润淋巴细胞是继LAK细胞后的又一代高效抗癌效应细胞。尽管有着许多优点, 但是TIL的免疫治疗仍有诸多不足, 有效率仍不高。这可能与肿瘤的免疫逃逸及个体差异有关。在肿瘤的临床病理中发现的TIL的相关病理特征在不同组织器官、不同肿瘤来源及不同的病理分型均存在较大的差异性。其存在的意义也有较大的争议。

本试验发现在结直肠癌组织TIL的病理形态同样差异很大, 大多数病例的病理中的只能见到少量或缺乏TIL。370例中303例(81.9%)看到淋巴细胞散在分布, 数量少, 有时在一个高倍视野甚至看不到淋巴细胞。部分可以散在分布正常组织中或是肿瘤坏死组织里。这与恶性肿瘤患者的免疫系统在肿瘤局部和全身都处于耐受或缺陷状态相一致。肿瘤在体内经历了多因素、多步骤长期发展变化过程, 其抗原也经历了人体免疫系统的筛选, 肿瘤相关抗原基本上被自体免疫系统默认为自身抗原, 形成严密的耐受<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞能直接使与之接触的T细胞朝着Th2方向极向化, 并促进遭遇的T细胞产生IL-4, 下调IFN- $\gamma$ 的产生, 产生Th2样免疫。Sheu认为这种作用主要由IL-10介导, TGF- $\beta$ 仅起协同作用<sup>[6]</sup>。Fas/FasL系统: 近年的研究发现FasL在肿瘤细胞表达增加与肿瘤免疫抑制有密切关系<sup>[7-8]</sup>。

但研究发现有些病例67例(18.1%)中却可以见到大量的淋巴细胞, 并有一定的临床病理特征。有一部分侵入肿瘤组织内而另一部分位于肿瘤组织周围弥漫片状分布。这种病理现象的形成不是单有TIL, 常常是由TIL和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞共同完成。浸润在肿瘤组织中和周围。呈弥漫片状分布。常围绕癌组织并将癌组织与正常组织分离, 空隙样存在。与正常组织界线较清晰。伴有大量淋巴细胞浸润与肿瘤组织的分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。有其存在时肿瘤组织的分化程度较好, 浸润深度浅和淋巴结转移少。此现象这

**应用要点**  
本研究提示, 结直肠癌组织中TIL的病理形态差异较大并与临床病理因素相关。伴有大量肿瘤浸润淋巴细胞存在时有积极的意义。为肿瘤的过继免疫治疗研究提供了一些病理基础。

## 同行评价

本研究提出了TIL大多存在于肿瘤组织的分化程度较好,浸润深度低和淋巴结转移少的结直肠癌组织中的研究结论,具有一定的临床参考价值。

也说明了TIL的抗肿瘤特性。这与TIL中存在大量效应细胞有关。而与年龄和性别无统计学意义( $P>0.05$ ),这可能是受住院病例多已是中晚期影响。免疫组织化学显示,主要是由CD3<sup>+</sup>T细胞,CD20<sup>+</sup>、CD79 $\alpha$ +B细胞、浆细胞和CD56+NK细胞组成。其中细胞毒性TIA-1均见有较高表达。并且CD3<sup>+</sup>T细胞以CD8<sup>+</sup>细胞为主,CD4<sup>+</sup>细胞较少。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比值小于1。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比值在机体免疫反应及免疫调节中具有重要作用,其变化反映出机体免疫状态的变化<sup>[9]</sup>。已有研究显示TIL中CD3<sup>+</sup>T细胞与较好的临床预后有关,尤其是在肿瘤实质中出现<sup>[10-11]</sup>。特别是CD8<sup>+</sup>T细胞亚群<sup>[12-15]</sup>,提示细胞毒性淋巴细胞在肿瘤免疫中起重要作用。此外在病例中可以看到大量中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,他们一方面通过自身作用,另一方面还可以通过调节淋巴细胞活性而发挥抗肿瘤效应<sup>[16]</sup>。可见机体抗肿瘤是有多种免疫细胞共同来完成。

TIL细胞杀伤肿瘤细胞主要依赖其中的CTL细胞的有效激活和有效行使功能。T细胞转化为效应细胞,需要有2个刺激信号,第一激活信号由TCR与抗原肽-MHC分子复合物结合提供;第二激活信号由T细胞上的CD28与抗原提呈细胞(APC)上B7分子结合提供<sup>[17]</sup>。通过该途径杀伤肿瘤细胞机制目前已清楚,另外研究证明TIL杀伤肿瘤还有3条途径:(1)Fas介导的细胞凋亡,其主要机制为淋巴细胞通过表面的Fas配体(FasL)与靶细胞上的Fas结合,引起细胞DNA片段化,导致细胞发生凋亡;(2)穿孔素/颗粒酶B介导的细胞凋亡;(3)TIL分泌一些细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等介导的细胞溶解与凋亡,该途径可通过释放颗粒或直接细胞接触杀伤靶细胞<sup>[18]</sup>。

是否每个患者都适合TIL的免疫治疗有待进一步研究。本试验研究在结直肠癌中伴有大量肿瘤浸润淋巴细胞存在(特别是形成一定的病理组织特点)时有积极的意义。并发现大多的肿瘤组织中的浸润淋巴细胞较少,细胞免疫显然已经不能对肿瘤细胞起到杀伤作用或者肿瘤细胞对TIL免疫逃逸,此时提取的TIL体外培养回输治疗是否还会有效有待进一步临床试验研究。是否要与临床相关病理因素结合有待探讨价值。

## 4 参考文献

- 1 Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*

2008; 8: 299-308

- 2 Heemskerk B, Liu K, Dudley ME, Johnson LA, Kaiser A, Downey S, Zheng Z, Shelton TE, Matsuda K, Robbins PF, Morgan RA, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 496-510
- 3 Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 233-240
- 4 王志勇, 于满, 张利国, 高树欣, 赵立军. 肿瘤浸润性淋巴细胞在白细胞介素-2、-4协同下局部过继免疫治疗膀胱癌的实验研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 275-277
- 5 Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* 2006; 84: 532-543
- 6 Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 369-376
- 7 Ohta T, Elnemr A, Kitagawa H, Kayahara M, Takamura H, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi SQ, Miwa K. Fas ligand expression in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2004; 12: 749-754
- 8 Lim SC. Fas-related apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10: 57-63
- 9 Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 354-361
- 10 Tomsova M, Melichar B, Sedláková I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 415-420
- 11 Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 2008; 222: 101-116
- 12 Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnajatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18538-18543
- 13 Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3360-3365
- 14 Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, Kalloger S, Han G, Ceballos K, Cadungog MG, Huntsman DG, Coukos G, Gilks CB. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 2009; 22: 393-402
- 15 Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogeboom BN, ten Hoor KA, Hollema H, Boezen HM, van der Zee AG, Daemen T, Nijman HW. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage



- ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 449-459
- 16 Jakóbsiak M, Lasek W, Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 2003; 90: 103-122
- 17 Fan K, Wang H, Wei H, Zhou Q, Kou G, Hou S, Qian W, Dai J, Li B, Zhang Y, Zhu T, Guo Y. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation* 2007; 84: 746-754
- 18 Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

**本刊讯** 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

#### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (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 2009-11-28)

# 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展

申川, 高健, 赵彩彦

**背景资料**  
NAFLD在我国已成为仅次于病毒性肝炎的第二大慢性肝病,但其发病机制尚未完全阐明,治疗上也缺乏有效措施。国内外学者经过数十年的努力,使NAFLD动物模型的研究有了很大进展,许多动物模型已用于NAFLD发病机制及药物防治的研究中,并取得一定成绩,但至今仍缺乏能涵盖人类NAFLD整个疾病谱的单一动物模型。因此,建立理想的动物模型成为亟待解决的问题。

申川, 赵彩彦, 河北医科大学附属第三医院感染科 河北省石家庄市 050051  
高健, 河北医科大学附属第三医院肝胆外科 河北省石家庄市 050051  
作者贡献分布: 申川、高健及赵彩彦对此文所作贡献均等; 本文由申川与高健综述; 赵彩彦审校。  
通讯作者: 赵彩彦, 教授, 主任医师, 博士生导师, 050051, 河北省石家庄市, 河北医科大学第三医院感染科。  
zhaocy2005@163.com  
电话: 0311-88602050 传真: 0311-87023626  
收稿日期: 2009-10-02 修回日期: 2009-11-04  
接受日期: 2009-11-06 在线出版日期: 2009-11-28

## Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: recent advances

Chuan Shen, Jian Gao, Cai-Yan Zhao

Chuan Shen, Cai-Yan Zhao, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China  
Jian Gao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China  
Correspondence to: Professor Cai-Yan Zhao, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. zhaocy2005@163.com  
Received: 2009-10-02 Revised: 2009-11-04  
Accepted: 2009-11-06 Published online: 2009-11-28

## Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) refers to a wide spectrum of disorders that range from simple steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis, and cirrhosis. NAFLD is associated strongly with the components of metabolic syndrome, such as obesity, diabetes and insulin resistance. To date, the pathogenesis of NAFLD has not been well elucidated, and few effective therapeutic approaches for NAFLD are available. The development of animal models of NAFLD can enhance our understanding of its pathogenesis. In this article, we will review the recent advances in animal models currently available for studying NAFLD.

**Key Words:** Fatty liver; Nonalcoholic; Animal model

Shen C, Gao J, Zhao CY. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: recent advances. *Shijie Huaren*

*Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3414-3419

## 摘要

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化及肝硬化的一组疾病,与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗等代谢综合征的相关组分关系密切。NAFLD的发病机制目前尚未完全阐明,治疗上也缺乏有效措施,建立高质量的动物模型有助于对疾病的深入研究。本文综述了常用NAFLD动物模型的特点及研究进展。

**关键词:** 脂肪肝, 非酒精性; 动物模型

申川, 高健, 赵彩彦. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(33): 3414-3419  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3414.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一系列除外酒精和其他明确损肝因素所致的,以肝实质细胞脂肪堆积为主要特征性疾病,可从单纯性脂肪肝经非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),发展为肝纤维化,甚至导致肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)或肝功能衰竭等终末期肝病<sup>[1]</sup>。流行病学资料显示,NAFLD不单纯是肝脏疾病,而是肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等代谢综合征相关组分在肝脏的集中体现<sup>[2]</sup>,其中胰岛素抵抗和遗传易感性与其发病密切相关。近年来,随着生活水平的提高及饮食结构的改变,NAFLD在我国已成为仅次于病毒性肝炎的第二大慢性肝病,但其发病机制尚未完全阐明,治疗上也缺乏有效措施。因此,建立稳定可靠,与人类病变相似,疾病谱完整;具备代谢综合征相关组分表现,能更好地模拟人类NAFLD时全身代谢紊乱背景;模型形成率高,死亡率低,可重复性好;造模方法简便易行,对试验人员无害,价格低廉;造模终止后组织学病变

**同行评议者**  
杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院 消化内科

逆转缓慢, 便于进行药物干预实验的NAFLD动物模型成为亟待解决的问题。目前, 国内外用于科学研究的NAFLD动物模型主要包括3类: 一类为基因敲除或基因突变模型; 一类为营养、药物或毒物诱发模型; 另一类则为复合模型(联合应用基因模型和营养模型)<sup>[3]</sup>。三类模型的主要原理均集中在肝内脂肪酸摄入、合成、酯化与氧化分解、输出的不平衡上。

## 1 基因敲除或基因突变模型

**1.1 ob/ob小鼠和db/db小鼠(或fa/fa大鼠)模型** ob/ob小鼠存在ob基因(瘦素编码基因)自发突变, 使得瘦素合成障碍, 出现许多与人类NAFLD一致的特征, 如肥胖、高胰岛素血症、高脂血症、糖尿病、脂肪肝等<sup>[4]</sup>, 是国外最常用的NAFLD动物模型。与人类NAFLD不同, ob/ob小鼠虽有明显胰岛素抵抗, 但不能自发地由单纯性脂肪肝发展至NASH, 只有在给予蛋氨酸-胆碱缺乏(methionine-choline deficiency, MCD)饮食或高脂饮食(high fat diet, HFD)或在内毒素、酒精、缺血再灌注损伤等损肝因素的“二次打击”下, 方可演变为显著NASH, 并见促炎与抑炎细胞因子失衡, 甚至动物可出现急性死亡, 这表明脂肪变使肝脏易于遭受氧化应激及活性氧(reactive oxidative species, ROS)介导的损伤<sup>[5]</sup>。另有研究<sup>[6-7]</sup>发现, 由于瘦素缺乏, 抑制了转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)介导的星状细胞活化, 即使在四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)的干预下, ob/ob小鼠也不会出现肝纤维化。以上特点说明瘦素在肝损伤及肝纤维化进程中具有重要作用, 使该小鼠成为研究由脂肪变向NASH进展、NASH向纤维化进展及星状细胞功能的良好模型。db/db小鼠(或fa/fa大鼠)则由于db基因或fa基因(瘦素受体编码基因)突变, 导致瘦素受体丧失功能, 失去信号转导活性, 引起瘦素抵抗或不伴高瘦素血症, 出现与ob/ob小鼠相似的遗传表型。

**1.2 FLS小鼠(fatty liver shionogi mouse)模型** Soga *et al*<sup>[8]</sup>通过同系交配方法建立了一种无过度摄食、不出现肥胖和糖尿病而伴有脂肪肝的新品种。新生FLS小鼠全肝小叶肝细胞内即有细小脂肪颗粒聚集, 并随年龄增长进行性加重, 肝脏甘油三酯(triglyceride, TG)含量较同龄dd Shionogi(DS)小鼠升高5倍, 而血脂多无异常。2-4 mo时小鼠肝脏内可见单核细胞浸润及成簇泡沫细胞出现, 伴血清丙氨酸氨基转移

酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶水平升高, 提示炎症反应及肝细胞损伤; 4-6 mo时肝细胞内大脂滴数量较前减少; 12 mo的FLS小鼠多易自发形成肝细胞腺瘤(hepatocellular adenoma, HCA)和/或HCC, 且雄性小鼠HCC发生率明显高于雌性小鼠, 但未见肝硬化发生<sup>[8-9]</sup>。杂交实验<sup>[8]</sup>提示FLS小鼠的脂肪肝具有复杂的多基因特征。因此, FLS小鼠可作为人类非肥胖而伴有脂肪肝和人类NASH相关HCC机制研究的模型。

**1.3 脂肪酸转位酶FAT/CD36缺失小鼠模型** FAT/CD36是介导长链脂肪酸跨膜转运的重要膜蛋白, 主要表达于外周的肌肉及脂肪组织<sup>[10]</sup>。CD36<sup>-/-</sup>小鼠脂肪酸储存和利用减少60%以上, 循环中脂肪酸及TG水平显著上升, 过多的脂肪酸转运至肝脏, 超过其β-氧化能力, 引起肝脏脂质代谢紊乱及胰岛素抵抗, 形成脂肪肝<sup>[10-11]</sup>。

**1.4 乙酰辅酶A氧化酶(acyl-coenzyme A oxidase, AOX)缺乏小鼠模型** AOX是过氧化物酶体长链脂肪酸β-氧化的限速酶, 并能产生过氧化氢<sup>[5,12]</sup>。AOX<sup>-/-</sup>小鼠起初表型多正常; 2 mo时出现严重的弥漫性肝脂肪变; 前4 mo内可见肝细胞坏死及点灶状脂肪性肝炎, 伴以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润; 4-5 mo时肝细胞内过氧化物酶体增殖物激活受体α(peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPARα)活化, 细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)4A家族基因表达上调, 过氧化氢水平升高; 后自出现肝细胞再生, 新生肝细胞内无脂肪空泡, 但过氧化物酶体数量增加, 肝脂肪酸氧化能力代偿性增强, 6-8 mo时肝脂肪变可完全逆转; 15 mo时可出现HCA或HCC<sup>[5,13]</sup>。Hashimoto *et al*<sup>[14]</sup>发现, AOX<sup>-/-</sup>小鼠若同时存在PPARα缺失, 肝脂肪变、炎症及细胞损伤可显著减轻, HCA发生率降低, 可能与PPARα诱导CYP4A功能受阻有关。

**1.5 线粒体三功能蛋白酶(mitochondrial trifunctional protein, MTP)缺失小鼠模型** MTP是线粒体脂肪酸β-氧化的关键酶。近年研究<sup>[15-16]</sup>发现, 杂合子若存在MTPα亚单位突变, 血清ALT水平随年龄增长进行性升高, 9-10 mo时出现肝脂肪变、高胰岛素血症、胰岛素抵抗及糖耐量受损。该小鼠在表型上与人类NAFLD很相似, 并伴有肝脏氧化应激增强, 主要体现在超氧化物歧化酶抗氧化活性增加、谷胱甘肽(glutathion, GSH)水平降低及CYP2E1表达增强。

以上特殊品系动物模型因基因突变或缺失,

**相关报道**  
Soga *et al*通过同系交配方法建立了一种无过度摄食、不出现肥胖和糖尿病而伴有脂肪肝的新品种。Yin *et al*给2组雄性CD-1(ICR)BR Swiss大鼠一次性口服四环素0.1 g/kg或1 g/kg后, 高剂量组大鼠在24 h即可见肝细胞小泡性脂肪变, 伴胆固醇、TG合成增加及脂肪酸β-氧化受抑制。



### 应用要点

本研究提示,今后的研究应更多地致力于纯系动物的培养及营养饮食配方的改良,并引进新技术探索新的造模方法,建立统一的动物模型标准评价体系,更客观地反映动物模型的复制率、稳定性及科研应用价值。

引起脂肪酸代谢障碍,能自发形成脂肪肝,且伴肥胖、胰岛素抵抗等代谢综合征相关组分,易形成HCA或HCC,但多缺乏NASH和肝纤维化的自然演变过程,仅适合NAFLD特定发病机制的研究。

## 2 营养、药物或毒物诱发模型

### 2.1 营养诱发模型

**2.1.1 MCD饮食模型:**他是国际上经典的NASH动物模型。MCD饮食喂养的啮齿类动物(大鼠和小鼠),肝组织出现腺泡3区严重脂肪变,随后见到以淋巴细胞和多形核白细胞浸润为主的坏死性炎症,进一步发展形成细胞周围及中央静脉周围纤维化<sup>[3,17]</sup>。其发生机制与蛋氨酸、胆碱缺乏导致线粒体 $\beta$ -氧化功能障碍和极低密度脂蛋白合成减少有关<sup>[3,17]</sup>。经MCD饮食诱导的小鼠,2 wk即可形成NASH,肝脏内可见活化的巨噬细胞浸润,伴相关炎症细胞因子、黏附分子、骨桥蛋白及环氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)等表达增加<sup>[18-22]</sup>,而核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)的激活是NASH炎症级联反应的中心环节<sup>[19-20]</sup>。McCuskey *et al*<sup>[23]</sup>研究发现, MCD饮食诱导的NASH小鼠存在肝脏微循环功能障碍。此外,小鼠肝脏微粒体CYP2E1  $\omega$ -氧化产生的ROS增加, GSH, S-腺苷蛋氨酸等抗氧化物质缺失,诱导了氧化应激及脂质过氧化;而CYP2E1的过度表达还能影响肝脏胰岛素信号通路,导致肝脏胰岛素抵抗<sup>[5,24]</sup>。经MCD饮食诱导的Sprague-Dawley(SD)大鼠,其NASH进展缓慢:2 wk时出现脂肪变及氧化应激;5 wk时出现炎症伴ALT轻度升高;12 wk时出现纤维化<sup>[3,17]</sup>。MCD饮食相关NASH的严重程度在不同种系、品系、性别及遗传背景的动物间存在差别,如Wistar大鼠脂肪变最严重, C57BL-6小鼠炎症坏死最明显,雄性鼠对营养性肝损伤易感性更高等,反映了NASH的个体差异<sup>[3,25]</sup>。与其他NAFLD模型相比, MCD饮食模型有更明显的氧化应激、线粒体DNA损伤及细胞凋亡;与人类NASH相比,动物多出现恶病质、ALT水平过高、TG水平过低、肝质量/体质量比值降低及不引起外周胰岛素抵抗等<sup>[26]</sup>。目前,该模型主要用于NASH及肝纤维化的机制及药物干预研究,并可为非肥胖而伴NASH等特殊脂肪营养障碍疾病提供研究思路。

**2.1.2 HFD模型:**HFD诱导的NASH模型在发病机制上与人类NASH最相似,且多合并肥胖、胰岛素抵抗及其他代谢综合征的组分。HFD配

方有多种,但构造原理基本一致(增加游离脂肪酸的摄取或合成),主要差别在于饮食中脂肪占供能物质的比例不等(10%-71%),含或不含高碳水化合物。有研究<sup>[12]</sup>表明脂肪含量占28%以上的饮食可使动物出现肥胖。目前,鼠类是国内外最常用的NAFLD动物模型。(1)小鼠: HFD喂养的C57BL-6小鼠可作为复制代谢综合征的较好模型<sup>[27-28]</sup>。随年龄增长,该小鼠易形成肥胖、高胰岛素血症、糖耐量受损,给予脂肪占55%的饮食喂养6 mo,上述表现加重伴组织学上出现小泡或大泡性肝脂肪变,并有固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP)-1c、SREBP-2及酰基-辅酶A去饱和酶1表达增加<sup>[5,29]</sup>。Li *et al*<sup>[30-31]</sup>发现HFD喂养的小鼠血清白细胞介素12水平升高2倍,并参与肝脏NKT细胞凋亡,导致Th1与Th2类细胞因子失衡,使T淋巴细胞向Th1方向分化,伴干扰素- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )表达增加;经低剂量脂多糖处理后,该小鼠ALT水平升高,出现与ob/ob小鼠程度类似的肝组织炎症坏死表现,说明HFD可影响动物的先天性免疫状态。Deng *et al*<sup>[32]</sup>通过留置胃管强制喂食的方法使C57BL-6小鼠体质量增加71%,伴高糖血症、高瘦素血症及胰岛素抵抗;其中46%的小鼠形成NASH,伴ALT升高5-6倍,肝组织学显示中性粒细胞浸润及窦周、细胞周围纤维化形成,与人类NASH极相似。Hill-Baskin *et al*<sup>[33]</sup>发现,长期应用HFD喂养雄性C57BL-6小鼠,易形成NASH及HCC,并揭示以Myc及NF- $\kappa$ B为中心的信号通路在其发病机制中的重要作用。因此,该小鼠还可用于由基因控制及饮食诱导共同作用所致HCC的机制研究。(2)大鼠: Xu *et al*<sup>[34]</sup>应用HFD(标准饲料88 g,猪油10 g,胆固醇2 g)饲养雄性SD大鼠,4 wk时出现肝脂肪变;8 wk时呈现单纯性脂肪肝;12 wk时形成脂肪性肝炎,伴ALT水平升高;24 wk时出现明显窦周纤维化;36-48 wk纤维化加剧,并出现胰岛素抵抗。Lieber *et al*<sup>[35]</sup>应用HFD(脂肪71%)喂养SD大鼠,3 wk时形成胰岛素抵抗,出现肝脂肪变、炎症等组织学改变,电镜提示肝细胞线粒体超微结构损伤,伴血清胰岛素、TNF- $\alpha$ 、4-羟基壬烯酸、CYP2E1及I型胶原含量增加,说明肝脏存在氧化应激,其研究结果符合人类NASH发病机制的“二次打击”学说。此外,经留置胃管给大鼠灌注高脂肪乳剂6 wk亦可诱发NASH,伴肥胖、高脂血症和胰岛素抵抗<sup>[36]</sup>。灌胃法成型时间短,肝组织病理表现与

人类NASH更接近, 但对实验人员技术要求较高, 操作不慎可造成动物窒息死亡。

**2.1.3 高碳水化合物饮食模型:** 高蔗糖/果糖饮食可使Wistar大鼠及SD大鼠形成脂肪肝, 尤以前者为甚。在Wistar大鼠的饮用水中加入10%蔗糖, 48 h内即能在其体内观察到脂肪酸合成增加<sup>[12]</sup>。SD大鼠经含糖量极高(蔗糖70%)的饮食喂养后出现肥胖, 2-3 wk可形成脂肪肝, 伴参与脂肪合成的酶类及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成增加<sup>[12]</sup>。此外, 用含糖65%的饮食喂养C57BL-6小鼠8 wk, 出现了肥胖、胰岛素抵抗及肝细胞大泡性脂肪变; 与正常组比较, 肥胖组肝细胞Fas的表达及凋亡率也明显增加<sup>[12]</sup>。以上实验均证实, 雄性鼠比雌性鼠对高碳水化合物诱导的肝损伤更具易感性。

## 2.2 药物或毒物诱发模型

**2.2.1 四环素诱发模型:** Yin *et al*<sup>[37]</sup>给2组雄性CD-1(ICR)BR Swiss大鼠一次性口服四环素0.1 g/kg或1 g/kg后, 高剂量组大鼠在24 h即可见肝细胞小泡性脂肪变, 伴胆固醇、TG合成增加及脂肪酸 $\beta$ -氧化受抑制。另有报道<sup>[12]</sup>称, 经四环素单次诱导即可使肝脏TG水平增加270%, 并出现小泡性脂肪变。Letteron *et al*<sup>[38]</sup>采用腹腔注射四环素0.25 mmol/kg的方法也获得了类似结果。其主要机制是四环素沉积于肝细胞线粒体, 抑制线粒体DNA复制, 干扰mRNA翻译成载脂蛋白, 继而影响肝内TG的转运及线粒体脂肪酸 $\beta$ -氧化, 诱发肝细胞脂肪变性。

**2.2.2 CCl<sub>4</sub>诱发模型:** 最早、最广泛用于制备实验性脂肪肝、肝纤维化的模型。Chung *et al*<sup>[39]</sup>给大鼠皮下注射CCl<sub>4</sub> 0.5 mL/kg, 每周3次, 短时间内即可观察到中央静脉周围中重度大泡性肝细胞脂肪变, 伴炎症及坏死; 6 wk可出现肝纤维化; 12 wk可见肝硬化。主要机制可能与CCl<sub>4</sub>诱导CYP2E1激活及严重脂质过氧化反应造成肝细胞结构和功能破坏有关。

MCD饮食模型虽能产生典型的NASH和肝纤维化的组织学改变, 但不符合人类NASH患者的膳食结构, 不能复制代谢综合征, 且动物出现体质量减轻正好与人类肥胖相关NASH相反。HFD模型模拟了人类NASH的致病机制, 能出现胰岛素抵抗、代谢综合征等全身代谢紊乱表现, 肝脏病变多具有渐进性发展的特点, 但其成型时间较长, NASH及纤维化程度还取决于动物品系、饮食中脂肪所占比例及诱导时间长短。药物或毒物诱导模型具有成型时间短、方

法简便、病变明显等特点, 但其最大缺陷是未出现肥胖和胰岛素抵抗, 这与人类NAFLD的病理生理特点差异较大, 且动物肝损伤严重, 死亡率高。

## 3 复合模型

由于基因模型和营养模型的表型均与人类NASH存在一定差异, 不能完全涵盖人类NAFLD的疾病谱及发病机制。近年来, 许多学者在基因模型的基础上联合应用营养、药物诱发模型, 试图使新模型的表型与人类NAFLD更接近, 并能反映疾病从单纯性脂肪肝向NASH进展, NASH向肝纤维化进展的过程。常见复合模型包括: ob/ob小鼠+MCD饮食, db/db小鼠+MCD饮食, Abcb11小鼠+MCD饮食, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠+HFD, PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠+MCD饮食等, 这些模型均能形成典型NASH的组织学改变。db/db小鼠+MCD饮食模型较ob/ob小鼠+MCD饮食模型有更严重的炎症及细胞周围纤维化, 且病变出现时间明显缩短; 另外, 该小鼠还表现出更高的ALT, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 及I型前胶原mRNA水平, 伴肥胖、高胰岛素血症及高瘦素血症<sup>[40]</sup>。PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠经MCD饮食诱导后出现较对照组更显著的NASH表现, 而用PPAR $\alpha$ 激动剂干预MCD饮食喂养的C57BL-6小鼠, 可使脂肪变或脂肪性肝炎减轻或逆转, 说明PPAR $\alpha$ 介导的脂肪酸处理途径在鼠类单纯性脂肪肝及NASH形成过程中的重要作用<sup>[18,41]</sup>。近年有研究通过HFD喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠或iNOS<sup>-/-</sup>, 均成功建立了NASH模型<sup>[42-43]</sup>。由于复合模型最大程度地模拟了人类NAFLD的复杂性, 病理变化显著, 是一种极具潜力的NASH模型。

## 4 结论

国内外学者经过数十年的努力, 使NAFLD动物模型的研究有了很大进展, 许多动物模型已用于NAFLD发病机制及药物防治的研究中, 并取得一定成绩, 但至今仍缺乏能涵盖人类NAFLD整个疾病谱的单一动物模型。今后的研究应更多地致力于纯系动物的培养及营养饮食配方的改良, 并引进新技术探索新的造模方法, 使动物模型更符合人类疾病的特点及研究的需要。此外, 尚需建立统一的动物模型标准评价体系, 更客观地反映动物模型的复制率、稳定性及科研应用价值。总之, 建立更理想的动物模型, 为科研提供高质量的研究材料, 有助于广大学者对NAFLD进行更深入的研究, 最终阐明其发病机制。

**同行评价**  
本文综述了非酒精性脂肪性肝病模型的造模方法及研究进展, 涉及范围较广, 对从事非酒精性脂肪性肝研究人员有很好的参考价值。

## 5 参考文献

- 1 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
- 2 Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-1725
- 3 London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 55-74, viii
- 4 Unger RH. Leptin physiology: a second look. *Regul Pept* 2000; 92: 87-95
- 5 Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1-16
- 6 Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 2003; 124: 1451-1464
- 7 Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4822-4826
- 8 Soga M, Kishimoto Y, Kawaguchi J, Nakai Y, Kawamura Y, Inagaki S, Katoh K, Oohara T, Makino S, Oshima I. The FLS mouse: a new inbred strain with spontaneous fatty liver. *Lab Anim Sci* 1999; 49: 269-275
- 9 Soga M, Kishimoto Y, Kawamura Y, Inagaki S, Makino S, Saibara T. Spontaneous development of hepatocellular carcinomas in the FLS mice with hereditary fatty liver. *Cancer Lett* 2003; 196: 43-48
- 10 Goudriaan JR, den Boer MA, Rensen PC, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res* 2005; 46: 2175-2181
- 11 Goudriaan JR, Dahlmans VE, Teusink B, Ouwers DM, Febbraio M, Maassen JA, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J Lipid Res* 2003; 44: 2270-2277
- 12 Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 559-574, ix
- 13 Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 24698-24710
- 14 Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, Gonzalez FJ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J Biol Chem* 1999; 274: 19228-19236
- 15 Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, Wagner JD, Matern D, Rinaldo P, Cline JM. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 2005; 128: 1381-1390
- 16 Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 193-199
- 17 Fan JG, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 233-240
- 18 Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1286-1296
- 19 Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, dela Pena A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004; 41: 926-934
- 20 Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-1674
- 21 Yu J, Ip E, Dela Pena A, Hou JY, Sesha J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006; 43: 826-836
- 22 Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G264-G273
- 23 McCuskey RS, Ito Y, Robertson GR, McCuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 386-393
- 24 Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894
- 25 Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1272-1282
- 26 Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1070-G1077
- 27 Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-248
- 28 Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S215-S219
- 29 Biddinger SB, Almird K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, Kahn CR. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2005; 54: 1314-1323
- 30 Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 880-885
- 31 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
- 32 Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tsukamoto H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005; 42: 905-914
- 33 Hill-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, Shao H, DeSantis D, Hsiao G, Subramaniam S, Berger NA, Croniger C, Lambris JD, Nadeau JH. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2975-2988
- 34 Xu ZJ, Fan JG, Ding XD, Qiao L, Wang GL. Characterization of High-Fat, Diet-Induced, Non-alcoholic Steatohepatitis with Fibrosis in Rats. *Dig Dis Sci* 2009 May 21. [Epub ahead of print]
- 35 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509
- 36 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 37 Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Lee MO, Kang KS, Yoon BI, Kim HL, Lee BH. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicol Sci* 2006; 94: 206-216
- 38 Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 133-140
- 39 Chung H, Hong DP, Kim HJ, Jang KS, Shin DM, Ahn JI, Lee YS, Kong G. Differential gene expression profiles in the steatosis/fibrosis model of rat liver by chronic administration of carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 208: 242-254
- 40 Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1035-G1043
- 41 Kashireddy PV, Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res* 2004; 30: 104-110
- 42 Shiri-Sverdlov R, Wouters K, van Gorp PJ, Gijbels MJ, Noel B, Buffat L, Staels B, Maeda N, van Bilsen M, Hofker MH. Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates. *J Hepatol* 2006; 44: 732-741
- 43 Chen Y, Hozawa S, Sawamura S, Sato S, Fukuyama N, Tsuji C, Mine T, Okada Y, Tanino R, Ogushi Y, Nakazawa H. Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 45-51

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

# 移植肝抗体介导排斥反应的研究进展

黄海建, 郑智勇, 余英豪

**背景资料**  
以往的研究认为, 移植肝排斥反应通常由T细胞介导, 但近年来的研究发现, 抗体介导排斥反应(AMR)也在移植肝患者的术后生存率方面发挥了重要作用. 现已公认T细胞介导了移植肝排斥反应, 但是否存在AMR的机制, 人们一直保持怀疑.

黄海建, 福建医科大学福总临床学院 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025  
郑智勇, 余英豪, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025  
中国人民解放军南京军区面上课题(A类)基金资助项目, No. 2008MA103  
作者贡献分布: 本综述由黄海建完成; 郑智勇与余英豪审校.  
通讯作者: 郑智勇, 主任医师, v350025, 福建省福州市西二环北路156号, 南京军区福州总医院病理科. 768203566@qq.com  
电话: 0591-24937095 传真: 0591-83717703  
收稿日期: 2009-11-01 修回日期: 2009-11-14  
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

## Advances in research on antibody-mediated rejection after liver transplantation

Hai-Jian Huang, Zhi-Yong Zheng, Ying-Hao Yu

Hai-Jian Huang, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzong Clinical School of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Zhi-Yong Zheng, Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Foundation of Nanjing Military Command of Chinese PLA (Type A), No. 2008MA103

Correspondence to: Zhi-Yong Zheng, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North of West Erhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. 768203566@qq.com

Received: 2009-11-01 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

## Abstract

T cell- and antibody-mediated immunity are also called cellular and humoral immunity, respectively. Both cellular and humoral immunity are known to mediate the rejection after allogeneic/xenogeneic organ transplantation. Liver transplantation is the most common type of organ transplantation. At present, many studies have shown that antibody-mediated immunity plays an important role in the development of rejection after liver transplantation. In this article, we will review the recent advances in understanding the basic theory, mechanism, pathological diagnosis and treatment of antibody-mediated rejection after liver transplantation.

**Key Words:** Liver transplantation; Antibody; Complement; Humoral immunity

Huang HJ, Zheng ZY, Yu YH. Advance in research on antibody-mediated rejection after liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3420-3425

## 摘要

T细胞介导的免疫称为细胞免疫, 而由抗体介导的免疫则称为体液免疫, 与细胞免疫一样, 抗体亦介导了同种/异种移植器官排斥反应. 目前, 肝移植已成为临床上常做的器官移植手术, 新近研究发现移植肝同样存在着抗体介导的排斥反应机制. 本文就近年来关于移植肝抗体介导排斥反应的基本理论、机制、病理诊断及治疗等研究进展进行综述.

**关键词:** 肝移植; 抗体; 补体; 体液免疫

黄海建, 郑智勇, 余英豪. 移植肝抗体介导排斥反应的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(33): 3420-3425

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3420.asp>

## 0 引言

尽管采用免疫抑制剂疗法和规范化管理, 使得移植肝患者的术后生存率有了很大提高, 但排斥反应仍然是导致移植肝失功的重要因素. 以往的研究认为, 移植肝排斥反应通常由T细胞介导, 但近年来的研究发现, 抗体介导排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)也发挥了重要作用<sup>[1]</sup>. 本文就近年来移植肝AMR的研究进展进行综述.

## 1 移植肝免疫排斥反应理论

对于器官移植排斥反应曾有激烈的争论, 争论的中心问题在于是T细胞还是抗体介导了移植排斥反应<sup>[2]</sup>. 同样移植肝也存在这样的争论. 现已公认T细胞介导了移植肝排斥反应, 但是否存在AMR的机制, 人们一直保持怀疑. 多数学者认为由于下列因素使肝脏成为一个天然免疫“豁免”器官: 肝脏体积巨大, 具有相当丰富的血管床及双重供血系统; 肝Kupffer细胞能够吸

**同行评议者**  
邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

收游离的免疫球蛋白(Ig)及补体;可分泌可溶性HLA分子中和已产生的游离抗体<sup>[3]</sup>;另外肝移植术后,采用免疫抑制剂及造血干细胞输注治疗,可以产生局部的微嵌合(chimerism)现象,后者指在移植受者外周血中供受者细胞共同存在的状态,而微嵌合可诱导产生免疫耐受<sup>[4-5]</sup>。

然而, C4d的研究给移植肝存在AMR提供了更多的证据。C4d, C3d及C1q是补体经典激活途径中裂解的片段,这些片段沉积在组织中是肝组织中存在抗体介导的体液免疫反应的直接证据。Colvin *et al*<sup>[6]</sup>论述了移植的实质器官(包括肝脏)组织中C4d的沉积可以反映HLA抗体介导排斥反应的存在。Bu *et al*<sup>[7]</sup>对移植肝穿刺组织进行C4d标记,发现排斥反应中C4d主要沉积在汇管区血管内皮和肝窦内皮细胞上,与乙型肝炎C4d只沉积在汇管区血管内皮上不同。Dankof *et al*<sup>[8]</sup>报道,诊断为移植肝急性细胞排斥(acute cell rejection, ACR)的病例中,大约50%伴有肝汇管区毛细血管内皮细胞的C4d沉积,同时伴有B细胞、浆细胞及巨噬细胞的浸润,说明移植肝急性细胞排斥中有体液免疫反应的机制存在。Troxell *et al*<sup>[9]</sup>评价了71例移植肝组织的C4d染色,得出相似的结论。此后移植肝中AMR的机制逐渐成为一个研究热点。

## 2 AMR类型

**2.1 分类依据** 移植肝AMR可根据其发生的时间及组织学改变进行分类。Colvin *et al*<sup>[10]</sup>认为AMR引起的移植物损伤可分为4种类型:超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)、急性排斥反应(acute humoral rejection, AHR)、慢性排斥反应(chronic humoral rejection, CHR)和适应状态(accommodation)。据估计,急性AMR占急性排斥的20%-30%,慢性AMR占慢性排斥60%<sup>[11]</sup>。排斥反应时攻击的靶细胞包括动脉和静脉内皮细胞、胆管上皮细胞等<sup>[12]</sup>,其病理表现也与此相关。

### 2.2 类型

**2.2.1 HAR:** HAR在移植物血液循环重建后数分钟至数小时内发生。常因ABO血型不合或HLA不合,产生针对ABO, HLA或者胆管内皮抗原抗体<sup>[13]</sup>。主要表现为灶性或片状凝固性及出血性坏死,小动脉透明血栓形成及坏死性动脉炎,间质可见中性粒细胞浸润等。免疫组织化学显示,在动脉、静脉、门静脉内皮有IgG和IgM沉积,同时还可可见C4d, C3d和C1q等沉积。

**2.2.2 AHR:** AHR常发生于移植后数天至数周,大多数发生在3 mo内,也可延迟发生。急性排斥可分为T细胞介导和抗体介导的排斥反应,但一种器官移植的排斥反应往往是二者共同作用的结果<sup>[14]</sup>。急性T细胞介导的排斥反应的病理学特点是Snover's三联症:门静脉炎性浸润、胆管炎和血管内皮炎<sup>[12]</sup>,可见T淋巴细胞(CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>)、B淋巴细胞、浆细胞和中性粒细胞等浸润。在T细胞和抗体介导的急性排斥反应都可以检测到B细胞和浆细胞,但是只在后者中检测到C4d及C3的沉积。Moeller *et al*<sup>[15]</sup>对同种移植肝T细胞和抗体介导的急性排斥反应中Ig重链和轻链的V区基因分析发现,两种排斥反应中IgV区都存在着体细胞的高频突变,并推测其存在选择性的效应性B细胞克隆扩增,局灶性B细胞和浆细胞沉积可能造成了AMR。T细胞和抗体介导的急性排斥反应的临床症状可能不同,但他们却有着相似的组织学表现:淋巴细胞和浆细胞浸润,这使得二者的鉴别比较困难。

**2.2.3 CHR:** CHR发生在移植后数月到数年内。CHR大多数是由急性排斥反应长期进展的结果,即使采取他克莫司、环孢霉素及OKT3等免疫抑制剂治疗,急性排斥反应仍然可以进展为慢性排斥反应<sup>[16]</sup>。CHR的病理学表现为肝细胞空泡样变性、胆管消失和纤维化,常导致移植肝失功。

**2.2.4 适应状态:** 即表现为亚临床状态,可无任何临床表现,组织学检查常无明显异常。

在AHR或CHR中如发生抗体介导的损伤则为预后不良的标志,因为目前对AMR仍缺乏确切有效的治疗措施<sup>[17]</sup>。

## 3 AMR发生机制

移植肝AMR是由浆细胞产生的抗体及其激活的补体等造成的。抗体可以是宿主体内的预存抗体,亦可以是宿主识别移植物抗原,激活了宿主机体的免疫系统,产生抗原特异性抗体(donor special antibody, DSA)<sup>[18]</sup>。抗体主要针对移植物的ABO血型抗原(血型不合时产生HAR)、HLA抗原(HLA不合时产生抗HLA抗体)等产生免疫应答<sup>[13]</sup>。

AMR主要通过以下方式发挥效应:(1)激活补体<sup>[19]</sup>;(2)抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)<sup>[11]</sup>;(3)调理作用;(4)中和游离抗原, IgG

**研发前沿**  
随着人们对C4d、C3d及C1q在肝组织中的深入研究使移植肝中AMR的机制逐渐成为一个研究热点。



### 相关报道

Colvin *et al*论述了移植的实质器官(包括肝脏)组织中C4d的沉积可以反映HLA抗体介导排斥反应的存在。Dankof *et al*报道,诊断为移植肝急性细胞排斥(ACR)的病例中,大约50%伴有肝汇管区毛细血管内皮细胞的C4d沉积,同时伴有B细胞、浆细胞及巨噬细胞的浸润,说明移植肝急性细胞排斥中有体液免疫反应的机制存在。

和IgE能够结合移植受者体内游离的ABO血型抗原、HLA抗原等,从而中和体内游离抗原<sup>[15]</sup>。然而,激活补体是抗体介导的免疫效应的主要方式。因此,浆细胞、抗体、补体片段出现在组织中是AMR存在的证据。尤其是抗体、补体是AMR的直接证据。AMR中补体C3和C4的mRNA基因表达(主要是基因的转录)是上调的,往往和排斥反应的强弱呈平行关系<sup>[20]</sup>。同时,血浆中炎症介质表达也上调,如TNF, IL-2及血清蛋白酶和组织因子(tissue factor, TF)等,TF是肝胆管上皮细胞表面的跨膜糖蛋白,受到排斥损伤时表达增加。TF为VII-VIIa因子的共受体和辅助因子,运用RT-mRNA检测显示,排斥反应时TF的表达增强<sup>[12]</sup>。

## 4 AMR诊断与鉴别诊断

**4.1 诊断** 目前,移植肝AMR尚没有为大多数病理医生所接受的病理诊断标准,移植肝病理诊断仍依照Banff国际会议的移植肝急性排斥反应(1997年)和慢性排斥反应(2000年)诊断标准<sup>[21-22]</sup>。

Colin *et al*<sup>[23]</sup>认为移植肝AMR的诊断要点包括:(1)供体特异性抗体;(2)移植肝组织中C4d的沉积;(3)组织学证据;(4)移植器官失功的证据。Moeller *et al*<sup>[15]</sup>观察到移植肝汇管区有B细胞、浆细胞浸润同时伴有补体沉积,并认为C4d和C3可作为移植肝AMR的组织学标记物。Kruke-meyer *et al*<sup>[24]</sup>进一步提出肝组织中反映AMR的一些标志物:C4d, CD20, CD38, CD138及巨噬细胞炎性蛋白-3 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ )及趋化性细胞因子受体(chemokine receptor, CCR-6),作为辅助诊断的标志物。最近,还有应用DNA微阵列(DNA microarrays)分析穿刺标本的报道,在发生AMR的病例中, TNF, IL-2及TF基因表达有上调,可助诊断AMR<sup>[12]</sup>。

**4.2 鉴别诊断** 移植肝AMR主要需与复发的病毒性肝炎相鉴别。复发的肝炎尤以乙型、丙型及巨细胞病毒型肝炎为多见,其组织学表现和移植肝的排斥反应有相似之处<sup>[25]</sup>。可通过免疫组织化学、分子病理等技术检测组织中病毒抗原进行鉴别诊断<sup>[26]</sup>。

## 5 AMR预防与治疗

**5.1 预防** AMR是可以预防的。主要措施有:(1)临床上肝移植供者须符合一定标准,以增加肝移植成功率和减少术后并发症<sup>[27]</sup>;(2)ABO血型和HLA组织相容性配型,可避免HAR的发生。通常

移植的组织交叉配型的阳性率在8%-12%,其中30%才会发生HAR<sup>[28]</sup>。但是Rydberg *et al*<sup>[29]</sup>曾回顾性的研究了400例ABO血型不相容的肝移植病例,认为ABO血型不相容的肝移植成功率较低。所以现在肝移植通常都要求做组织配型;(3)正常人体内含一定量的预存抗体,含高滴度的预存抗体才被视为致敏,通常是一些妊娠、输血史和再次移植的人。因此检测预存抗体是预防AMR发生的重要措施。目前检测预存抗体的方法有以下几种:淋巴细胞交叉毒实验、酶联免疫吸附测定法和流式细胞仪分析方法等<sup>[30]</sup>。

### 5.2 治疗

**5.2.1 HAR治疗:** HAR发生迅速,能很快的导致移植失功,一般治疗很难逆转<sup>[31]</sup>;有效的治疗方法就是进行再次肝移植<sup>[27]</sup>。但是也有成功治疗的个例报道,国外学者Hanto *et al*<sup>[32]</sup>观察了14例ABO血型不合的肝脏移植患者,在经过血浆置换、脾切除、四联免疫抑制剂治疗后,抗体介导HAR被成功逆转。

**5.2.2 AHR治疗:** 移植肝AMR的治疗方法,许多来自于移植肾AMR的治疗经验。目前,主要通过以下几种途径防止和抑制移植肝急性AMR的发生:(1)清除或中和循环中的各种抗体,如血浆置换术和免疫吸附等<sup>[33]</sup>;(2)通过抑制淋巴细胞的分化过程而抑制抗体的生成<sup>[34]</sup>,其代表是抗代谢药物,如甲氨蝶呤、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)、美罗华(rituximab,一种B细胞表面膜分子CD20单克隆抗体)和神经钙抑制剂如环孢霉素(Cyclosporine, CsA)、他克莫司(FK506)、西罗莫司等。抗代谢药物是早期用于移植的免疫抑制剂,他通过抑制嘌呤核苷酸合成,能有效地抑制淋巴细胞的生成,从而抑制抗体的产生。但是其不良反应较大,最常见的就是骨髓抑制,使其使用受到限制。MMF是常用的免疫抑制剂,其在体内代谢成活性产物酶酚酸(mycophenolic acid, MPA),后者和硫唑嘌呤的作用机制相似。有报道称MMF联合他克莫司和激素可以有效地治疗移植肝急性AMR<sup>[35]</sup>。神经钙抑制剂的作用机制主要是通过抑制IL-2基因的表达而抑制T细胞的分化和成熟,T细胞分化受阻,抗体的产生也会受到抑制,因为B细胞分化为浆细胞后产生抗体需要T细胞提供共刺激信号<sup>[36]</sup>。目前,应用较多的是环孢霉素、FK506和西罗莫司。环孢霉素对肾功能的影响很大。有大样本的研究证实,FK506的长期效果和环孢霉素没有显著性差异,但前

者的长期不良反应明显小于后者, 这项研究使得人们更倾向于使用FK506. 以往推荐联合几种免疫抑制剂合用以减少排斥反应造成的损伤, 但是Maheshwari *et al*<sup>[37]</sup>的小组通过对60例肝移植患者的穿刺标本进行了前瞻性研究, 认为西罗莫司单体疗法与西罗莫司加激素或MMF疗法之间没有太大的差别. 有实验报道血浆置换、静脉内注射免疫球蛋白(intravenous immune globulin, IVIg)及美罗华能够有效的治疗难治性AMR<sup>[33]</sup>; (3)免疫调节剂, 如免疫球蛋白等; (4)抗体疗法, 常用的是抗胸腺细胞抗体(anti-thymocyte globulin, ATG)<sup>[38]</sup>和抗淋巴细胞球蛋白(anti-lymphocyte globulin, ALG)及抗淋巴细胞血清抗体(anti-lymphocyte serum, ALS). ATG已用于治疗移植肾AHR和CHR. OKT3是T细胞膜表面分子CD3的拮抗物, 能够抑制T细胞分化成熟, 已经用于移植排斥的治疗<sup>[39]</sup>. Campath 1H(一种抗CD52抗体)能诱导异种器官移植免疫耐受, 可能会用于肝移植治疗, 但仍需进一步的试验<sup>[40]</sup>. 最近Hasegawa *et al*<sup>[41]</sup>报道应用新型药物抗A抗体K7508可减少血型不合者HAR造成的损伤, 尚需大样本研究来支持.

**5.2.3 CHR治疗:** 一旦发生抗体介导的慢性排斥反应, 常规的免疫抑制剂疗法很难逆转, 只有再次移植.

**5.2.4 选择药物时应注意的问题:** 选用治疗方案时要考虑患者的年龄、原有疾病、免疫抑制剂的不良反应及肾脏功能等. 如激素能够抑制淋巴细胞的分化, 从而促进了病毒的复制, 所以对于病毒感染者, 应慎用激素疗法. 另外停用激素后, 自身免疫性肝炎会有复发的可能. 因此需要权衡利弊, 采取个体化疗法或联合用药.

## 6 结论

移植肝排斥反应中存在着AMR, 但病理工作者仍面临诸多问题: 一是既然移植肝可发生AMR, 那么就要确定哪些种类的抗体介导了排斥反应, 因为正常人体内就有预存抗体, 但是就群体而言移植肝AMR并不常见; 二是移植肝AMR的诊断标准该如何确立? 三是以C4d作为诊断AMR的依据是否可靠? 有学者报道观察到C4d在一些炎症性反应(如乙型肝炎、丙型肝炎等)中也有较多的阳性表达, 用C4d标记AMR可能存在一定的误区<sup>[42-43]</sup>. 这些问题仍有待进一步的研究.

## 参考文献

- Haga H, Egawa H, Fujimoto Y, Ueda M, Miyagawa-Hayashino A, Sakurai T, Okuno T, Koyanagi I, Takada Y, Manabe T. Acute humoral rejection and C4d immunostaining in ABO blood type-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 457-464
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665-673
- Colvin RB. C4d in liver allografts: a sign of antibody-mediated rejection? *Am J Transplant* 2006; 6: 447-448
- Mineo D, Ricordi C. Chimerism and liver transplant tolerance. *J Hepatol* 2008; 49: 478-480
- ten Hove WR, Verspaget HW, Barge R, Lamers CB, van Hoek B. Liver chimerism after allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 231-236
- Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 807-817
- Bu X, Zheng Z, Yu Y, Zeng L, Jiang Y. Significance of C4d deposition in the diagnosis of rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 1418-1421
- Dankof A, Schmeding M, Morawietz L, Gunther R, Krukemeyer MG, Rudolph B, Koch M, Krenn V, Neumann U. Portal capillary C4d deposits and increased infiltration by macrophages indicate humorally mediated mechanisms in acute cellular liver allograft rejection. *Virchows Arch* 2005; 447: 87-93
- Troxell ML, Higgins JP, Kambham N. Evaluation of C4d staining in liver and small intestine allografts. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1489-1496
- Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1046-1056
- Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 119-140
- Usui M, Kuriyama N, Kisawada M, Hamada T, Mizuno S, Sakurai H, Tabata M, Imai H, Okamoto K, Uemoto S, Isaji S. Tissue factor expression demonstrates severe sinusoidal endothelial cell damage during rejection after living-donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 513-520
- Neuman UP, Neuhaus P. C4d immunostaining in acute humoral rejection after ABO blood group-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 356-357
- Fehr T, Rüsi B, Fischer A, Hopfer H, Wüthrich RP, Gaspert A. Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation* 2009; 87: 1837-1841
- Moeller J, Krukemeyer MG, Morawietz L, Schmeding M, Dankof A, Neumann U, Krenn V, Berek C. Molecular case report: IgVH analysis in acute humoral and cellular liver allograft rejection suggests a selected accumulation of effector B cells and plasma cells. *Virchows Arch* 2005; 446: 325-332
- Perrella O, Sbriglia C, Arenga G, Perrella A, Ferrara A, D'Antonio A, Di Costanzo G, Atripaldi L, Alone C, Sciano D, Cuomo O. Acute rejection after liver transplantation: Is there a specific immunological pattern? *Transplant Proc* 2006; 38: 3594-3596
- Sakashita H, Haga H, Ashihara E, Wen MC, Tsuji

## 同行评价

本文全面、详细综述了移植肝抗体排斥反应的研究这个崭新的研究领域, 有重要的临床治疗指导意义.

- H, Miyagawa-Hayashino A, Egawa H, Takada Y, Maekawa T, Uemoto S, Manabe T. Significance of C4d staining in ABO-identical/compatible liver transplantation. *Mod Pathol* 2007; 20: 676-684
- 18 Cascalho M, Platt JL. Basic mechanisms of humoral rejection. *Pediatr Transplant* 2005; 9: 9-16
- 19 Imai N, Nishi S, Alchi B, Ueno M, Fukase S, Arakawa M, Saito K, Takahashi K, Gejyo F. Immunohistochemical evidence of activated lectin pathway in kidney allografts with peritubular capillary C4d deposition. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2589-2595
- 20 Peter F, Zipfel. Complement and Kidney Disease. 1<sup>st</sup>ed. London: Birkhäuser Basel Press, 2005: 22-27
- 21 Demetrius AJ, Batts KP, Dhillon AP, Ferrell L, Fung J, Geller SA, Hart J, Hayry P, Hofmann WJ, Hubscher S, Kemnitz J, Koukoulis G, Lee RG, Lewin KJ, Ludwig J, Markin RS, Petrovic LM, Phillips MJ, Portmann B, Rakela J, Randhawa P, Reinholt FP, Reynès M, Robert M, Schlitt H, Solez K, Snover D, Taskinen E, Thung SN, Tillery GW, Wiesner RH, Wight DG, Williams JW, Yamabe H. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658-663
- 22 Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, Fung J, Gouw A, Gustafsson B, Haga H, Harrison D, Hart J, Hubscher S, Jaffe R, Khetry U, Lassman C, Lewin K, Martinez O, Nakazawa Y, Neil D, Pappo O, Parizhskaya M, Randhawa P, Rasoul-Rockenschaub S, Reinholt F, Reynes M, Robert M, Tsamandas A, Wanless I, Wiesner R, Wernerson A, Wrbas F, Wyatt J, Yamabe H. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* 2000; 31: 792-799
- 23 Wilson CH, Agarwal K, Carter V, Burt AD, Hübscher S, Talbot D, Jaques BC, Manas DM. Late humoral rejection in a compliant ABO-compatible liver transplant recipient. *Transplantation* 2006; 82: 988-989
- 24 Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, Rudolph B, Neumann U, Theruvath T, Neuhaus P, Krenn V. Description of B lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 78: 65-70
- 25 Lorho R, Turlin B, Aqodad N, Triki N, de Lajarte-Thirouard AS, Camus C, Lakehal M, Compagnon P, Dupont-Bierre E, Meunier B, Boudjema K, Messner M. C4d: a marker for hepatic transplant rejection. *Transplant Proc* 2006; 38: 2333-2334
- 26 Jain A, Ryan C, Mohanka R, Orloff M, Abt P, Romano J, Bryan L, Batzold P, Mantry P, Bozorgzadeh A. Characterization of CD4, CD8, CD56 positive lymphocytes and C4d deposits to distinguish acute cellular rejection from recurrent hepatitis C in post-liver transplant biopsies. *Clin Transplant* 2006; 20: 624-633
- 27 Abdullah K, Abdeldayem H, Salama IA, Badah K, Al-Somali B, Abdulkareem A. Retrospective analysis of the causes of rejection of potential donors for living related liver transplantation. *Hepatol Int* 2007; 1: 431-436
- 28 Della-Guardia B, Almeida MD, Meira-Filho SP, Torres MA, Venco F, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Antibody-mediated rejection: hyperacute rejection reality in liver transplantation? A case report. *Transplant Proc* 2008; 40: 870-871
- 29 Rydberg L. ABO-incompatibility in solid organ transplantation. *Transfus Med* 2001; 11: 325-342
- 30 Colovai AI, Vasilescu ER, Foca-Rodi A, Kim-Schulze S, Hussaini N, D'agati VD, Markowitz GS, Wang C, Cohen DJ, Hardy MA, Suciu-Foca N. Acute and hyperacute humoral rejection in kidney allograft recipients treated with anti-human thymocyte antibodies. *Hum Immunol* 2005; 66: 501-512
- 31 Troisi R, Noens L, Montalti R, Ricciardi S, Philippé J, Praet M, Conoscitore P, Centra M, de Hemptinne B. ABO-mismatch adult living donor liver transplantation using antigen-specific immunoadsorption and quadruple immunosuppression without splenectomy. *Liver Transpl* 2006; 12: 1412-1417
- 32 Hanto DW, Fecteau AH, Alonso MH, Valente JF, Whiting JF. ABO-incompatible liver transplantation with no immunological graft losses using total plasma exchange, splenectomy, and quadruple immunosuppression: evidence for accommodation. *Liver Transpl* 2003; 9: 22-30
- 33 Venetz JP, Pascual M. New treatments for acute humoral rejection of kidney allografts. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 625-633
- 34 Niwa T, Yamamoto S, Saito M, Shiraga T, Takagi A. Effect of cyclosporine and tacrolimus on cytochrome p450 activities in human liver microsomes. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 209-216
- 35 Jain A, Sharma R, Ryan C, Tsoulfas G, Orloff M, Abt P, Kashyap R, Batzold P, Sauberman L, Safadjou S, Graham M, Bozorgzadeh A. Potential immunological advantage of intravenous mycophenolate mofetil with tacrolimus and steroids in primary deceased donor liver transplantation and live donor liver transplantation without antibody induction. *Liver Transpl* 2008; 14: 202-209
- 36 Sharma R, Rajasekar MR, Raghuvanshi A. Immunosuppression strategies after liver transplantation: a single centre experience in 57 liver transplant recipients. *Indian J Surg* 2007; 69: 187-190
- 37 Maheshwari A, Torbenson MS, Thuluvath PJ. Sirolimus monotherapy versus sirolimus in combination with steroids and/or MMF for immunosuppression after liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1677-1684
- 38 Bajjoka I, Hsaiky L, Brown K, Abouljoud M. Preserving renal function in liver transplant recipients with rabbit anti-thymocyte globulin and delayed initiation of calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2008; 14: 66-72
- 39 Böhler T, Waiser J, Lichter S, Schumann B, Neumayer HH, Kamar N, Budde K. Pharmacodynamic effects of everolimus on anti-CD3 antibody-stimulated T-lymphocyte proliferation and interleukin-10 synthesis in stable kidney-transplant patients. *Cytokine* 2008; 42: 306-311
- 40 Kato T, Selvaggi G, Panagiotis T, Hernandez E, McLaughlin G, Moon J, Nishida S, Levi D, Thompson J, Halliday N, Ruiz P, Tzakis A. Pediatric liver transplant with Campath 1H induction-Preliminary report. *Transplant Proc* 2006; 38: 3609-3611
- 41 Hasegawa Y, Kato Y, Kaneko MK, Ogasawara



- S, Shimazu M, Tanabe M, Kawachi S, Obara H, Shinoda M, Kitagawa Y, Narimatsu H, Kitajima M. Neutralization of blood group A-antigen by a novel anti-A antibody: overcoming ABO-Incompatible solid-organ transplantation. *Transplantation* 2008; 85: 378-385
- 42 Bouron-Dal Soglio D, Rougemont AL, Herzog D, Soucy G, Alvarez F, Fournet JC. An immunohistochemical evaluation of C4d deposition in pediatric inflammatory liver diseases. *Hum Pathol* 2008; 39: 1103-1110
- 43 Bellamy CO, Herriot MM, Harrison DJ, Bathgate AJ. C4d immunopositivity is uncommon in ABO-compatible liver allografts, but correlates partially with lymphocytotoxic antibody status. *Histopathology* 2007; 50: 739-749

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

# 预处理防治肝缺血再灌注损伤的研究进展

吴林熹, 曾仲

**背景资料**  
肝脏缺血再灌注损伤是困扰肝脏外科发展的一大重症, 近年来主动预防成为国内外研究的热点. 主动预防主要是预处理, 即在真正应激发生前将细胞、组织、器官乃至整个供体暴露于非致死性应激中, 主动诱导细胞的内源性保护机制, 以期获得抵御真正应激的能力.

吴林熹, 曾仲, 昆明医学院第一附属医院器官移植中心 云南省昆明市 650032  
云南省自然科学基金资助项目, No. 2007C137M  
作者贡献分布: 本文由吴林熹综述, 曾仲审校.  
通讯作者: 曾仲, 副教授, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院器官移植中心.  
zzong@medmail.com.cn  
电话: 0871-5359202  
收稿日期: 2009-09-14 修回日期: 2009-10-05  
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury: recent advances

Lin-Xi Wu, Zhong Zeng

Lin-Xi Wu, Zhong Zeng, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2007C137M  
Correspondence to: Professor Zhong Zeng, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. zzong@medmail.com.cn  
Received: 2009-09-24 Revised: 2009-10-05  
Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

### Abstract

Hepatic ischemia-reperfusion injury (I/R) is a major clinical problem that impedes the development of liver surgery. Recently, intensive research has improved our understanding of the mechanisms involved in I/R liver injury. Here, we will briefly review the most promising preconditioning approaches against I/R injury and discuss the mechanisms involved in their therapeutic effects.

**Key Words:** Liver; Ischemia-reperfusion injury; Hepatic transplantation; Preconditioning

Wu LX, Zeng Z. Preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3426-3430

### 摘要

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)是困扰肝脏外科发展的一大重症,

如何防治I/R一直是研究的热点. 预处理通过诱导细胞的内源性保护机制, 对肝脏I/R有明显的防治作用, 本文就各种预处理对抗肝脏I/R的作用机制作一综述, 探讨各种预处理方法的临床应用价值.

**关键词:** 肝; 缺血再灌注损伤; 肝移植; 预处理

吴林熹, 曾仲. 预处理防治肝缺血再灌注损伤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(33): 3426-3430  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3426.asp>

### 0 引言

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion, I/R)是指缺血后的再灌注不仅不能使组织、器官功能恢复, 反而加重了组织、器官功能障碍和结构损伤的一种病理生理过程. 复杂的肝切除术、严重肝创伤的处理及肝移植术等均可导致急性肝缺血和随后的再灌注问题<sup>[1]</sup>, 如何防治肝脏I/R是处理各种严重肝脏疾病、降低肝移植失败率的重要措施, 近年来主动预防成为国内外研究热点. 主动预防主要是预处理, 即在真正应激发生前将细胞、组织、器官乃至整个供体暴露于非致死性应激中, 如: 短时缺血、药物、臭氧、高热等应激因素, 主动诱导细胞的内源性保护机制, 以期获得抵御真正应激的能力. 本文就近年来这方面研究进展作一综述.

### 1 缺血预处理对肝脏I/R的保护作用

缺血预处理(ischemia preconditioning, IPC)是指预先使组织或器官经历短时间的缺血, 以增强其对随后较长时间缺血的耐受力. 最早由Murry *et al*<sup>[1]</sup>于1986年在犬的心肌实验中应用. IPC已被证实具有器官普遍性, 这是由于IPC过程中器官释放的一些介质参与了其保护机制的信号传导. 其中腺苷、NO和细胞内蛋白激酶扮演了主要的角色. 他的机制为: (1)IPC引起细胞外腺苷水平升高, 使腺苷A<sub>2A</sub>受体(adenosine A<sub>2A</sub> receptor, A<sub>2A</sub>R)活化, 激活内皮型和诱导型一氧化氮合酶eNOS, 进而促使NO合成增加; (2)腺苷抑制白细

**同行评议者**  
姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

胞黏附,降低黏附分子的表达,抑制白细胞、血小板聚集和活性氧的产生<sup>[2]</sup>; (3)活化的腺苷A<sub>2A</sub>R通过激活肝细胞内的蛋白激酶(Akt/PKB)发挥抗凋亡作用<sup>[3]</sup>; (4)NO在急性和延迟预适应里都发挥着关键作用,他通过抑制星状细胞的活化、血小板的聚集及中性粒细胞的黏附发挥抗炎作用<sup>[3]</sup>,最终抑制效应器炎症细胞因子TNF2、内皮素和氧自由基的释放,增加抗炎性细胞因子IL-10的合成来实现对缺血组织的保护作用<sup>[4]</sup>。Arai *et al*<sup>[5]</sup>证实5 min和10 min的IPC对肝脏缺血再灌注有确切的保护作用。Yamada *et al*<sup>[6]</sup>研究表明,IPC对肝I/R的保护效应因肝缺血时间长短不一其机制不一样: (1)IPC对短时间缺血(40-60 min内)的肝脏有确切的肝实质细胞保护作用; (2)对于长时间缺血(90-120 min后)的肝脏,IPC的细胞保护作用就不明显了,但其促进残留肝实质细胞再生的能力显著增强。这可能是IPC促使腺苷A<sub>2A</sub>R活化,通过Akt/PKB信号转导途径引起增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)变化、更早磷酸化和促凋亡蛋白(BAD, caspase-9, caspase-3)灭活来激活细胞增殖和抑制凋亡来实现的<sup>[2-3,7]</sup>。最近在小鼠小肝移植模型(体积≤30%)研究中发现,IPC损害了供肝细胞的再生能力。其机制可能是通过降低cyclin E、cyclin D1和PCNA的阳性表达,使有促进肝细胞再生能力的IL-6生成减少和细胞周期阻滞来实现的<sup>[8]</sup>。

在肝脏手术中,有近20%的患者是脂肪肝,在肝移植中脂肪肝的检出率也接近30%。脂肪肝对I/R比正常肝脏更为敏感,IPC对脂肪肝I/R也有确切保护作用。近年研究发现脂联素(adiponectin)和过氧化物酶体增生激活受体α(peroxisome proliferative activated receptor alpha, PPARα)在此过程发挥重要作用<sup>[9]</sup>。

尽管在动物实验中已证实IPC对肝脏I/R有确切的保护作用,但在临床应用中却有分歧。Gurusamy *et al*<sup>[10]</sup>统计分析了国际Cochrane肝胆对照实验注册资料库截至2007-03的162例尸体供肝移植临床试验病例发现:在死亡率、原发性供肝无功能、再移植、转氨酶活性、胆红素水平、凝血酶原活动度、中值髓过氧化物酶活性、CD8的表达、NOS均值等方面IPC组与对照组差异无统计学意义<sup>[10-11]</sup>。因此,评估IPC在临床肝移植手术供肝恢复中的作用还需进一步的大样本临床随机对照试验研究。

## 2 药物预处理对肝脏I/R的防治

药物预处理(pharmacological preconditioning,

PPC)是指应用特定的药物刺激机体产生应激反应,通过机体内在保护机制使自身产生对抗I/R的能力。相比较IPC而言,PPC诱导肝缺血耐受是防治肝脏I/R非常有前景的方法。因为他的安全阈大,无需其他特殊仪器设备,操作简单、便于临床推广和应用,故成为近年研究热点。PPC主要应用药物简介如下。

**2.1 阿霉素** 阿霉素(doxorubicin/adriamycin)是一种抗肿瘤抗生素,可抑制细胞RNA和DNA的合成。2000年, Ito *et al*<sup>[12]</sup>用药物阿霉素预处理的动物实验证实,阿霉素预处理对大鼠肝脏I/R有确切的保护作用。在大鼠肝移植I/R动物模型中,根据阿霉素预处理与否及供肝获取前经历的供体心脏停搏时间30和45 min组,1 wk生存率对照组为50.0%与16.7%,而阿霉素预处理组(1 mg/kg)为83.3%与66.7%,预处理组移植肝脏的组织学及肝功能明显好于对照组<sup>[13]</sup>。其作用机制可能是阿霉素在还原酶的作用下还原为半醌自由基,与氧反应导致氧自由基生成,而大量生成的氧自由基启动细胞的内源性保护机制,诱导肝细胞产生热休克蛋白72(heat shock protein, HSP72)和亚铁血红素氧合酶-1(heme oxygenase, HO-1),HSP72和HO-1具有多方面的保护作用,如抑NF-κB的活化和TNF-α的产生,提高机体对应激损害的耐受程度及清除氧自由基等,从而改善肝脏功能,减轻病理改变,提高了供肝对缺血的耐受性。

**2.2 外源性腺苷或腺苷受体激动剂** 腺苷是一种嘌呤核苷,由糖苷键连接腺嘌呤和核糖而成,广泛分布于体内各种组织中。腺苷受体(adenosine receptor, AR)是一种与G蛋白耦联的糖蛋白,根据对腺苷的亲合力不同,分成4种亚型:A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>、A<sub>2B</sub>和A<sub>3</sub>。其中腺苷A<sub>2A</sub>受体与肝脏I/R关系最为密切,是防治肝I/R的关键靶点,腺苷A<sub>2A</sub>受体激动剂CGS21680预处理可以模拟IPC的保护作用,血清ALT、AST、MPO、TNF-α、ADA、及肝组织自由基水平明显下降<sup>[14]</sup>。其机制主要是: (1)通过激活生物体细胞的重要抗氧化酶锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD),在线粒体中将氧自由基转化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,使氧自由基灭活,从而减轻肝细胞膜的脂质过氧化反应和线粒体的损伤,消除氧化应激和炎症反应对缺血再灌注肝脏的损伤; (2)激活内源性NOS使NO释放增多。NO作用于caspase-3并使其失活,从而抑制肝细胞的凋亡<sup>[15-16]</sup>; (3)活化的腺苷A<sub>2A</sub>R通过与G蛋白相偶联,激活肝细胞内

**研发前沿**  
有效防治肝脏缺血再灌注损伤是当前研究的热点和难点,PPC诱导肝缺血耐受因安全阈大,无需其他特殊仪器设备,操作简单,便于临床推广和应用,故成为防治肝脏I/R非常有前景的方法和近年研究热点。



### 相关报道

Gurusamy *et al* 统计分析了国际Cochrane肝胆对照实验注册资料库截至2007-03的162例尸体供肝移植临床试验病例发现: IPC组与对照组差异无统计学意义。

的蛋白激酶(Akt/PKB), 从而激活Bcl-xL并抑制caspase-9发挥强大的抗凋亡作用<sup>[17-18]</sup>。这一发现对进一步阐明肝脏I/R的具体机制有重要启示。

**2.3 人重组促红细胞生成素** 促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)属唾液糖蛋白激素, 主要功能是促红系分化增殖、促进造血。近年来, 发现EPO还具有多种非造血功能, 如: 直接抗凋亡、促血管生成、抗炎、促干细胞迁移等<sup>[19]</sup>。在独立的大鼠和猪的肝脏I/R模型中, 单一剂量(5000 IU/kg)的rHuEPO预处理组再灌注后肝脏的酶学水平和caspase-3的活性明显降低, 肝实质细胞凋亡减少, 证实rHuEPO预处理对肝I/R有显著的保护作用<sup>[20-21]</sup>。rHuEPO的作用机制可能是: (1)通过蛋白酪氨酸激酶JAK2(protein tyrosine kinase JAK2)激活蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)、信号转导和转录激活因子-5(STAT5)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)及NF- $\kappa$ B等上调Bcl-2、Bcl-xL、XIAP等凋亡抑制蛋白的表达, 来阻止细胞DNA的裂解和抑制caspase-3的活性, 发挥强大的抗凋亡和稳定细胞超微结构的作用; (2)减少氧自由基生成和氧化应激等炎症免疫反应造成的细胞核碎裂; (3)诱导正常肝脏表达多种热休克蛋白, 增加细胞耐受力, 减轻缺血再灌注损伤<sup>[21-23]</sup>。

**2.4 高渗盐水** 近年来, 高渗盐水的抗炎效应逐渐为大家熟知并应用于休克、感染等多种危重病的抢救与治疗。有学者把高渗盐水誉为创伤治疗中的新型免疫调节剂<sup>[24]</sup>。柯庆宏 *et al*<sup>[25]</sup>研究发现, 在阻断肝脏血流前1 h经阴茎背静脉注射4 mL/kg的7.5%高渗盐水, 具有明显抑制再灌注后外周血中性粒细胞Mac-1和肝内ICAM-1表达的作用, 并增强缺血再灌注后肝脏HO-1 mRNA及蛋白表达, 明显减轻再灌注后肝脏中性粒细胞浸润, 同时肝细胞及肝窦内皮细胞浊肿、变性程度减轻, 肝脏微循环得到明显改善, 具有明显减轻肝脏I/R的作用。高渗盐水预处理对抗I/R的具体机制现在仍不十分清楚, 可能和高渗盐水使用后使细胞渗透压改变、激活细胞膜上的渗透压感受器和HO-1, 通过p38或CO活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径激活cAMP依赖的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)有关<sup>[26-27]</sup>。

**2.5 其他药物** 抗氧化剂、腺苷受体激动剂、NO、能量代谢调节剂、抑制中性粒细胞激活和黏附剂、抗体、细胞保护因子等药物都是近年来研究的热点。特别是我们祖国的中药, 具有安

全范围大、不良反应小、作用环节/靶点多等优点, 对缺血的肝脏具有适应性保护作用, 故开发对肝I/R具有保护作用的中药复方制剂或单体是目前研究的热点。如丹参、参附注射液、银杏叶提取物、三七总皂苷、川芎嗪等中药预处理的动物实验证实, 中药对肝脏I/R有确切的防治效果, 但是中药预处理的作用机制复杂, 目前尚未阐明。因此这方面的研究具有十分重要的意义。

### 3 热休克预处理对肝脏I/R的防治

短暂的亚致死量的高温疗法和从这种高温暴露中恢复称为热休克预处理(heat shock preconditioning)。他通过一种细胞内的保护性生理反应, 即热休克反应(heat-shock response, HSR), 提供了对抗氧化应激的细胞保护作用。热休克预处理可防止肝脏缺血时线粒体膜完整性的破坏, 并有助于线粒体在再灌注时产生高能磷酸化合物。Mokuno *et al*<sup>[28]</sup>应用42.5℃高温持续10 min的热休克预处理对大鼠脂肪肝I/R有确切的防治作用。热休克预处理的保护作用主要与HSP72的诱导产生有关, 高温激活热休克因子1(heat shock factor 1, HSF1), 促进HSP基因的转录, 使其高度表达, 通过热休克蛋白起保护作用。热休克预处理24-48 h后肝组织产生HSP72, 并表现出缺血耐受现象。HSP72通过: (1)分子伴侣作用; (2)抑制细胞凋亡; (3)减轻氧自由基对细胞的损伤; (4)防止钙超载, 抑制NF- $\kappa$ B的活化和TNF- $\alpha$ 的产生, 使再灌注后肝酶释放显著减少, 从而保护了肝细胞线粒体的完整性, 防止细胞凋亡, 减轻了肝脏实质的损伤<sup>[28]</sup>。

### 4 臭氧预处理对肝脏I/R的防治

臭氧预处理(Ozone oxidative preconditioning, OzoneOP)是通过提升内源性NO浓度和维持细胞氧化还原平衡状态来保护肝脏避免受I/R。León Fernández *et al*<sup>[29]</sup>研究发现, OzoneOP可以模拟IPC的保护作用, 引起细胞外腺苷水平升高, 通过抑制腺苷A<sub>1A</sub>R和激活腺苷A<sub>2A</sub>R, 诱导内皮细胞合成NO增加, 从而维持肝细胞的氧化还原状态, 抑制NF- $\kappa$ B的生成和氧自由基的合成, 保护线粒体的超微结构, 对肝脏I/R起保护作用。

### 5 结论

I/R一直是困扰肝脏外科发展的一大难题, 近年来这方面的研究取得了很大的进展。但是绝大

部分实验是在动物身上进行的, 人类临床试验仍相对较少, 并面临很多问题, 如: IPC的最佳复灌-缺血时间, 药物的具体剂量如何、何时应用? 是否符合伦理等。但是随着对肝脏I/R的机制研究的不断深入, 针对肝脏I/R具体机制的各个环节/靶点, 寻求几种方法相结合的综合防治措施, 特别是针对脂肪肝的I/R的研究, 将是未来研究的热点。预处理将会是防治肝脏I/R的重要手段, 并在临床应用中有效地保护肝脏免受I/R。

## 6 参考文献

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003; 125: 1480-1491
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241
- Ajamieh HH, Candelario-Jalil E, Fernández OS, Gerbes AL. Ischaemic and pharmacological preconditionings protect liver via adenosine and redox status following hepatic ischaemia/reperfusion in rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115: 69-77
- Arai M, Tejima K, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nagashima K, Nishikawa T, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K. Ischemic preconditioning in liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S65-S67
- Yamada F, Saito T, Abe T, Tsuchiya T, Sato Y, Kenjo A, Kimura T, Gotoh M. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes in long-term ischemically damaged rat livers. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1971-1977
- Giovanardi RO, Rhoden EL, Cerski CT, Salvador M, Kalil AN. Ischemic preconditioning protects the pig liver by preserving the mitochondrial structure and downregulating caspase-3 activity. *J Invest Surg* 2009; 22: 88-97
- Yao A, Li X, Pu L, Zhong J, Liu X, Yu Y, Zhang F, Kong L, Sun B, Wang X. Impaired hepatic regeneration by ischemic preconditioning in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007; 18: 37-43
- Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrisa-Altés S, Casillas-Ramirez A, Rodés J, Roselló-Catafau J, Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008; 47: 461-472
- Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008; 2: Art. No: CD006315
- DeOliveira ML, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning: promises from the laboratory to patients--sustained or disillusioned? *Am J Transplant* 2008; 8: 489-491
- Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 31: 416-419
- Chen H, Peng CH, Deng XX, Qiu WH, Shen BY, Yang WP, Li HW. [The protective effect of heat shock protein 72 by Doxorubicin in cold ischemia-reperfusion injury of the rat liver] *Zhonghua Waike Zazhi* 2006; 44: 310-313
- Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 2006; 203: 2639-2648
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-937
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29: 126-132
- Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, Billiar TR. Preactivation of NKT cells with  $\alpha$ -GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G249-G258
- Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27: 6-16
- Fliser D, Bahlmann FH, deGroot K, Haller H. Mechanisms of disease: erythropoietin--an old hormone with a new mission? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: 563-572
- Hochhauser E, Pappo O, Ribakovsky E, Ravid A, Kurtzwalld E, Cheporko Y, Lelchuk S, Ben-Ari Z. Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* 2008; 13: 77-86
- Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, Mori S, Kijima H, Okada T, Kubota K. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 470-475
- Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2115-2124
- Luo YH, Li ZD, Liu LX, Dong GH. Pretreatment with erythropoietin reduces hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 294-299
- Rotstein OD. Novel strategies for immunomodulation after trauma: revisiting hypertonic saline as a resuscitation strategy for hemorrhagic shock. *J Trauma* 2000; 49: 580-583
- 柯庆宏, 郑树森, 梁廷波, 谢海洋, 夏伟良. 高渗盐水预处理可减轻中性粒细胞介导的肝脏缺血再灌注损伤. *中国病理生理杂志* 2007; 23: 1326-1330
- Junger WG, Hoyt DB, Davis RE, Herdon-Remelius C, Namiki S, Junger H, Loomis W, Altman A. Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant

同行评价  
本综述尚能反映预处理防治肝缺血再灌注损伤的研究进展, 具有一定的参考价值。

- receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. *J Clin Invest* 1998; 101: 2768-2779
- 27 Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, Chen CF. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. *Transplantation* 2008; 85: 732-738
- 28 Mokuno Y, Berthiaume F, Tanimura Y, Yarmush ML. Heat shock preconditioning inhibits CD4+ T lymphocyte activation in transplanted fatty rat livers. *J Surg Res* 2006; 135: 92-99
- 29 León Fernández OS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menéndez S, Viebahn-Hänsler R, Re L, Carmona AM. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/ reperfusion. *Transpl Int* 2008; 21: 39-48

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

**本刊讯** 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *V*<sub>d</sub>, *T*<sub>1/2</sub> *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)



# 蛋白质组学在大肠癌研究中的应用

高丽丽, 孙自勤

高丽丽, 孙自勤, 辽宁医学院校外基地 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250061  
作者贡献分布: 本文综述由高丽丽完成, 孙自勤审校.  
通讯作者: 孙自勤, 主任医师, 250061, 山东省济南市, 辽宁医学院校外基地, 中国人民解放军济南军区总医院消化科.  
ziqins@126.com  
电话: 0531-51666541  
收稿日期: 2009-08-28 修回日期: 2009-10-21  
接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-28

## Application of proteomics in colorectal cancer research

Li-Li Gao, Zi-Qin Sun

Li-Li Gao, Zi-Qin Sun, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Liaoning Medical University, Jinan 250061, Shandong Province, China  
Correspondence to: Zi-Qin Sun, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Liaoning Medical University, Jinan 250061, Shandong Province, China. ziqins@126.com  
Received: 2009-08-28 Revised: 2009-10-21  
Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-28

## Abstract

Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors in China. Its morbidity and mortality are increasing year by year. The emergence of proteomics has pushed colorectal cancer research forward. In this article, we will review the application of proteomics in the study of the diagnosis, pathogenesis and treatment of colorectal cancer.

**Key Words:** Proteomics; Colorectal cancer; Markers; Pathogenesis; Therapy; Protein library

Gao LL, Sun ZQ. Application of proteomics in colorectal cancer research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3431-3436

## 摘要

大肠癌是我国常见恶性肿瘤之一, 且发病率和死亡率呈逐年上升趋势. 蛋白质组学的出现, 使大肠癌的研究有了进一步的发展. 本文就国内外蛋白质组学在大肠癌诊断、发病机制、治疗等方面的研究进行综述.

**关键词:** 蛋白质组学; 大肠癌; 标志物; 发病机制; 治疗; 蛋白文库

高丽丽, 孙自勤. 蛋白质组学在大肠癌研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(33): 3431-3436  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3431.asp>

## 0 引言

随着规模庞大的基因组测序的完成, 人们逐渐认识到仅仅拥有完整的基因组序列并不能解释复杂的生命现象. 然而生命活动的体现者、遗传信息和生物功能的执行者-蛋白质也许能给出答案<sup>[1]</sup>, 因此蛋白质组学应运而生. 1994年, 澳大利亚Macquarie大学的Marc Wilkins和Keith Williams在意大利召开的一次科学会议上首次提出了“蛋白质组”的概念, 其意指基因组表达产生的所有相应的蛋白质<sup>[2]</sup>. 而蛋白质组学是一门对某一生物或细胞在特定生理或病理状态下表达的所有蛋白质的特征、数量和功能进行系统性研究的科学<sup>[3]</sup>. 可分为组成蛋白质组学、差异蛋白质组学、功能蛋白质组学、定量蛋白质组学等. 研究思路主要分为2种: (1)利用相关技术分离、获取、鉴定某一生物或细胞在特定生理和病理状态下表达的所有蛋白质, 建立蛋白质文库; (2)提取同一生物和细胞在不同状态下的差异蛋白, 对差异蛋白进行定性、定量、功能等各方面研究, 从而确定不同状态的特异标志物、发生机制、特异治疗方法等. 蛋白质组学的核心技术为2-D电泳和质谱分析; 研究标本可分为: 培养的细胞、生理或病理状态下的组织、各种体液等. 大肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率迅速增长<sup>[4]</sup>. 近年国内外众多学者将蛋白质组学应用于大肠癌的研究, 不论在大肠癌发生和进展的特异标志物及大肠癌的发病机制、治疗等方面均取得较多成就, 另也有部分学者建立了大肠癌的部分蛋白文库.

## 1 大肠癌的特异标志物

### 1.1 血清标志物

#### 1.1.1 尼克酰胺-N-甲基转移酶(nicotinamide

**背景资料**  
大肠癌是常见的消化系肿瘤之一, 早期检测和诊断是提高其生存率、改善预后的关键, 但目前仍缺乏特异的筛选标志物. 蛋白质组学的迅速发展为解决上述难题提供了可靠的途径.

**同行评议者**  
黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

研发前沿  
后基因组时代中,生命科学的研究重心将从基因组学转移到蛋白质组学。蛋白质组学在大肠癌的敏感标志物、发生发展机制、治疗方法的研究等各方面有着极为广阔的应用前景,成为研究热点。

N-methyltransferase, NNMT)和复合酶体活化剂亚单位-3(proteasome activator complex subunit 3, PSME-3): Roessler *et al*对结直肠癌和配对的结直肠黏膜组织中的蛋白质进行双向凝胶电泳(2-DE),其中结肠癌中特异表达的蛋白通过质谱分析鉴定,并在血清中验证,结果发现NNMT和PSME-3在大肠癌患者血清中特异表达<sup>[5-6]</sup>。作者进一步用109例大肠癌患者、317例健康人、87例炎性肠病患者的血清样品比较其与CEA的灵敏度差异,发现诊断大肠癌PSME-3与CEA灵敏度相似,而NNMT比CEA灵敏度高。

1.1.2 CRMP-2: 通过分析由12种癌种发育成的细胞株, Wu *et al*<sup>[7]</sup>认为CRMP-2是大肠癌的血清标志物,并进一步用201例大肠癌患者和210例健康人的血清样品验证,发现单独应用CRMP-2诊断大肠癌灵敏度高于CEA,但特异度差,而联合应用CEA和CRMP-2比单独应用任何一项灵敏度和特异度都高。

1.1.3 S100A8和S100A9: Kim *et al*<sup>[8]</sup>用2D-DIGE电泳的方法,在一个比较窄的pH值范围内(pH 5.5-6.7)比较正常大肠黏膜和大肠癌之间的差异蛋白,发现大肠癌中有34种蛋白高表达、17种蛋白低表达。然后通过质谱分析的方法确定这些蛋白。对于其中显著高表达的腺苷高半胱氨酸酶、nm23-H1、S100A8、S100A9进一步通过RT-PCR、Western blot验证,均提示大肠癌中显著高表达。而免疫组织化学提示S100A8、S100A9在大肠癌中显著高表达,腺苷高半胱氨酸酶、nm23-H1在大肠癌中高表达。作者进一步取健康志愿者、大肠腺瘤患者、大肠癌患者的血清,通过Western blot的方法检验血清中S100A8、S100A9,并去CEA对比,发现CEA检测大肠癌的灵敏性为78%, S100A8的灵敏性为91%, S100A9的灵敏性为89%,且与对照组相比S100A8和S100A9对早期大肠癌的检出率更高。作者建议将S100A8和S100A9作为一种大肠癌的血清标志物。

1.1.4 肌间线蛋白: Ma *et al*<sup>[9]</sup>用双向电泳的方法分析大肠癌和正常大肠黏膜之间的差异蛋白,并用质谱分析的方法确定蛋白。对于其中大肠癌中高表达的肌间线蛋白(desmin)进一步通过RT-PCR、Western blot验证,均提示在大肠癌中高表达。而免疫组织化学则证实肌间线蛋白在大肠癌中高表达,且与大肠癌的分期和预后相关。作者通过一种灵敏的免疫测定的方法,检测健康志愿者和大肠癌患者的血清,结果发现肌

间线蛋白在大肠癌中显著高表达,且与预后和分期相关。作者建议将肌间线蛋白作为一种新的大肠癌血清学标志物。

1.2 组织特异标志物 通过对正常大肠黏膜和大肠癌原发灶进行双向凝胶电泳和质谱分析, Alfonso *et al*<sup>[10]</sup>发现膜融合蛋白IV(annexinIV)、MAT-1上调, NCF-2、PMM-2下调。其中膜融合蛋白IV是一种钙结合蛋白,与细胞间的相互联系和信号传导相关;相同的方法Kim *et al*<sup>[11]</sup>发现大肠癌中硒结合蛋白1(selenium-binding protein 1, SELENBP1)显著低表达。并用RT-PCR、Western blot验证。作者另取8个同时患有大肠腺瘤和大肠癌的患者的大肠腺瘤和大肠癌组织标本,通过免疫组织化学和Western blot的方法验证1个大肠腺瘤和8个大肠癌中都存在SELENBP1缺失,且通过组织芯片的方法分析240个II期、III期大肠癌组织作者发现SELENBP1含量越低,预后越差。Rho *et al*<sup>[12]</sup>通过肝素分段浓缩的方法处理大肠癌和正常大肠黏膜组织,然后进行双向凝胶电泳和质谱分析。发现了56种差异蛋白,其中32个低含量蛋白只有通过肝素分段处理后才能显现。而这32种蛋白中大部分与组织的低氧适应有关。其中5种蛋白(蛋白酶体亚基类型7、血红蛋白 $\alpha$ 亚单位、过氧化还原酶、精氨酸琥珀酸合成酶、信号识别颗粒9 kDa蛋白)通过了Western blot和免疫组织化学的进一步验证。

## 2 大肠癌发生及进展机制

2.1 大肠癌发生的机制 我国学者Wang *et al*<sup>[13]</sup>收集10例既患有大肠癌又患有大肠腺瘤病例,然后用双向凝胶电泳的方法分析这10例患者中正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠癌之间的差异蛋白,结果发现与癌和正常组织比较,腺瘤中有27个差异蛋白。其中与正常组织相比,腺瘤中有17种蛋白表达上调、6种表达下调;与大肠癌相比,腺瘤中有4种蛋白表达下调,没有上调表达的蛋白。作者进一步用Western blot的方法检验发现的差异蛋白,发现Mimecan在腺瘤和癌中都不表达,仅在正常组织中表达;而TXNDC5在腺瘤和癌中都表达,而在正常组织中不表达。研究证实大肠腺瘤是大肠癌发生的癌前病变<sup>[4]</sup>,因此Mimecan的缺失和TXNDC5的过表达有可能与大肠癌的发生相关。

慢性炎症是大肠癌发生过程中的重要机制之一。Yasui *et al*<sup>[14]</sup>用氧化偶氮甲烷(azoxymethane)

和右旋糖酐普罗比妥硫酸钠处理小鼠, 使其发生大肠炎继而发生大肠癌, 取处理好的小鼠的大肠癌组织和正常大肠黏膜组织做双向电泳, 比较其差异蛋白, 发现的差异蛋白用质谱分析的方法确定其名称, 最终他们发现21种差异蛋白. 在大肠癌中5种蛋白明显高表达( $\beta$ -肌球蛋白、肌球蛋白1 $\alpha$ 型b、S100A9和一种未知蛋白), 16种蛋白明显低表达(硒相关蛋白1、HMG-CoA合酶、硫氧还蛋白、半胱氨酸过氧化还原蛋白、细胞色素C氧化酶和7种未知蛋白), 这些蛋白的功能涉及代谢、抗氧化、黏蛋白产生、炎症等. 这些发现可能为炎症相关的大肠癌的机制提供一些参考, 而且可能会为炎症相关性大肠癌提供治疗和预防的策略提供参考.

**2.2 大肠癌的信号转导机制** 尽管现在的科研方法无法研究某一特定生命活动的相关蛋白, 但却可以研究信号转导途径的特定蛋白, 因为信号转导途径含有比其他生命活动中更多的调节大量蛋白的酶, 改变某一信号传导途径中的信号可以在蛋白中生“足迹”, 而这些足迹是可以被检测到的<sup>[15]</sup>.

WNT/ $\beta$ 连环蛋白途径是大肠癌发生过程中重要的信号转导途径之一, 很多学者通过蛋白质组学的方法, 对于此信号转导途径有了进一步的认识. Major *et al*<sup>[16]</sup>用串联亲和蛋白提纯法提纯与 $\beta$ 连环蛋白相关的蛋白, 并通过质谱分析确定这些蛋白的名称, 通过一系列功能分析, 发现一种由在肾母细胞瘤中突变的基因编码的蛋白WTX可以破坏 $\beta$ 连环蛋白的降解, 从而破坏WNT/ $\beta$ 连环蛋白信号转导途径, 促进大肠癌的发生. 在此信号转导途径中,  $\beta$ 连环蛋白激活转录T细胞因子4(T-cell factor 4, TCF-4)是促进大肠癌发生的重要因素, 然而 $\beta$ 连环蛋白没有任何在细胞核内存在的证据. 为了解 $\beta$ 连环蛋白如何入核及如何形成TCF-4核蛋白复合物, Shitashige *et al*<sup>[17]</sup>用抗TCF-4抗体免疫沉淀大肠癌细胞株HCT-116和DLD1, 并直接用nanoflew液相色谱的方法分析蛋白, 用质谱分析的方法确定蛋白名称, WNT信号转导途径中的核孔核膜复合体蛋白通过蛋白修饰、荧光指示、集落形成测定等方法评估, 结果发现: TCF-4与许多核孔核膜蛋白复合体相互作用, 包括Ras相关核蛋白(Ran)、Ran黏合蛋白2、Ran鸟苷三磷酸酶激活蛋白1; TCF-4的蛋白修饰作用可以增加TCF-4和 $\beta$ 连环蛋白之间的作用; 核孔核膜复合体蛋白的过表达可增加TCF-4和 $\beta$ 连环蛋白的入核, 并增

强转录活性; 核孔核膜复合体蛋白可以增强大肠癌细胞的生长. 由此Shitashige *et al*认为核孔核膜复合体蛋白可作为WNT信号转导途径中的新的调节因子, 而干扰TCF-4和 $\beta$ 连环蛋白之间相互作用的药物有可能会破坏WNT信号转导途径, 从而抑制大肠癌的生长.

**2.3 大肠癌的代谢机制** Mazzanti *et al*<sup>[18]</sup>用双向凝胶电泳的方法分析大肠癌和正常大肠黏膜之间的差异蛋白, 并对其中涉及代谢途径的蛋白, 尤其是涉及线粒体及脂肪酸和碳水化合物代谢相关的蛋白进行鉴定和分析, 结果发现肿瘤组织主要以 $\beta$ 氧化作用以主要的能量供应, 而正常大肠黏膜主要以糖的无氧酵解为主要的能量供应; 同时发现: 肿瘤组织因缺失Na-K-ATP酶 $\beta$ 1亚单位而导致Na、K循环障碍; 肿瘤组织的线粒体凋亡途径被激活. 并认为以上3种改变与肿瘤的发生密切相关.

**2.4 大肠癌的转移机制** 大肠癌的转移一直都是影响大肠癌预后的关键因素, 阐明大肠癌的转移机制对于了解大肠癌的进展、研究治疗策略都有重要的意义. Katayama *et al*<sup>[19]</sup>取同一患者大肠癌原发灶肿瘤组织和转移淋巴结中的转移组织分别培养细胞株SW480和SW620, 然后以双向凝胶差异电泳的方法分析2种细胞株之间的差异蛋白, 发现与由大肠癌原发灶肿瘤组织转化而来的SW480细胞株相比, 由淋巴结中转移组织转化而来的SW620细胞株中 $\alpha$ 烯醇酶、磷酸丙糖异构酶显著高表达, 而膜联蛋白显著低表达, 提示 $\alpha$ 烯醇酶、磷酸丙糖异构酶以及膜联蛋白的缺失可能与大肠癌的淋巴结转移相关. 我国学者Pei *et al*<sup>[20]</sup>将大肠癌患者按有无淋巴结转移分为2组, 用双向电泳的方法分别比较2组中大肠癌原发灶和正常大肠黏膜之间的差异蛋白, 用质谱分析的方法确定蛋白的名称, 然后再比较2组之间差异蛋白的区别, 最后通过Western blot和免疫组织化学的方法进一步验证两组之间的差异蛋白. 发现与大肠癌无淋巴结转移组较大肠癌淋巴结转移组热休克蛋白27(Hsp27)、谷胱甘肽S-转移酶、膜联蛋白II明显高表达, 而脂肪酸相关蛋白明显低表达, 认为这些蛋白与大肠癌的淋巴结转移相关. Chang *et al*<sup>[21]</sup>通过双向电泳的方法分析发生大肠癌肝转移患者的正常大肠黏膜、大肠癌原发灶、正常肝脏组织、大肠癌肝转移灶之间的差异蛋白, 并以质谱分析确定蛋白名称. 结果发现大肠癌肝转移灶中线粒体FOF-1-ATP合酶 $\alpha$ 亚单位显著增高. 并通过

**创新盘点**  
本文较详细全面的总结了近几年国内外有关蛋白质组学在大肠癌各个方面的研究应用, 为大肠癌蛋白质组学的研究提供一定参考.



#### 应用要点

本文对大肠癌的发生、发展及对于各种治疗的敏感特异蛋白做了总结,为研究大肠癌的诊断、治疗提供新的思路。

免疫组织化学的方法验证,发现大肠癌肝转移灶中线粒体FOF-1-ATP合酶 $\alpha$ 亚单位、 $\delta$ 亚单位在大肠癌肝转移灶中较正常大肠黏膜、大肠癌原发灶、正常肝组织中高,线粒体FOF-1-ATP合酶 $\alpha$ 亚单位、 $\delta$ 亚单位与大肠癌的分期和肝转移相关,线粒体FOF-1-ATP合酶 $\delta$ 亚单位与血管侵袭和远处转移相关。将线粒体FOF-1-ATP合酶 $\alpha$ 亚单位、 $\delta$ 亚单位转染干扰小RNA后可降低人类大肠癌细胞株在体外实验的侵袭能力。由此认为FOF-1-ATP合酶 $\alpha$ 亚单位与大肠癌的肝转移相关。

### 3 研究大肠癌对各种治疗的反应

联合化疗和放疗是目前针对进展期直肠癌患者的标准疗法,但个体间放疗的敏感性存在很大差异,而目前没有一种有效的检测放疗敏感性的方法。Allal *et al*<sup>[22]</sup>收集17例进展期直肠癌患者,肠镜下取直肠癌原发灶组织活检,活检后给予50 Gy剂量的放射治疗,然后手术切除病灶。将活检取得的放疗前的直肠癌组织与手术取得的放疗后的直肠癌组织进行双向凝胶电泳,将其中的差异蛋白通过质谱分析的方法进行鉴定。结果发现以下蛋白可能跟放疗敏感性相关:膜联蛋白、 $\beta$ 微管蛋白、降钙素、组织蛋白酶D、可溶性抗药性相关钙结合蛋白、突触融合蛋白、原肌球蛋白调节蛋白<sup>[22]</sup>。其中 $\beta$ 微管蛋白是很著名的与放疗敏感性相关的蛋白,并且他还是一种大肠癌中新的药物治疗的分子靶向位点,比如:泰索帝。

表皮生长因子受体络氨酸激酶抑制剂是一种常见的抗肿瘤生物制剂,临床上个体间的敏感性差异显著。Loeffler-Ragg *et al*<sup>[23]</sup>选择4种表皮生长因子(EGFR)阳性的大肠癌细胞株:Caco-2、DiFi、HRT-18、HT-29,分别用表皮生长因子受体络氨酸激酶抑制剂吉非替尼治疗,然后利用双向凝胶电泳的方法分析对吉非替尼有反应和无反应的细胞株之间的差异蛋白,并用质谱分析的方法鉴定这些差异蛋白。结果发现12种差异蛋白,这12种差异蛋白主要涉及代谢途径,尤其涉及恶性生长途径。在这12种蛋白中,有4种已知与EGFR的信号传导途径相关。其中泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)和半乳糖素-3(galectin-3)在反应株中过表达,而脂肪酸相关蛋白(E-FABP)和Hsp27在无反应株中过表达,提示E-FABP和Hsp27与大肠癌对表皮生长因子受体络氨酸激酶抑制剂的耐药性相关。

5-FU是大肠癌化疗中的有效药物,但好多

患者存在耐药性,为研究5-FU耐药相关蛋白,Tanakas *et al*<sup>[24]</sup>用双向电泳的方法分析大肠癌细胞株DLD-1和对5-FU耐药的DLD-1的亚型DLD-1/5-FU之间的差异蛋白,并用质谱分析的方法确定蛋白的名称。发现5种显著高表达的蛋白:不均一核糖核蛋白G、线粒体转录因子A、组蛋白H2B、组蛋白H4、核糖体蛋白L3。这几种蛋白大部分都可以保护细胞免受DNA损伤。而为了研究5-FU反应相关蛋白,Wong *et al*<sup>[25]</sup>选择大肠癌细胞株SW480,对其进行5-FU化疗,然后以双向电泳的方法分析治疗前和治疗后的细胞株的差异蛋白,发现Hsp27、Hsp70、抗氧化蛋白perxiredoxin可能是5-FU反应相关蛋白,并进一步通过细胞免疫的方法确定。

### 4 挖掘新的分子靶向作用位点

莱菔硫烷的化疗机制以前一直认为与其激活II期解毒酶活性相关,Mastrangelo *et al*<sup>[26]</sup>用蛋白质组学的方法发现了莱菔硫烷的新的作用靶点。Mastrangelo *et al*给予大肠癌细胞株Caco-2 5  $\mu$ mol/L莱菔硫烷治疗48 h,以双向电泳的方法分析给予治疗组和未给予治疗组之间的差异蛋白,以质谱分析的方法确定蛋白的名称。发现治疗后的5羟色胺(3)明显减少。为了进一步研究双向电泳提示的结果,对5羟色胺(3A)、5羟色胺(1A)、5羟色胺(2C)、5羟色胺重吸收载体进行Western blot,结果发现给予莱菔硫烷治疗后5羟色胺受体呈剂量相关性减少,且烟碱乙酰胆碱受体增加。所以5羟色胺受体可能是莱菔硫烷的新的作用靶点,对新的治疗方法的发现有一定的参考价值。

### 5 研究某种基因在大肠癌中的作用

Stühler *et al*<sup>[27]</sup>通过双向电泳的方法研究转染与假性转染抑癌基因Smad4的大肠癌细胞株SW480之间的差异蛋白,发现并通过质谱分析的方法鉴定了47个蛋白,通过分析这些差异蛋白发现Smad4可能通过参与细胞凋亡、分化来抑制大肠癌的发生和进展。Tiam1是一种新发现的与大肠癌转移相关的基因,是一种鸟嘌呤核苷酸交换因子,可以激活Ras基因。为了更好地了解Tiam1的作用机制,Liu *et al*<sup>[28]</sup>用转染和假性转染了Tiam1的大肠癌细胞株HT29进行双向电泳,发现两者之间的差异蛋白,然后用质谱分析的方法确定了11种蛋白,最后用RT-PCR、Western blot的方法验证这11种蛋白。结果发现

转染了Tiam1的大肠癌细胞株可以上调热休克蛋白27、谷胱甘肽S-转移酶等,并可下调表达膜联蛋白IV. 研究表明Tiam1可能直接或间接参与了这些蛋白的调节,这将对研究Tiam1的作用机制有很大帮助.

## 6 大肠癌细胞株的蛋白质文库

Simpson *et al*<sup>[29]</sup>对结肠癌细胞系 LIM1215进行了蛋白质组学分析,鉴定出了284个蛋白(包括92个膜蛋白),建立了结肠癌细胞系LIM1215膜蛋白数据库,为寻找结肠癌特异性生物标志物,早期发现和监测肿瘤提供了膜蛋白质数据库基础.

## 7 结论

尽管蛋白质组学技术对于我们进一步研究大肠癌提供了强有力的支持,但我们还应看到蛋白质组技术的不足. 用于蛋白分离的双向凝胶电泳对于极酸、极碱以及低丰度的蛋白分离效果差,且无法实现高通量、自动化的操作极大地限制了我们蛋白质组的研究;蛋白质组研究的各类标本都存在各自缺点:组织标本混杂因素太多,较难取得单纯的肿瘤或正常组织细胞,而培养的细胞株虽是单纯肿瘤或正常组织细胞发育而来,却与肿瘤细胞和正常组织细胞存在较大差异,无法完全代表肿瘤组织或正常组织. 然而蛋白质组学技术毕竟使我们对大肠癌的研究更深入了一步,相信随着新技术的不断改进,蛋白质组会给我们带来更多的惊喜.

## 8 参考文献

- 1 詹启敏. 分子肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 285
- 2 Witzmann F, Clack J, Fultz C, Jarnot B. Two-dimensional electrophoretic mapping of hepatic and renal stress proteins. *Electrophoresis* 1995; 16: 451-459
- 3 Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-1091
- 4 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1920-1921
- 5 Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann ML, Berndt P, Engel AM, Schneidinger B, Pfeffer M, Andres H, Karl J, Bodenmüller H, Rüschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rösch W, Langen H, Zolg W, Tacke M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6550-6557
- 6 Roessler M, Rollinger W, Mantovani-Endl L, Hagmann ML, Palme S, Berndt P, Engel AM, Pfeffer M, Karl J, Bodenmüller H, Rüschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rösch W, Langen H, Zolg W, Tacke M. Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 2092-2101
- 7 Wu CC, Chen HC, Chen SJ, Liu HP, Hsieh YY, Yu CJ, Tang R, Hsieh LL, Yu JS, Chang YS. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. *Proteomics* 2008; 8: 316-332
- 8 Kim HJ, Kang HJ, Lee H, Lee ST, Yu MH, Kim H, Lee C. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J Proteome Res* 2009; 8: 1368-1379
- 9 Ma Y, Peng J, Liu W, Zhang P, Huang L, Gao B, Shen T, Zhou Y, Chen H, Chu Z, Zhang M, Qin H. Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 1878-1890
- 10 Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sánchez L, Casal JI. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; 5: 2602-2611
- 11 Kim H, Kang HJ, You KT, Kim SH, Lee KY, Kim TI, Kim C, Song SY, Kim HJ, Lee C, Kim H. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* 2006; 6: 3466-3476
- 12 Rho JH, Qin S, Wang JY, Roehrl MH. Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *J Proteome Res* 2008; 7: 2959-2972
- 13 Wang Y, Ma Y, Lü B, Xu E, Huang Q, Lai M. Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: a proteomic study. *Exp Biol Med* (Maywood) 2007; 232: 1152-1159
- 14 Yasui Y, Tanaka T. Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J Carcinog* 2009; 8: 10
- 15 Resing KA. Analysis of signaling pathways using functional proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 971: 608-614
- 16 Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ, Angers S, Moon RT. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 2007; 316: 1043-1046
- 17 Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex. *Gastroenterology* 2008; 134: 1961-1971, 1971.e1-e4
- 18 Mazzanti R, Solazzo M, Fantappiè O, Elfering S, Pantaleo P, Bechi P, Cianchi F, Ettl A, Giulivi C. Differential expression proteomics of human colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1329-G1338
- 19 Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, Wu W, Oshima R, Sakurai J, Nishikawa H, Yamaguchi S, Otsubo T. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today* 2006; 36: 1085-1093
- 20 Pei H, Zhu H, Zeng S, Li Y, Yang H, Shen L, Chen

**同行评价**  
本文较详细综述了蛋白质组学在大肠癌的研究进展,学术价值较好,对该领域的研究有一定参考价值.

- J, Zeng L, Fan J, Li X, Gong Y, Shen H. Proteome analysis and tissue microarray for profiling protein markers associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *J Proteome Res* 2007; 6: 2495-2501
- 21 Chang HJ, Lee MR, Hong SH, Yoo BC, Shin YK, Jeong JY, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Park JG. Identification of mitochondrial FoF1-ATP synthase involved in liver metastasis of colorectal cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 1184-1191
- 22 Allal AS, Kähne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics* 2004; 4: 2261-2269
- 23 Loeffler-Ragg J, Skvortsov S, Sarg B, Skvortsova I, Witsch-Baumgartner M, Mueller D, Lindner H, Zwierzina H. Gefitinib-responsive EGFR-positive colorectal cancers have different proteome profiles from non-responsive cell lines. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2338-2346
- 24 Tanaka S, Sakai A, Kimura K, Yoshida H, Fushitani H, Ogata A, Miyamoto A, Fukushima M, Wada A, Tanigawa N. Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Oncol* 2008; 33: 361-370
- 25 Wong CS, Wong VW, Chan CM, Ma BB, Hui EP, Wong MC, Lam MY, Au TC, Chan WH, Cheuk W, Chan AT. Identification of 5-fluorouracil response proteins in colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Oncol Rep* 2008; 20: 89-98
- 26 Mastrangelo L, Cassidy A, Mulholland F, Wang W, Bao Y. Serotonin receptors, novel targets of sulforaphane identified by proteomic analysis in Caco-2 cells. *Cancer Res* 2008; 68: 5487-5491
- 27 Stühler K, Köper K, Pfeiffer K, Tagariello A, Souquet M, Schwarte-Waldhoff I, Hahn SA, Schmiegler W, Meyer HE. Differential proteome analysis of colon carcinoma cell line SW480 after reconstitution of the tumour suppressor Smad4. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386: 1603-1612
- 28 Liu L, Zhao L, Zhang Y, Zhang Q, Ding Y. Proteomic analysis of Tiam1-mediated metastasis in colorectal cancer. *Cell Biol Int* 2007; 31: 805-814
- 29 Simpson RJ, Connolly LM, Eddes JS, Pereira JJ, Moritz RL, Reid GE. Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): development of a membrane protein database. *Electrophoresis* 2000; 21: 1707-1732

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》中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度、研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征、如研究对象是患者, 应阐明其临床表现、诊断标准、如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)



# FHIT基因转染对胆管癌细胞增殖与侵袭的影响

谢放, 黄强

谢放, 黄强, 安徽医科大学附属医院普外科 安徽省合肥市 230001

作者贡献分布: 谢放与黄强对本文贡献均等; 课题由黄强与谢放共同设计; 实验过程及数据分析由谢放完成; 本论文写作由谢放与黄强完成。

通讯作者: 黄强, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属医院普外科. hq\_sohu@sohu.cn

收稿日期: 2009-09-21 修回日期: 2009-10-27

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-28

## FHIT gene transfection inhibits the proliferation and invasiveness of human cholangiocarcinoma QBC939 cells

Fang Xie, Qiang Huang

Fang Xie, Qiang Huang, Department of General Surgery, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Correspondence to: Qiang Huang, Department of General Surgery, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. hq\_sohu@sohu.cn

Received: 2009-09-21 Revised: 2009-10-27

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the impact of fragile histidine triad (FHIT) gene transfection on the proliferation and invasiveness of human cholangiocarcinoma QBC939 cells.

**METHODS:** The recombinant FHIT eukaryotic expression plasmid was introduced into QBC939 cells by liposome-mediated transfection. Cell proliferation was tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell invasion was determined by Transwell chamber assay.

**RESULTS:** MTT assay showed that FHIT gene transfection significantly decreased the proliferation of QBC939 cells ( $P < 0.05$ ). Transwell chamber assay showed that the number of transfected cells that passed the Transwell membrane was significantly less than those of blank control and normal control cells ( $48 \pm 7$  vs  $109 \pm 14$  and  $104 \pm 12$ , respectively; both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** FHIT gene can inhibit the proliferation and invasiveness of human cholangiocarcinoma QBC939 cells.

**Key Words:** FHIT; Transfection; Proliferation; Invasiveness

Xie F, Huang Q. FHIT gene transfection inhibits the proliferation and invasiveness of human cholangiocarcinoma QBC939 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3437-3440

### 摘要

目的: 探讨FHIT基因对胆管癌细胞的增殖与侵袭的影响。

方法: 将含FHIT基因的重组真核表达质粒转染入胆管癌细胞株QBC939, 采用MTT实验检测转染前后细胞增殖活性, Transwell小室侵袭实验检测肿瘤细胞侵袭力。

结果: 转染后QBC939细胞的MTT吸光度明显下降( $P < 0.05$ ), 并且转移至小室滤膜下的细胞数明显减少( $48 \pm 7$  vs  $109 \pm 14$ ,  $104 \pm 12$ , 均 $P < 0.01$ )。

结论: FHIT基因能抑制胆管癌细胞株QBC939的增殖并降低其侵袭力。

**关键词:** FHIT; 转染; 增殖; 侵袭

谢放, 黄强. FHIT基因转染对胆管癌细胞增殖与侵袭的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3437-3440

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3437.asp>

### 0 引言

肿瘤是一种基因性疾病, 原癌基因激活、抑癌基因功能丧失以及一些修饰基因功能的改变致使细胞增殖失控、细胞分化异常和肿瘤细胞凋亡失衡, 从而导致肿瘤的发生和发展。本研究通过基因转染, 有限恢复胆管癌细胞抑癌基因的表达, 观察FHIT基因对胆管癌细胞增殖和侵袭的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料 FHIT/pcDNA3.1由我室自行构建; 胆

### 背景资料

FHIT基因是目前肿瘤研究的新兴领域和热点, 在多重肿瘤中的研究表明其可能成为基因治疗的一个靶点。基因转染作为一种广泛应用且成熟的分子生物学实验技术, 使研究者可以通过导入目的基因来研究其对实验对象的影响, 探讨可能的作用机制。

### 同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

### 研究背景

当前对FHIT基因的研究多见于乳腺癌、宫颈癌等少数几种肿瘤,且国外研究较多,对该基因在胆管癌的表达研究尚未引起重视。

管癌细胞株QBC939购于ScienCell Research Laboratories U.S.; 胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购于美国Sigma公司; SYBR Green I、荧光定量RT-PCR试剂购于上海闪晶生物试剂公司; Transwell小室、Matrigel Matrix、Fibronectin购于美国BD公司。XDS-1A倒置显微镜产于香港先达分析仪器有限公司; 紫外分光光度计产于美国GeneQuant Pro Amersham Biosciences; Biocell HT 1型全自动酶标仪产于奥地利Anthos Labtec Instru; 荧光定量PCR仪FTC2000产于加拿大Funglyn Biotech。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因转染:** 取经37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>环境传代培养至3-5代之QBC939细胞, 将我室构建的FHIT/pcDNA3.1通过脂质体瞬时转染法转染细胞。由于pcDNA3.1含有新霉素(Neomycin)抗性基因, 因此通过Neomycin筛选出成功转染的细胞。

**1.2.2 FHIT基因表达检测:** 转染后QBC939细胞的FHIT表达情况通过荧光定量RT-PCR进行检测。根据GenBank所查询的序列, 使用Primer Express软件设计引物: 上游引物F 5'-GAGTCGG GACAGTGGTGGA-3'; 下游引物R 5'-GCTTCTG CTGCCATTTCCTC-3', 看家基因选择h<sub>2</sub>actin。按试剂说明书设定荧光定量PCR反应体系及参数, 确定标准曲线后进行荧光定量PCR。3个实验组各做6次重复实验, 每次目的基因和看家基因的Ct值相减得到 $\Delta Ct$ , 把未经处理的样品(自然对照组)作为参照因子(calibrator), 经看家基因均一化处理后, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算<sup>[1]</sup>。目标基因表达差异通过经过处理的样本相对于未经处理的样本的倍数来表示。

**1.2.3 细胞增殖检测:** MTT法测定细胞增殖情况的原理是活细胞特别是增殖细胞通过线粒体脱氢酶将MTT(淡黄色)分解为蓝紫色的甲瓚(formazan)结晶而显色, 甲瓚可以被DMSO等有机溶剂溶解, 测定其光吸收值能够反映细胞的增殖情况。收集培养到对数生长期的QBC939细胞, 调整细胞悬液浓度, 用微量移液器加入96孔板中, 每孔100  $\mu$ L, 未使用的边缘孔用无菌PBS填充。按设计的3个观察组, 每组设4个重复孔, 共设6列, 从转染当天起每天检测一列。

**1.2.4 Transwell小室侵袭实验:** 构建Transwell小室系统, 自上而下依次为: 不含血清的上层培养液、细胞、基质胶、聚碳酸酯膜、含血清的下层培养液、培养板、纤维粘连蛋白。上室种植肿瘤细胞, 下室加入含胎牛血清的培养基, 肿瘤

表 1 FHIT荧光定量PCR结果

|       | $\Delta Ct$     | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|-------|-----------------|-------------------|------------------------|
| 自然对照组 | 5.63 $\pm$ 0.13 | 0.00 $\pm$ 0.13   | 1.00(0.91 - 1.09)      |
| 空白对照组 | 5.27 $\pm$ 0.08 | -0.36 $\pm$ 0.08  | 1.28(1.21 - 1.36)      |
| 实验组   | 4.29 $\pm$ 0.05 | -1.34 $\pm$ 0.05  | 2.53(2.45 - 2.62)      |

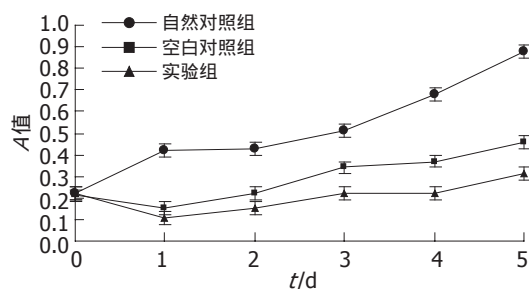


图 1 MTT法观察细胞增殖情况。

细胞会向营养成分高的下室迁移, 在聚碳酸酯膜上室侧铺上一层基质胶, 用以模仿体内细胞外基质, 细胞欲进入下室, 先要分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)将基质胶降解, 方可通过聚碳酸酯膜。于24孔板设置3组, 8列重复实验, 经结晶紫染色后, 随机取左上、左下、右上、右下及中心5个视野, 倒置显微镜下直接计数进入下室的细胞量可反映肿瘤细胞的侵袭能力。

**1.2.5 实验分组:** 本着实验需要, 保证随机性和对照原则, 将实验对象分为3组: 自然对照组(自然生长的QBC939细胞)、空白对照组(转染了pcDNA3.1空质粒的QBC939细胞)和实验组(转染了FHIT/pcDNA3.1重组质粒的QBC939细胞)。

**统计学处理** 所得数据均以mean  $\pm$  SD表示, 采用单因素方差分析, 组间比较采用Bonferroni检验。所有数据录入SPSS17.0软件进行计算, 以 $P < 0.05$ 作为差异有显著的统计学意义。

## 2 结果

**2.1 FHIT基因表达变化** 荧光定量PCR显示, 实验组在质粒转染后, FHIT的表达比2个对照组有所升高, 表达量比自然生长的QBC939细胞高出2.53倍, 可见转染后的FHIT基因表达有限恢复(表1)。

**2.2 细胞增殖** 从每天MTT检测情况结合统计分析, 实验当天(记为“第0天”)各组 $A_{490}$ 值差别无统计学意义, 各组处于接种时的状态; 随着时间的推移, 由于转染对细胞生长有一定毒性作用, 因此2个对照组间的 $A_{490}$ 值的差异具有统计

表 2 MTT检测 $A_{490}$ 值

|       | 第0天         | 第1天                      | 第2天                      | 第3天                      | 第4天                      | 第5天                      |
|-------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 自然对照组 | 0.22 ± 0.02 | 0.42 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.43 ± 0.05 <sup>b</sup> | 0.51 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.68 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.88 ± 0.08 <sup>b</sup> |
| 空白对照组 | 0.21 ± 0.01 | 0.15 ± 0.03              | 0.22 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.34 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.37 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.46 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| 实验组   | 0.22 ± 0.02 | 0.11 ± 0.03              | 0.15 ± 0.03              | 0.22 ± 0.04              | 0.22 ± 0.03              | 0.31 ± 0.05              |
| F值    | 0.465       | 135.600                  | 87.470                   | 60.340                   | 259.400                  | 81.780                   |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 实验组.

表 3 侵袭实验观察值

|     | 自然对照组    | 空白对照组    | 实验组                      |
|-----|----------|----------|--------------------------|
| 观察值 | 109 ± 14 | 104 ± 12 | 48 ± 7                   |
| F值  |          |          | 71.85                    |
| P值  |          |          | 4.05 × 10 <sup>-10</sup> |

学意义( $P < 0.01$ ); 同时, 2个对照组间与实验组的 $A_{490}$ 值的差异均有显著的统计学意义( $P < 0.05$ ), 实验组细胞增殖相对于2个对照组被明显抑制(表2, 图1).

**2.3 细胞侵袭力变化** 结果显示2个对照组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 实验组与2个对照组间的差异均有显著的统计学意义( $P < 0.01$ ), 说明实验组的胆管癌细胞侵袭力减弱(表3).

### 3 讨论

胆管癌是一种严重威胁生命健康的恶性肿瘤, 其起病隐匿、恶性程度高, 尤其体现在胆管癌细胞增殖能力和侵袭性较强等方面. 对胆管癌的相关研究发现, 胆管癌细胞的FHIT表达丢失, 且与癌基因的过表达呈线性相关<sup>[2]</sup>, 因此该基因可能与胆管癌的发生、发展关系密切.

FHIT是由Ohta *et al*于1996年发现并命名<sup>[3]</sup>. 其主要特点是: 在脆性区域端检测有很多Alu序列, 富含AT, 可能是DNA复制的起点; 几乎所有外显子均以AC序列结束, 为通常所见基因剪接受体位点序列. FHIT基因在细胞凋亡和细胞周期调控中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>. FHIT基因编码的蛋白与微管蛋白结合, 可阻止细胞有丝分裂过程, 抑制细胞过度增殖, 从而发挥抑癌功能<sup>[6]</sup>; 此外, 还具有二腺苷酸三磷酸水解酶活性, 可以产生ATP, 虽然此活性的抑癌机制尚有争议, 但其作用已得到证实. 近年来的大量研究发现, 多种肿瘤组织中FHIT蛋白表达存在降低或丢失, 并发现这与FHIT基因转录及缺失有关, 提示FHIT基因为多种肿瘤的候选抑制基因<sup>[7]</sup>. FHIT转录产物

异常及FHIT蛋白表达缺失或减少, 已在多种原发肿瘤及肿瘤细胞株中得到证实, 尤其在与环境致癌因素密切相关的肿瘤如胃癌、肺癌、食管癌、宫颈癌、肝癌等<sup>[8-11]</sup>更是如此. 而侵袭性是肿瘤细胞浸润和远处转移的主要表现, 尤其是恶性肿瘤最突出和致命的特点就是肿瘤转移. 肿瘤的浸润和转移给临床治疗带来的很大的难度.

那么是否可以通过分子生物学手段人工导入抑癌基因来影响肿瘤细胞的增殖和侵袭力呢? 为了探讨这种可能性, 本次研究通过构建FHIT真核表达质粒, 通过简便易行且效率较高的脂质体转染法, 在FHIT基因缺失的肿瘤细胞中导入FHIT cDNA, 由于瞬间转染在转染细胞培养数代后会出现稀释现象, 如采用稳定转染会可能更有效. 在检测基因的表达方面, 本研究运用更具特异性和更高准确度的荧光定量RT-PCR, 并采用MTT和小室侵袭实验等手段观察细胞生物学行为变化. 结果表明转染了含目的基因质粒的胆管癌细胞FHIT蛋白重新表达, 进而引起阻滞于S期和G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞数增多, 而细胞周期的两个重要节点之一即位于G<sub>1</sub>-S处, 因此凋亡细胞数增多, 令致癌性下降. 同时, 研究发现抑癌基因的表达恢复, 可以降低肿瘤细胞的侵袭力, 从而可能减少其浸润和远处转移, 降低其恶性程度.

总之, FHIT基因能抑制胆管癌细胞增殖并降低其侵袭性, 但其具体作用的分子生物学机制还有待进一步研究. 但FHIT作为一种抑癌基因, 能影响肿瘤细胞增殖周期, 诱导其凋亡, 可以作为基因治疗的一种候选基因, 在将来的肿瘤临床中发挥重要作用.

### 4 参考文献

- 1 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 2 赵坡, 吕亚莉, 钟梅, 李冰, 刘琳. 胆管细胞癌FHIT蛋白丢失与Cyclin D1蛋白表达的研究. *中华肿瘤防治杂志*

**相关报道**  
赵坡 *et al*采用免疫组织化学和统计学分析方法研究发现胆管癌中FHIT低表达且其表达与癌基因Cyclin D1表达呈负相关. Maitra *et al*发现FHIT基因为多种肿瘤的候选抑制基因.



## 同行评价

本文选题为该领域的研究热点,有一定科学性和可读性,但讨论不够深入,有待完善。

- 志 2007; 14: 1552-1555
- 3 Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-597
- 4 Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8489-8492
- 5 Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3615-3620
- 6 Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Ludueña RF, Barnes LD. The tumor suppressor protein Fhit. A novel interaction with tubulin. *J Biol Chem* 1999; 274: 24378-24382
- 7 Maitra A, Wistuba II, Washington C, Virmani AK, Ashfaq R, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am J Pathol* 2001; 159: 119-130
- 8 Butler D, Collins C, Mabruk M, Barry Walsh C, Leader MB, Kay EW. Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features. *J Pathol* 2000; 192: 502-510
- 9 Yuan BZ, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1049-1053
- 10 张淑红, 张向宁. 脆性位点抑癌基因FHIT和WWOX蛋白与卵巢上皮癌的相关性. *实用医药杂志* 2008; 25: 786-789
- 11 Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1216-1219

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》名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误,外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者,直接采用原有英语词,如中风stroke,发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词,如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者,宜用汉语拼音,如阴yin,阳yang,阴阳学说yinyangology,人中renzhong,气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写,如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(科学编辑:李军亮 2009-11-28)

# 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型组织中c-jun表达的影响

贺捷, 哈木拉提·吾甫尔, 黄静静, 吴军, 库热西·玉努斯

贺捷, 新疆医科大学基础医学院机能中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

哈木拉提·吾甫尔, 新疆地方病分子生物学重点实验室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

黄静静, 库热西·玉努斯, 新疆医科大学生物化学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

吴军, 新疆医科大学公共卫生学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

国家自然科学基金资助项目, No. 30460163

作者贡献分布: 此课题由库热西·玉努斯设计并撰写; 研究过程由贺捷与黄静静共同完成; 哈木拉提·吾甫尔提供维医药的理论指导; 研究所用新试剂及分析工具由库热西·玉努斯提供; 数据分析由吴军完成; 本论文写作由贺捷与黄静静完成。

通讯作者: 库热西·玉努斯, 教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学生物化学教研室。

kurexiyunusi@hotmail.com

电话: 0991-4361143

收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-11-09

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Xipayi Kui Jie'an downregulates c-jun expression in rat ulcerative colitis

Jie He, Hamulati Wufuer, Jing-Jing Huang, Jun Wu, Kurexi Yunusi

Jie He, Center of Medical Functional Experiment, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Hamulati·Wufuer, Xinjiang Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jing-Jing Huang, Kurexi·Yunusi, Department of Biochemistry, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jun Wu, College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30460163

Correspondence to: Professor Kurexi·Yunusi, Department of Biochemistry, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. kurexiyunusi@hotmail.com

Received: 2009-09-18 Revised: 2009-11-09

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of Uyghur medicine Xipayi Kui Jie'an (KJA) on c-jun expression in rat ulcerative colitis (UC).

**METHODS:** Wistar rats were used to induce UC with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and acetic acid. The UC rats were then divided into five groups: normal saline group, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) group, and low-, medium- and high-dosage KJA groups. The expression of c-jun mRNA and protein was detected by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

**RESULTS:** No significant differences were noted in the expression level of c-jun mRNA among each group. Compared with the normal saline (NS) group and the 5-aminosalicylic acid group, the expression levels of c-jun protein was significantly down-regulated in the high-dosage KJA group ( $0.50 \pm 0.14$  vs  $0.84 \pm 0.44$  and  $0.79 \pm 0.17$ , respectively; both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** KJA exerts therapeutic action against UC in rats perhaps via downregulation of c-jun at the post-transcriptional level.

**Key Words:** Xipayi Kui Jie'an; c-jun; Ulcerative colitis

He J, Hamulati Wufuer, Huang JJ, Wu J, Kurexi Yunusi. Xipayi Kui Jie'an downregulates c-jun expression in rat ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3441-3445

## 摘要

**目的:** 探讨维药西帕依溃结安对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织中即刻早期原癌基因c-jun表达的影响。

**方法:** 采用2, 4-二硝基氯苯(DNCB)与乙酸复合法制备大鼠溃疡性结肠炎模型, 分为5组进行实验。应用RT-PCR和Western blot方法分别检测各组c-jun mRNA及其蛋白质表达。

**结果:** 在对大鼠溃疡性结肠炎模型治疗中, 维药西帕依溃结安大剂量治疗组中c-jun的蛋白质表达水平与生理盐水阴性对照组及5-氨基水杨酸组相比均明显下调, 差异有统计学意

## 背景资料

溃疡性结肠炎(UC)被世界卫生组织列为疑难病, 近年来发病率有明显增加趋势。该病的病因和发病机制尚未完全阐明, 成为消化病学研究的新热点。c-jun蛋白表达可能是炎症细胞活化的早期标志。作为原癌基因的c-jun及其蛋白产物在生命活动中起着极为重要的作用。所以研究c-jun在UC中的作用机制是十分必要的。

同行评议者  
杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

**创新盘点**  
本实验应用维药西帕依溃结安调节c-jun基因的表达,对于从分子水平上探讨维药的作用机制有重要意义。这不仅有利于治疗UC,还提高了维医药理论的现代化研究。

义( $0.50 \pm 0.14$  vs  $0.84 \pm 0.44$ ,  $0.79 \pm 0.17$ , 均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 维药西帕依溃结安可能是通过在转录后水平上降低c-jun在结肠中的表达来促进溃疡性结肠炎的愈合。

**关键词:** 西帕依溃结安; c-jun; 溃疡性结肠炎

贺捷, 哈木拉提·吾甫尔, 黄静静, 吴军, 库热西·玉努斯. 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型组织中c-jun表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3441-3445  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3441.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症,临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液稀便等,常反复发作,迁延不愈。该病还有发生癌变的可能<sup>[1-2]</sup>。由于其持续增高的发病率<sup>[3]</sup>,日益引起人们的关注。c-jun为即刻早期原癌基因。经研究推测炎症细胞内c-jun的表达可能是炎症细胞活化的早期标志,c-jun的表达产物亦可促进炎症细胞的增殖、分化,并可促进其进一步活化。目前c-jun与UC间关系的研究很少见,本实验旨在成功建立大鼠UC模型的基础上<sup>[4]</sup>探讨维药西帕依溃结安对模型结肠组织中c-jun mRNA及c-jun蛋白表达变化及其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康的SPF级Wistar大鼠,♂,体质量200-250 g,由新疆医科大学实验动物中心提供。2,4-二硝基氯苯(DNCB)(Sigma公司),山羊的β-actin mAb(Santa Cruz公司),c-jun抗体(兔多克隆抗体)(Santa Cruz公司),抗山羊及抗鼠的二抗(北京中杉金桥公司),TRIzol法总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(上海生工生物有限公司),BCA蛋白浓度检测试剂盒(德国MERK公司),维药西帕依溃结安(新疆维吾尔医研究所提供),垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司产品),其他试剂为进口或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 按完全随机法将Wistar大鼠(108只)分为生理盐水阴性对照组(21只,死3只)、5-氨基水杨酸(5-ASA)阳性对照组(21只,死6只)、西帕依溃结安治疗大剂量组(22只,死1只)、中剂量组(21只,死2只)、小剂量组(23只,死1只),分笼喂养。

**1.2.2 大鼠UC模型的建立:** 采用DNCB加乙酸双重诱导致敏复合法<sup>[5]</sup>,各实验组大鼠先适应性喂养1 wk后,颈背部脱毛,每天用2%的DNCB丙酮液滴背,每次5滴,用药14 d,于第15天用直径3 mm的导管经肛门插入大鼠结肠内5-8 cm注入0.25 mL 0.1%的DNCB乙醇液,第16天同法灌2 mL 5%的乙酸,作用15 s后立即注入5 mL生理盐水冲洗,以消除乙酸的作用(灌肠前24 h禁食,自由饮水)。各实验组灌酸7 d后进行治疗,用直径3 mm的导管经肛门插入大鼠结肠内8 cm左右分别注入生理盐水、5-氨基水杨酸、治疗药物维药西帕依溃结安:生理盐水阴性对照组2.25 mL/(100 g·d),5-氨基水杨酸阳性对照组100 mg/(kg·d),维药西帕依溃结安大剂量组225 mg/(kg·d),中剂量组150 mg/(kg·d),小剂量组75 mg/(kg·d),治疗20 d后脱颈椎处死各组大鼠,取距肛门5-8 cm的病变部位结肠于-80℃保存。

**1.2.3 RT-PCR法检测c-jun mRNA的表达:** 采用经典TRIzol法提取大鼠结肠组织总RNA,应用GeneQuant核酸定量分析仪测定总RNA的浓度和纯度,确保 $A_{260}/A_{280}$ 比值 $>1.8$ ,并经含有溴乙锭的10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,在20 μL反应体系中加入1 μg总RNA, Oligo (dT)18 (0.5 μg/μL)1 μL,加无RNA酶去离子水至总体积12 μL,混匀后离心3-5 s,70℃水浴5 min,冰浴30 s,离心3-5 s后再加入:5×Reaction Buffer 4 μL, RNase-inhibitor (20 U/μL)1 μL, dNTP Mix(10 mmol/L)2 μL。混匀离心3-5 s,37℃水浴5 min,加1 μL逆转录酶(20 U/μL),终体积为20 μL,42℃水浴1 h,70℃加热10 min,4℃终止反应。用cDNA模板1 μL对大鼠内参照β-actin及c-jun基因进行PCR扩增。运用Primer5.0设计软件设计内参照β-actin及c-jun基因的上下游引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成。内参照β-actin引物序列为:上游引物:5'-GGGACCTGACAGACTACCTC-3',下游引物:5'-GACAGCACTGTGTTGGCA TA G-3',产物长度352 bp。c-jun引物序列为:上游引物:5'-CCAGCAATGGGCACATCACC-3',下游引物:5'-CGTCTGCGGCTCTTCCTTCA-3',产物长度455 bp。反应体系为50 μL,其中含cDNA 1 μL,2×PCR Master Buffer 25 μL,上游引物1 μL(10 μmol/L),下游引物1 μL(10 μmol/L),无菌双蒸水补足至50 μL。扩增参数为:预变性94℃ 5 min,94℃变性30 s,退火30 s:β-actin退火温度为55℃。c-jun退火温度为56.6℃,72℃延伸45 s,共29个



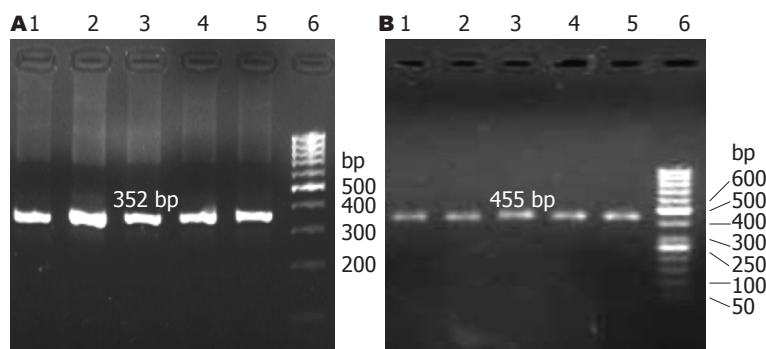


图 1 各组大鼠结肠组织c-jun表达。A:  $\beta$ -actin; B: c-jun; 1: 西帕依溃结安小剂量组; 2: 西帕依溃结安中剂量组; 3: 西帕依溃结安大剂量组; 4: 5-氨基水杨酸阳性对照组; 5: 生理盐水阴性对照组; 6: Marker。

**应用要点**  
本文结果提示, 维药西帕依溃结安可能是通过在转录后水平上降低c-jun在结肠中的表达来促进溃疡性结肠炎的愈合, 从而拓展维药西帕依溃结安的药用范围。

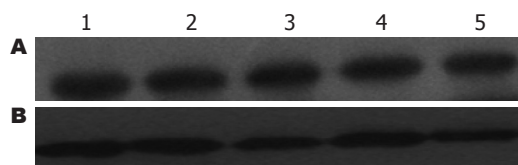


图 2 各组大鼠结肠组织中的c-jun蛋白表达。A:  $\beta$ -actin; B: c-jun; 1: 维药西帕依溃结安小剂量组; 2: 维药西帕依溃结安中剂量组; 3: 维药西帕依溃结安大剂量组; 4: 生理盐水阴性对照组; 5: 5-氨基水杨酸阳性对照组。

循环, 总延伸72℃ 10 min. PCR扩增产物于含有溴乙锭的20 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定, 并以Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder作为Marker. 电泳条件: 100 V进样5 min, 80 V电泳40 min, 紫外灯下观察结果, 并在凝胶成像仪上成像. 采用Quantity One图像分析软件分析数据, 获得各电泳条带的积分吸光度(X), 用 $\beta$ -actin的积分吸光度(A)作为内参照, 计算基因的相对表达量(X/A)作为实验数据。

**1.2.4 Western blot法检测C-jun蛋白的表达:** 将结肠组织标本称质量, 按1:5的比例加入细胞裂解液, 在冰上进行匀浆, 置于冰上裂解30 min后, 4℃下12 000 r/min离心5 min, 取上清分装后置于-80℃保存. 用BCA(bicinchoninic acid)比色法检测样品蛋白浓度(按试剂盒说明书操作), 并计算出上样体积. 样品中加入等体积的2×SDS上样缓冲液, 混匀后置于沸水中加热5 min使蛋白变性, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(条件: 稳流45 mA, 1.5 h), 用NC膜进行电转膜(条件: 稳压100 V, 2 h), 丽春红S染膜鉴定转膜结果, 根据Marker剪下相应的c-jun和 $\beta$ -actin蛋白条带(c-jun蛋白相对分子质量为39 kDa,  $\beta$ -actin内参照相对分子质量为43 kDa), 洗至背景变白后以50 g/L脱脂奶粉封闭液4℃封闭过夜, 用TBST洗膜3次×10 min后分别加入 $\beta$ -actin山羊mAb(1:200), c-jun抗体(兔多克隆抗体)(1:100)4℃孵育12 h, 用TBST洗膜3次×10 min, 分别加入结合有辣根过氧化物酶标记的抗山羊二抗(1:5000)、抗兔二抗(1:

4000)4℃孵育12 h, 用TBST洗膜3次×10 min, 于暗室中将杂交膜上滴加已混匀的ECM化学发光剂, X光胶片曝光, 显影, 定影, 使目的蛋白质印迹于X光胶片. 采用Image Tool凝胶图像分析系统对X光胶片扫描分析, 根据蛋白条带的面积和灰度计算出每个条带的积分吸光度. 以每组 $\beta$ -actin(内参照)表达的面积灰度值与c-jun表达的面积灰度值进行比较而进行半定量分析。

**统计学处理** 数据采用SPSS15.0统计软件处理. 半定量RT-PCR及半定量Western blot结果: 数据方差不齐, 采用Dunnett C检验进行组间两两比较,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 维药西帕依溃结安对大鼠结肠组织中c-jun mRNA表达的影响** RT-PCR 检测结果显示: 各实验组间大鼠结肠组织中c-jun mRNA的表达无显著差异( $P>0.05$ , 表1, 图1)。

**2.2 维药西帕依溃结安对大鼠结肠组织中的C-jun表达的影响** Western blot检测结果显示: 维药西帕依溃结安大剂量治疗组优于5-氨基水杨酸阳性对照组和生理盐水阴性对照组( $P<0.05$ 和0.01), 而5-氨基水杨酸阳性对照组则优于生理盐水阴性对照组( $P<0.05$ , 表1, 图2)。

## 3 讨论

UC是一种主要累及结肠、直肠的疾病. 免疫紊乱是致病的关键, 精神刺激、感染、劳累、饮食失调、过敏常为本病发病的诱因, 其中免疫紊乱近年来受到基本肯定的认识<sup>[6-8]</sup>. 感染、毒素、药物、精神刺激等始发因素能破坏肠上皮屏障, 使肠组织暴露于大量的肠抗原中, 在遗传易感的宿主诱发黏膜免疫反应, 引起免疫调节异常, 产生炎症过程并逐级扩大, 最后造成组织损伤<sup>[9-10]</sup>。

原癌基因(proto-oncogene)是一类广泛存在于原核细胞和真核细胞基因组内的高度保守基

## 名词解释

原癌基因(proto-oncogene): 是一类广泛存在于原核细胞和真核细胞基因组内的高度保守基因。许多疾病的病理变化都涉及他的表达。原癌基因和肿瘤抑制基因控制着正常细胞的生长和分化, 这些基因的改变被认为是一些人体恶性肿瘤发生的重要原因。

表 1 各组中c-jun mRNA及蛋白表达 (mean  $\pm$  SD)

| 分组             | n  | c-jun mRNA        | c-jun蛋白                       |
|----------------|----|-------------------|-------------------------------|
| 生理盐水阴性对照组      | 18 | 0.240 $\pm$ 0.441 | 0.84 $\pm$ 0.44               |
| 5-氨基水杨酸阳性对照组   | 15 | 0.654 $\pm$ 0.115 | 0.79 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>  |
| 维药西帕依溃结安大剂量治疗组 | 21 | 0.535 $\pm$ 0.186 | 0.50 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup> |
| 维药西帕依溃结安中剂量治疗组 | 19 | 0.068 $\pm$ 0.042 | 1.03 $\pm$ 0.03               |
| 维药西帕依溃结安小剂量治疗组 | 22 | 0.932 $\pm$ 0.721 | 0.84 $\pm$ 0.34               |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 生理盐水组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 5-氨基水杨酸组。

因。许多疾病的病理变化都涉及原癌基因的表达。c-jun属于myc基因家族, 是核内转录因子类原癌基因家族, 此类原癌基因的特点是具有高度的保守性, 其蛋白质表达在细胞核内, 并可作为转录因子直接影响细胞核中DNA的转录功能, 改变基因的表达。Matossin *et al*研究证实<sup>[11]</sup>, c-jun在细胞的增殖、活化分化过程中发挥重要作用。近年来的研究资料提示<sup>[12]</sup>: 原癌基因几乎参与信号传递通路的每一环节, 该类基因能对神经递质、激素、神经冲动等外界刺激引起的传入信息在数分钟内作出反应, 进行表达, 因而对生命活动起着极为重要的作用。程晓刚 *et al*研究表明<sup>[13]</sup>: c-jun在炎症中发挥着重要的作用, 多种炎性细胞因子(IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、TNF等)可直接或间接激活c-jun, 激活的c-jun进一步调节各相关细胞因子的表达调控, 从而参与炎症反应; 国内有学者认为, c-jun在外周组织中炎症细胞的表达增高, 可被视为一种炎症细胞活化的早期标志。另一方面, c-jun的表达产物c-jun蛋白亦可促进炎症细胞的增殖、分化, 并可促进其进一步活化。c-jun表达产物jun蛋白是细胞核内重要的转录因子, jun蛋白家族成员可以形成同源二聚体或者和Fos蛋白家族成员形成异源二聚体组成转录活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)转录因子AP-1。后者整合上游传来的信号, 进而调节其下游一系列基因启动子区域含有AP-1结合位点靶基因的转录表达, 是细胞增殖及生物合成的早期标志之一。AP-1调节的很多靶基因产物参与肿瘤细胞侵袭, 该过程需要降解细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)成分以促使血管形成及细胞迁徙<sup>[14-15]</sup>。肿瘤的侵袭和转移需要突破细胞外基质屏障, 这一过程由蛋白水解酶(丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶)降解细胞外基质成分完成, 而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是其中较为重

要的一类, 研究显示UC易发生癌变, AP-1介导的MMP-7参与了UC相关性癌的发生<sup>[16]</sup>。

西帕依溃结安处方来自维吾尔医名方“西帕依固龈液”, 具有去腐生肌、收敛止痢的功效<sup>[17]</sup>, 为《中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册》1999年版收载品种, 他由没食子一味药组成。没食子(turkishgalls)中含有大量的可水解鞣质, 其具有固涩、收敛、燥湿、止血<sup>[18]</sup>、消炎、防腐、抗腹泻<sup>[19]</sup>的作用, 用于大肠虚滑、泻痢不止、习惯性肠炎、痔疮出血、蔓延性疮疥、斑秃、黄水疮、牙龈松弛、牙周炎<sup>[20]</sup>、口臭、咽喉炎、中耳炎、类囊炎等的治疗。西帕依溃结安是一种液体灌肠制剂, 灌肠给药可使药物直达病变部位, 提高病变部位的血药浓度, 保护肠道溃疡面, 改善局部的血流, 能较快的解除炎症症状, 促进溃疡愈合, 并可避免或减少消化液和消化酶对药物作用的影响和破坏, 有利于药物作用的发挥。西帕依溃结安已被应用于临床治疗, 发现此药不良反应少, 患者容易接受, 取得了较好的临床疗效。

据前期实验已知模型组中c-jun蛋白表达高于正常组<sup>[21]</sup>。本实验的结果也显示, 各治疗组c-jun mRNA表达无明显差异, 但c-jun蛋白表达则有差异: 5-氨基水杨酸治疗组中c-jun蛋白表达低于生理盐水阴性对照组( $P < 0.05$ ), 维药西帕依溃结安治疗大剂量组c-jun蛋白表达低于5-氨基水杨酸治疗组、生理盐水阴性对照组( $P < 0.01$ 和 $0.05$ ), 5-氨基水杨酸是西医临床用来治疗炎症性肠病的常用药, 但维药西帕依溃结安与5-氨基水杨酸相比, 治疗效果更好。我们推测: (1)c-jun可能是维药西帕依溃结安治疗UC的作用靶点。据研究已经证实: 大鼠UC组织中NF- $\kappa$ B、iNOS、IL-6基因mRNA表达较正常结肠组织明显增高, 经维药西帕依溃结安治疗后, NF- $\kappa$ B、iNOS、IL-6基因mRNA表达较模型组结肠组织明显降低<sup>[22-23]</sup>。模型组中c-jun蛋白的高表达

一方面可能是在各种炎性因子的作用下使c-jun基因的转录活性增强所致; 另一方面, 高表达的c-jun蛋白又促进了各种炎性因子的活化及释放, 形成正反馈作用, 即NF- $\kappa$ B活化引起c-jun的过度或持续表达, 形成一个正反馈调节, 导致持续或放大的炎症反应, 引起结肠黏膜损伤. 用维药西帕依溃结安治疗的过程中, 则是通过降低结肠中c-jun的表达来促进UC的愈合. c-jun表达受抑制使AP-1生成减少, 进而MMP减少, 不能分解ECM, 有利于损伤组织的修复, c-jun表达量减少同时有可能降低其他促炎因子, 结果抗炎因子的作用占优势或有利于促炎因子与抗炎因子间平衡的恢复, 从而促进UC的愈合. (2)维药西帕依溃结安调节c-jun的表达在转录后水平上进行.

本实验发现维药西帕依溃结安调节c-jun基因的表达, 这不仅对UC治疗有利, 还有可能预防UC的癌变, 从而拓展维药西帕依溃结安的药用范围.

#### 4 参考文献

- 1 Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535
- 2 Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91: 854-862
- 3 江学良, 崔慧斐. 溃疡性结肠炎. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 1-12
- 4 贺捷, 阿孜古力·克热木, 苟晓玉, 库热西·玉努斯. 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究. *新疆医科大学学报* 2008; 31: 1651-1654
- 5 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐风. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型. *青海医学院学报* 1999; 20: 1-3
- 6 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 175-184
- 7 Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 861-865
- 8 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
- 9 张素真, 张德纯. 溃疡性结肠炎发病的免疫学机制. *国际检验医学杂志* 2006; 27: 419-424
- 10 陈勇, 陈如山. 溃疡性结肠炎免疫学发病机理及中医药治疗探讨. *深圳中西医结合杂志* 2006; 16: 56-60
- 11 Shaw RJ, Doherty DE, Ritter AG, Benedict SH, Clark RA. Adherence-dependent increase in human monocyte PDGF(B) mRNA is associated with increases in c-fos, c-jun, and EGR2 mRNA. *J Cell Biol* 1990; 111: 2139-2148
- 12 戚好文, 刘振千, 高培松, 穆士杰, 刘林英. c-jun在豚鼠哮喘气道上皮细胞中的表达. *中华内科杂志* 1997; 36: 476-477
- 13 程晓刚, 栗永萍, 罗成基, 刘晓宏. C-jun蛋白对糖皮质激素受体表达及转录激活能力的影响. *免疫学杂志* 2005; 21: 106-109
- 14 张剑锋, 高庆春. 基质金属蛋白酶与结直肠癌的侵袭和转移. *国际外科学杂志* 2007; 34: 323-325
- 15 张庆原, 张剑宁. VEGF、uPA在侵袭性垂体腺瘤中的表达及意义. *中华神经外科疾病研究杂志* 2007; 6: 146-149
- 16 Newell KJ, Matrisian LM, Driman DK. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2002; 34: 59-63
- 17 Glick ME, Falchuk ZM. Dinitrochlorobenzene-induced colitis in the guinea-pig: studies of colonic lamina propria lymphocytes. *Gut* 1981; 22: 120-125
- 18 石碧, 狄莹, 何有节, 范浩军. 鞣质的药理活性. *中草药* 1998; 29: 487-490
- 19 王丽敏, 卢春风, 路雅真, 傅正宗, 刘娟. 老鹳草鞣质类化合物的抗腹泻作用的研究. *黑龙江医药科学* 2003; 26: 28-29
- 20 江苏新医学院编. 中药大词典. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 1169
- 21 龙梅, 克拉拉·阿巴斯, 阿不来提·阿合买提, 黄静静, 库热西·玉努斯. 溃疡性结肠炎大鼠白细胞介素-6、c-jun的表达及意义. *新疆医科大学学报* 2007; 30: 446-448
- 22 黄国虹, 黄静静, 哈木拉提·吾甫尔, 贺捷, 陈蓉, 库热西·玉努斯. 大鼠溃疡性结肠炎组织中c-fos与iNOS mRNA的表达. *新疆医科大学学报* 2007; 29: 938-941
- 23 郭霞, 吴桂霞, 哈木拉提·吾甫尔, 黄国虹, 武贵臻, 库热西·玉努斯. 大鼠溃疡性结肠炎实验模型中核因子 $\kappa$ B p65、COX-2的表达研究. *新疆医科大学学报* 2007; 29: 921-924

#### 同行评价

本研究探讨了维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型组织中c-jun表达的影响, 有一定的科学意义和可读性.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



# 错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及意义

夏 頔, 刘希双, 杨 堃, 隋爱华

**背景资料**  
DNA错配修复系统首先在原核生物中被发现, 随后在酵母及更高等的真核生物中亦发现相似的MMR活性。自1993年由Fishe *et al*分离克隆到第一个人类MMR基因hMSH2后, 到目前为止, 从人体细胞中共分离克隆到9个MMR基因, 其中与大肠杆菌MutS同源的基因有hMSH2、hMSH3、hMSH4、hMSH5和hMSH6, 与大肠杆菌MutL同源的基因有hMLH1、hMLH3、hPMS1和hPMS2。

夏 頔, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗科 山东省青岛市 266003  
杨 堃, 隋爱华, 青岛大学附属医院临床医学研究所 山东省青岛市 266003  
作者贡献分布: 夏 頔、刘希双、杨 堃及隋爱华对此文所作贡献均等; 此课题由夏 頔与刘希双设计; 研究过程由夏 頔操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨 堃与隋爱华提供; 数据分析由夏 頔与刘希双完成; 本论文写作由夏 頔与刘希双完成。  
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疗科。liuxishuang1@sina.com  
电话: 0532-82911525  
收稿日期: 2009-10-19 修回日期: 2009-11-09  
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Significance of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 expression in gastric cancer

Di Xia, Xi-Shuang Liu, Kun Yang, Ai-Hua Sui

Di Xia, Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopic diagnosis and therapy, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Kun Yang, Ai-Hua Sui, Institute of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopic diagnosis and therapy, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, 16 Jiangshu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com  
Received: 2009-10-19 Revised: 2009-11-09  
Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of mismatch repair genes human mutL homolog 1 (hMLH1) and human mutL homolog 2 (hMSH2) in the carcinogenesis of gastric cancer.

**METHODS:** A total of 40 gastric cancer patients who underwent surgical resection at our hospital were included in the study, of which 33 were pathologically diagnosed as adenocarcinoma, and 7 as mucinous adenocarcinoma. All the patients did not underwent preoperative chemotherapy or immunotherapy. The gastric cancer specimens, matched cancer-adjacent tissue specimens, and 20 chronic gastritis mucosa specimens (10 diagnosed as chronic superficial gastritis

by gastroscopic biopsy, and 10 as chronic atrophic gastritis) were collected. The expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in these specimens was detected by Western blot.

**RESULTS:** The positive rate of hMSH2 expression in cancer tissue was significantly higher than those in cancer-adjacent tissue and gastritis mucosa tissue ( $0.28 \pm 0.10$  vs  $0.23 \pm 0.07$  and  $0.11 \pm 0.10$ , respectively; both  $P < 0.01$ ). The positive rate of hMLH1 expression in cancer tissue was significantly lower than those in cancer-adjacent tissue and gastritis mucosa tissue ( $0.22 \pm 0.06$  vs  $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.26 \pm 0.06$ , both  $P < 0.01$ ). The positive rates of hMLH1 and hMSH2 expression were not correlated with various clinicopathological parameters in gastric cancer.

**CONCLUSION:** High hMSH2 expression and low hMLH1 expression may be potential markers for prediction of the development of gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; hMLH1; hMSH2; Western blot

Xia D, Liu XS, Yang K, Sui AH. Significance of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3446-3450

## 摘要

**目的:** 探讨错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌发生中的作用。

**方法:** 收集青岛大学医学院附属医院普外科手术切除的胃癌组织40例, 经病理诊断腺癌33例, 黏液腺癌7例, 患者术前均未接受放化疗和免疫治疗, 每例均取相应癌旁组织。胃镜活检20例慢性胃炎黏膜组织(慢性浅表性胃炎10例, 慢性萎缩性胃炎10例)。采用Western blot法检测hMLH1和hMSH2蛋白在胃癌组织、癌旁组织及胃炎组织中的表达。

**结果:** 胃癌组织中hMSH2蛋白的表达显著高

**同行评议者**  
郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

于癌旁组织和胃炎组织( $0.28 \pm 0.10$  vs  $0.23 \pm 0.07$ ,  $0.11 \pm 0.10$ , 均 $P < 0.01$ ); hMLH1蛋白在胃炎组织和癌旁组织中的表达显著高于胃癌组织( $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.26 \pm 0.06$  vs  $0.22 \pm 0.06$ , 均 $P < 0.01$ ); hMLH1和hMSH2在胃癌中的表达与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度、组织学类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移等无关, 差异均无显著性。

结论: hMSH2高表达可能是胃癌发生的标志之一, 而hMLH1则可能是胃癌预警组织的一种标志物。

关键词: 胃癌; hMLH1; hMSH2; 蛋白印迹法

夏岷, 刘希双, 杨堃, 隋爱华. 错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3446-3450  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3446.asp>

## 0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 每10万人口的年死亡率为25.12, 在各种恶性肿瘤中占首位. 肿瘤的发生需经过一个较长的、多步骤的过程, 涉及多个癌基因的激活和抑癌基因的失活. 近年来的研究表明, 错配修复基因(mismatch repair, MMR)的突变也参与肿瘤的发生. MMR是人体细胞的一种能修复DNA碱基错配的安全保障体系, 由一系列特异性修复DNA碱基错配的酶分子组成, 能修复各种因素所致的DNA碱基错配、小片段插入或缺失、小环形成等形式的DNA损伤和基因结构异常, 在维持基因结构稳定性、降低基因突变率、保证遗传信息稳定性方面起重要作用. 在以往对遗传性非息肉性大肠癌等遗传性肿瘤的研究中发现, MMR基因中hMLH1和hMSH2的异常改变具有突出地位<sup>[1]</sup>. 本研究采用Western blot法, 检测胃癌、癌旁和胃炎组织中hMLH1和hMSH2基因的表达情况, 探究胃癌发病的相关分子机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 标本取自青岛大学医学院附属医院普外科手术切除的胃癌组织40例, 男25例, 女15例, 年龄36.3-78.6(平均年龄58.2)岁, 男女比5:3, 经病理诊断腺癌33例, 黏液腺癌7例. 患者术前均未接受放化疗和免疫治疗, 每例均取相应癌旁组织, 即距离癌组织边缘5 cm的组织. 胃镜活检20例慢性胃炎黏膜组织(慢性浅表性胃炎10

例, 慢性萎缩性胃炎10例), 男9例, 女11例, 年龄21-67(平均年龄46.3)岁. 新鲜标本取出后置于-70℃冰箱保存备用. 抗hMSH2小鼠mAb(Santa Cruz Biotechnology, 稀释比例1:100), 抗hMLH1小鼠mAb(Santa Cruz Biotechnology, 稀释比例1:200), 内参GAPDH(联科生物, 原产美国, 稀释比例1:500), 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(联科生物, 原产美国, 稀释比例1:2000).

## 1.2 方法

1.2.1 蛋白样品制备: 分别取胃癌组织、癌旁组织及胃炎组织各100 mg加入200 μL裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1 mmol/L EDTA, pH8.0; 5 mmol/L DTT; 2% SDS), 置冰上用研磨棒研磨组织, 并加入蛋白酶抑制剂(与裂解液1:100比例配制)提取组织总蛋白, 13 000 r/min离心15 min, 吸取含蛋白的上清液. BCA法测定蛋白浓度。

1.2.2 Western blot: 取50 μg蛋白在10% SDS-PAGE胶上100 V恒压电泳分离2 h, 转移至PVDF膜上. 1%的脱脂奶粉室温封闭2 h, 一抗置杂交袋中与膜杂交4℃孵育过夜, GAPDH作为内参. 取出膜TTBS洗4次×10 min, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h, TTBS洗3次×10 min. 最后用将PVDF膜用ECL发光液充分润湿后作用1 min, 保鲜膜覆盖, 置暗盒中曝光3 min. 显影、水洗、定影后观察结果。

1.2.3 结果分析: 应用BIO-RAD图像分析软件对Western blot杂交条带进行密度扫描, 以hMSH2及hMLH1条带灰度值与GAPDH条带灰度值比值表示各组织中hMSH2及hMLH1的表达水平(灰度值为条带密度值及面积值的乘积, 设空白对照相对密度值为0)。

统计学处理 用SPSS11.5统计软件对相关数据进行方差分析。

## 2 结果

2.1 胃癌、癌旁及胃炎黏膜组织中hMSH2表达 hMSH2蛋白在10例浅表性胃炎黏膜组织10例全失表达, 失表达率为100%, 10例萎缩性胃炎黏膜组织4例失表达, 失表达率为40%. 胃癌组hMSH2蛋白表达明显高于癌旁组( $F = 8.798$ ,  $P = 0.004$ ), 胃癌组与胃炎组比较hMSH2蛋白表达明显增多( $F = 33.969$ ,  $P < 0.01$ ), 癌旁组与胃炎组比较差别有统计学意义( $F = 28.590$ ,  $P < 0.01$ ), 具体结果见表1, 部分组织标本Western blot检测结果见图1。

2.2 胃癌、癌旁及胃炎黏膜中hMLH1表达 胃炎

相关报道  
Fleisher *et al*在对65例胃癌的研究中发现了MSI、启动子甲基化和Hml-H1基因沉默这三者之间的密切相关. Fleisher *et al*发现MSI胃癌组织中hMLH1表达减少, 并证实hMLH1基因的过甲基化与胃癌MSI有关。

## 应用要点

本研究发现, hMLH1和hMSH2参与胃癌的发生、发展; hMSH2高表达可能是胃癌发生的标志之一, 而hMLH1则可能是胃癌预警组织的一种标志物。为胃癌的病因研究及早期诊断预后等方面提供依据。

表 1 胃癌和相应癌旁以及胃炎组织中hMSH2和hMLH1蛋白的表达 (mean ± SD)

|       | 胃癌组                      | 癌旁组         | 胃炎组         |             |
|-------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
|       |                          |             | 萎缩性         | 浅表性         |
| hMSH2 | 0.28 ± 0.09 <sup>b</sup> | 0.23 ± 0.07 | 0.11 ± 0.10 | 0           |
| hMLH1 | 0.22 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.26 ± 0.06 | 0.25 ± 0.08 | 0.30 ± 0.05 |

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 胃炎组。

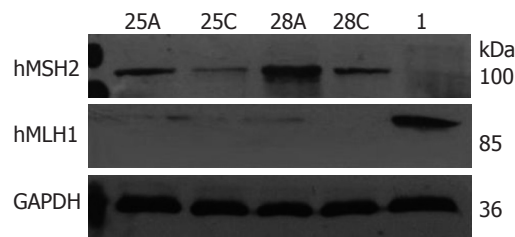


图 1 Western blot检测部分标本hMSH2、hMLH1及GAPDH蛋白表达。

表 2 hMSH2及hMLH1蛋白表达与患者临床病理特征之间的相关性 (mean ± SD)

| 病理特征                | <i>n</i> | hMSH2蛋白表达   | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 | hMLH1蛋白表达   | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|---------------------|----------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 年龄(岁)               |          |             |            |            |             |            |            |
| 50                  | 28       | 0.28 ± 0.10 | 0.324      | 0.573      | 0.21 ± 0.06 | 1.275      | 0.266      |
| >50                 | 12       | 0.30 ± 0.10 |            |            | 0.24 ± 0.07 |            |            |
| 性别                  |          |             |            |            |             |            |            |
| 男                   | 25       | 0.28 ± 0.11 | 0.021      | 0.886      | 0.22 ± 0.06 | 0.199      | 0.658      |
| 女                   | 15       | 0.28 ± 0.05 |            |            | 0.22 ± 0.07 |            |            |
| 肿瘤部位                |          |             |            |            |             |            |            |
| 胃窦                  | 25       | 0.29 ± 0.08 | 0.034      | 0.856      | 0.22 ± 0.07 | 0.046      | 0.831      |
| 胃体底                 | 15       | 0.28 ± 0.10 |            |            | 0.22 ± 0.06 |            |            |
| 肿瘤最大径(cm)           |          |             |            |            |             |            |            |
| 5                   | 23       | 0.30 ± 0.07 | 2.086      | 0.157      | 0.23 ± 0.06 | 1.595      | 0.214      |
| >5                  | 17       | 0.26 ± 0.10 |            |            | 0.20 ± 0.07 |            |            |
| 组织学类型               |          |             |            |            |             |            |            |
| 腺癌                  | 33       | 0.29 ± 0.09 | 0.417      | 0.522      | 0.22 ± 0.06 | 0.044      | 0.835      |
| 黏液腺癌                | 7        | 0.26 ± 0.11 |            |            | 0.21 ± 0.07 |            |            |
| 浸润深度                |          |             |            |            |             |            |            |
| 黏膜下层                | 6        | 0.32 ± 0.08 | 0.504      | 0.465      | 0.21 ± 0.06 | 0.975      | 0.415      |
| 肌层                  | 9        | 0.27 ± 0.05 |            |            | 0.20 ± 0.06 |            |            |
| 浆膜层                 | 14       | 0.27 ± 0.09 |            |            | 0.24 ± 0.05 |            |            |
| 浆膜外层                | 11       | 0.28 ± 0.12 |            |            | 0.21 ± 0.07 |            |            |
| 淋巴结转移               |          |             |            |            |             |            |            |
| 有                   | 29       | 0.28 ± 0.10 | 0.545      | 0.465      | 0.21 ± 0.06 | 2.231      | 0.144      |
| 无                   | 11       | 0.30 ± 0.08 |            |            | 0.24 ± 0.06 |            |            |
| 远处转移                |          |             |            |            |             |            |            |
| 有                   | 9        | 0.27 ± 0.05 | 0.141      | 0.709      | 0.21 ± 0.07 | 0.529      | 0.472      |
| 无                   | 31       | 0.29 ± 0.10 |            |            | 0.22 ± 0.06 |            |            |
| <i>H. pylori</i> 感染 |          |             |            |            |             |            |            |
| -                   | 26       | 0.28 ± 0.10 | 0.459      | 0.502      | 0.22 ± 0.07 | 0.017      | 0.897      |
| +                   | 14       | 0.27 ± 0.06 |            |            | 0.22 ± 0.06 |            |            |

黏膜组织及癌旁组织中hMLH1蛋白的表达明显高于胃癌组织( $F = 9.798$ ,  $9.056$ ,  $P = 0.003$ ); 胃炎组与癌旁组比较差别无统计学意义( $F = 1.244$ ,  $P = 0.281$ ); 胃炎组中浅表性胃炎与萎缩性胃炎比较差别无统计学意义( $F = 2.885$ ,  $P = 0.107$ ), 具体结果见表1, 部分组织标本Western blot检测结果见图1。

## 2.3 hMSH2及hMLH1蛋白表达与患者临床病理

特征之间的关系 hMSH2及hMLH1蛋白表达在患者不同年龄组、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度、组织学类型、分化程度、淋巴结转移及临床分期等比较, 差异均无显著性( $P > 0.05$ , 表2)。

## 3 讨论

MMR基因是一组高度保守的管家基因, 具有修



复DNA碱基错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性突变的功能<sup>[2-3]</sup>。近年来分子生物学的研究表明, 基因的不稳定性是人类癌症多步骤发生过程中最重要的环节, 能增加正常突变速率及致癌基因及抑癌基因的突变, 基因组的稳定性有赖于高度保真的DNA复制, 内外环境的各种因素都可能造成DNA损伤。MMR在修复DNA复制过程中的错误和内源性、外源性因素造成的损伤中具有重要作用<sup>[4]</sup>, 纠正DNA合成和复制所产生的错误, 为MMR能诱导DNA受到严重损伤细胞的程序性凋亡。DNA错配修复基因缺陷可致细胞突变频率增加而形成突变子表型(mutato phenotype), 这些突变子表型的存在使得基因突变的事件不断放大、积累, 导致肿瘤发生。hMSH2和hMLH1是最先发现的2个错配修复基因, 与肿瘤关系密切<sup>[5]</sup>。hMSH2蛋白与hMSH6、hMSH3蛋白分别形成异二聚体hMutS- $\alpha$ 和hMutS- $\beta$ , 可识别错配位点, 并与错配位点结合形成复合物。hPMS2蛋白的氨基末端片段具有与DNA结合的活性, 和hMLH1蛋白形成hMutL- $\alpha$ 二聚体, 与结合到DNA链上的hMutS形成一种暂时性的复合物, 从而启动错配修复<sup>[6]</sup>。

胃癌发生是一个多病因、多阶段的连续过程。从慢性胃炎经萎缩性胃炎、肠上皮化生和不典型增生, 最后发展为胃癌<sup>[7]</sup>。本研究发现, hMSH2蛋白在胃癌中的表达显著高于癌旁和胃炎黏膜( $P<0.01$ ), 癌旁组织hMSH2的表达较胃炎组明显增多( $P<0.01$ ), 在浅表性胃炎及部分萎缩性胃炎中表达缺失, 说明癌细胞旺盛的增殖活动使hMSH2基因表达上调, 远离肿瘤组织的癌旁组hMSH2表达降低, 而hMSH2在浅表性胃炎组中有失表达的现象(失表达率100%), 在萎缩性胃炎中有部分失表达(失表达率40%)。hMSH2蛋白在胃癌中高表达的原因可能是在某些因素的不断刺激下, 一些增殖活跃的细胞容易出现基因的多点突变和DNA复制错误, 使hMSH2基因表达代偿性上调, 但增多的基因产物仍不足以修复已发生损伤的基因, 使细胞恶性转化, 也不排除hMSH2基因自身可能发生突变, 编码有缺陷的产物增加, 促进肿瘤的发生。如现已发现某些抑癌基因(如p53)发生突变从而促进了肿瘤的发生。Leach *et al*<sup>[8]</sup>在对膀胱癌的研究中发现, 原发性膀胱癌患者的膀胱冲洗液中具有hMSH2的表达, 且在治疗后转为阴性, 无膀胱癌的患者则无此基因的表达。这些结果说明, hMSH2基

因的高表达间接反映了肿瘤存在的情况。但也有相反的报道: 在宫颈鳞状细胞癌、前列腺癌等肿瘤中的hMSH2基因表达减少或缺失<sup>[9-10]</sup>, 而hMSH2表达下调或缺失的肿瘤通常伴有微卫星不稳定性的发生。微卫星的不稳定性反应了错配修复系统的缺陷。

由试验结果可见, 胃癌中hMSH2基因的高表达与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度、组织学类型、分化程度、淋巴结转移及临床分期及幽门螺旋杆菌感染等均无关, 与肿瘤的恶性程度无关。本研究认为, hMSH2基因表达增高与胃癌的发生有关。

本研究中, hMLH1基因在癌组织中的表达明显少于癌旁及胃炎组织( $P<0.01$ ), 癌旁组hMLH1表达较胃炎组少, 差别没有统计学意义( $P>0.05$ ), 胃炎组中浅表性胃炎组较萎缩性胃炎组hMLH1表达稍多, 但差别没有统计学意义( $P>0.05$ ), 这与Kakar *et al*<sup>[11]</sup>在大肠癌中的发现基本相似, 说明hMLH1的高表达在一定程度上可能会抑制DNA突变或损伤所造成的细胞恶变趋势, 进而抑制恶性肿瘤的发生。Baek *et al*<sup>[12]</sup>在对胃癌的研究中发现, 在8%的MSI阳性腺瘤与88%的癌中可见hMLH1表达缺失或减少, 在子宫内膜癌亦可见hMLH1表达缺失<sup>[13]</sup>, hMLH1表达下调的原因, 可能是基因突变引起的表达缺失, 而更多的则是因为启动子区域甲基化。慢性萎缩性胃炎是胃癌发生发展中的一个过程, hMLH1表达的减少, 但与浅表性胃炎组比较差别无统计学意义, 但也从一定程度上预示胃癌发生的可能, hMLH1表达下调导致错配修复效率下调, 造成突变的累积及肿瘤的发生。Kruschewski *et al*<sup>[14]</sup>在研究直肠癌中MMR基因表达与肿瘤生物学行为关系时发现MMR基因hMLH1的表达与患者的年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、浸润深度、分化程度、临床分期和淋巴结转移均无关, 与本实验结果相符。

以上研究表明, hMLH1基因与hMSH2基因有所不同, 在某种程度上反映了hMLH1与hMSH2基因功能上的差异, hMSH2基因表达异常与胃癌相关, 该基因的高表达可能是胃癌发生的标志。hMLH1表达减少则可能预示胃癌的发生, hMLH1蛋白可能作为预警胃癌发生的组织学标志物。随着MMR基因研究的深入及分子生物学技术的发展, 人们将进一步了解hMLH1和hMSH2基因与胃癌的关系, 为胃癌的

**同行评价**  
本文研究错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及其意义, 有一定的理论意义和临床价值。

病因研究及早期诊断预后等方面提供依据。

#### 4 参考文献

- 1 Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat* 1997; 10: 89-99
- 2 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 3 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457
- 4 Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 305-311
- 5 Fishel R, Ewel A, Lee S, Lescoe MK, Griffith J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 1994; 266: 1403-1405
- 6 Gras E, Catasus L, Arguelles R, Moreno-Bueno G, Palacios J, Gamallo C, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. *Cancer* 2001; 92: 2829-2836
- 7 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- 8 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, Saboorian MH, McConnell JD, Sagalowsky AI. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* 2000; 88: 2333-2341
- 9 Chung TK, Cheung TH, Wang VW, Yu MY, Wong YF. Microsatellite instability, expression of hMSH2 and hMLH1 and HPV infection in cervical cancer and their clinico-pathological association. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52: 98-103
- 10 Yeh CC, Lee C, Dahiya R. DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 409-413
- 11 Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, Goldberg RM, Lindor NM. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 2003; 97: 1421-1427
- 12 Baek MJ, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK, Kim H. Expression of hMLH1 is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer* 2001; 85: 1147-1152
- 13 Peiró G, Diebold J, Mayr D, Baretton GB, Kimmig R, Schmidt M, Löhns U. Prognostic relevance of hMLH1, hMSH2, and BAX protein expression in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14: 777-783
- 14 Kruschewski M, Noske A, Haier J, Runkel N, Anagnostopoulos Y, Buhr HJ. Is reduced expression of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 in patients with sporadic colorectal cancer related to their prognosis? *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 71-77

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,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 2009-11-28)

## 新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态

王军, 张伟, 李艳红, 郭永, 朱少君, 巩丽, 姚丽, 张丽

王军, 张伟, 朱少君, 巩丽, 姚丽, 张丽, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038  
李艳红, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科 陕西省西安市 710038  
郭永, 潍坊市妇幼保健院 山东省潍坊市 261000  
国家自然科学基金资助项目, No. 30672013, No. 30800417  
国家973计划分课题资助项目, No. 2009CB521704  
作者贡献分布: 本课题由张伟、李艳红及郭永设计; 标本采集由张伟、李艳红、郭永、王军、朱少君及张丽完成; 研究过程由王军与朱少君操作完成; 研究所用试剂由姚丽提供; 数据分析由巩丽完成; 本论文写作由王军与张伟完成。  
通讯作者: 张伟, 主任医师, 教授, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科。  
w\_zhang66@yahoo.com  
电话: 029-84777467 传真: 029-83552079  
收稿日期: 2009-10-08 修回日期: 2009-11-09  
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

### HBV infection status in newborns that are only positive for truncated HBV RNA

Jun Wang, Wei Zhang, Yan-Hong Li, Yong-Guo, Shao-Jun Zhu, Li Gong, Li Yao, Li Zhang

Jun Wang, Wei Zhang, Shao-Jun Zhu, Li Gong, Li Yao, Li Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Yan-Hong Li, Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Yong-Guo, Weifang Women and Infants Nursing Center of Shandong, Weifang 261000, Shandong Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672013; and the Branch of National Program on Key Basic Research Project (973 Program), No. 2009CB521704

Correspondence to: Professor Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, 1 Xinsi Road, Baqiao District, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. w\_zhang66@yahoo.com  
Received: 2009-10-08 Revised: 2009-11-09  
Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the status of hepatitis B virus (HBV) infection in newborns that are only positive for truncated HBV RNA (trRNA) and analyze factors that influence HBV infection status.

**METHODS:** A total of 85 hepatitis B surface anti-

gen (HbsAg)-positive pregnant women and their newborns were followed up. Blood samples were taken from pregnant women before hepatitis B immune globulin (HBIG) therapy and before the delivery, and from newborns within 24 hours and at 1, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months after delivery, to detect trRNA, full-length HBV RNA (fRNA), HbsAg, HbsAb, HbeAg, HbeAb and HbcAb, and quantify HBV DNA. The incidence rates of active HBV infection were compared between newborns that were positive and negative for trRNA. The detection rates of trRNA and fRNA between mothers that underwent HBIG therapy and not, were positive and negative for HbeAg, and had different HBV-DNA levels, and between their newborns were also compared.

**RESULTS:** Neither active HBV infection nor fRNA were detected in all newborns. No statistical difference was noted in the detection rate of trRNA between mothers and newborns that underwent HBIG therapy and not. Although no significant differences were noted in the detection rates of trRNA between mothers that were positive and negative for HbeAg and between their newborns, a significant difference was found in the detection rate of fRNA between mothers that were positive and negative for HbeAg ( $\chi^2 = 8.119$ ,  $P = 0.004$ ). No significant differences were noted in the detection rate of trRNA between mothers that had different HBV DNA levels and between their newborns. However, the difference in the detection rate of fRNA was significant between mothers that had different HBV-DNA levels ( $\chi^2 = 21.948$ ,  $P = 0.000$ ).

**CONCLUSION:** During the entire follow-up period, HBV infection is stable in newborns that are only positive trRNA. The detection rate of trRNA is not influenced by HBeAg, HBV DNA level, and HBIG therapy in mothers.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Mother-to-child transmission; trRNA; fRNA; Immune therapy

Wang J, Zhang W, Li YH, Guo Y, Zhu SJ, Gong L, Yao L, Zhang L. HBV infection status in newborns that are only positive for truncated HBV RNA. *Shijie Huaren Xiaohua*

**背景资料**  
乙型肝炎病毒 (HBV) 感染在我国依然是全国性的公共健康问题, 人群中慢性HBV携带率近10%, 而母婴传播是形成慢性HBV感染的重要原因。现采用的综合免疫治疗预防措施在阻断HBV母婴传播方面起到了显著成效, 联合应用乙型肝炎疫苗和HBIG阻断HBV母婴传播成功率可达90%以上。但即使经过免疫治疗和接种, 新生儿HBsAb(+), 大部分HBsAg(+)孕妇所生的新生儿血清中仍可检测到顿挫型转录体(trRNA), 且是唯一可检测到的HBV感染血清学指标。

**同行评议者**  
石统东, 副教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科



### 相关报道

王建设 *et al*认为出生时HBsAg阴性而在1 mo到6 mo出现阳性者多属产时感染,而出生时即HBsAg阳性并持续到1 mo以上则为宫内感染,慢性HBV感染主要为宫内感染所致。

Zazhi 2009; 17(33): 3451-3455

### 摘要

**目的:** 探讨新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态的稳定性及影响因素。

**方法:** 跟踪随访85例HBsAg阳性孕妇及所生新生儿, 孕妇在接受HBIG治疗前和分娩前各采血1次, 新生儿在出生后24 h内、1、3、6、9、12、18、24 mo各采血1次, 检测trRNA、fRNA、乙型肝炎五项和HBV DNA定量, 按新生儿trRNA分组比较新生儿HBV活动性感染的发生率, 按母亲HBIG治疗、HBeAg、HBV-DNA定量分别分组比较母婴trRNA、fRNA的检出率。

**结果:** 随访的新生儿无HBV活动性感染发生, 新生儿fRNA均阴性。分别以母婴是否行HBIG治疗分组, 比较新生儿trRNA检出率, 差别均无统计学意义; 以母亲HBeAg分组, 分别比较母婴trRNA检出率, 差别无统计学意义, 而母亲fRNA检出率差别有统计学意义( $\chi^2 = 8.119$ ,  $P = 0.004$ ); 以孕妇产前HBV DNA定量分组, 同样分别比较母婴trRNA检出率, 差别无统计学意义, 而母亲fRNA的检出率差别有统计学意义( $\chi^2 = 21.948$ ,  $P = 0.000$ )。

**结论:** 在随访的近2年时间内, 新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态是稳定的, trRNA的检出率不受母婴是否行HBIG治疗、HBeAg及HBV-DNA定量的影响。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 母婴传播; trRNA; fRNA; 免疫治疗

王军, 张伟, 李艳红, 郭永, 朱少君, 巩丽, 姚丽, 张丽. 新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3451-3455  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3451.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在我国依然是全国性的公共健康问题, 人群中慢性HBV携带率近10%, 而母婴传播是形成慢性HBV感染的重要原因, 据估计我国的慢性HBV感染约有30%-50%是通过母婴传播发生的<sup>[1]</sup>。虽然新生儿免疫接种已经取得了巨大的成就, 但仍有部分免疫失败。有些婴儿虽已产生抗体, 但并不完全处于安全状态。前期基于血清HBV转录体检测的研究表明, 即使经过免疫治疗和接

种, 新生儿HBsAb(+), 大部分HBsAg(+)孕妇所生的新生儿血清中仍可检测到顿挫型转录体(truncated RNA, trRNA), 且是唯一可检测到的HBV感染血清学指标<sup>[2]</sup>。trRNA是一个新的潜在的诊断低复制或无复制“特殊”HBV感染状态的标志物。但这种特殊感染状态的稳定性及其临床意义尚待进一步明确。本研究拟在前期研究的基础上, 对HBsAg(+)孕妇及其所生新生儿进行动态观察, 探讨trRNA确定的早期特殊感染状态是否稳定, 是否会引起HBV感染活动性改变。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科和山东潍坊市妇幼保健院妇产科, 经患者知情同意, 选择连续性病例, HBsAg阳性孕妇共85例, 其中64例接受了乙型肝炎免疫球蛋白(hepatitis B immunoglobulin, HBIG)治疗, 孕26 wk时肌注200 IU/4 wk, 共3次, 21例未经任何治疗。85例孕妇分娩新生儿85例, 均常规行乙型肝炎疫苗接种, 其中有73例出生24 h内肌注了HBIG。高纯度核酸提取试剂盒、核糖体RNA(rRNA)、单管RT/PCR试剂盒、地高辛标记探针盒均购自Roche公司(德国), DNase和RNase灭活的吸头购自Biolabs, Hybond-N+尼龙膜购自Amersham, Taq DNA聚合酶、100 bp DNA Marker及DNase I均为Gibco产品, DNase和RNase灭活的试管和离心管购自Eppendorf公司。其他常用试剂和药品均为分析纯或电泳级。PCR引物由上海生工合成。用于阳性对照的质粒为pMT9T40A和pMT9T41A<sup>[3]</sup>, 均由德国癌症研究中心病毒与宿主相互关系分部制备。

### 1.2 方法

**1.2.1 动态观察:** 64例孕妇在第1次注射HBIG前采静脉血1次, 在分娩前采血1次, 21例未注射HBIG的孕妇只在分娩前采血1次。所有新生儿计划在分娩后24 h内、1、3、6、9、12、18、24 mo各采股静脉血2 mL。所有标本均检测trRNA、fRNA、及HBV抗原抗体系列标志物和HBV DNA定量。

**1.2.2 血清分离和核酸提取:** 按照前期建立的方法<sup>[4-5]</sup>, 血清采集后, 30 min内于4℃低温离心(1400 r/min, 10 min)分离血清, 储于-70℃冰箱。核酸的提取采用高纯度病毒核酸提取试剂盒(Roche, cat No. 13460600), 严格按照试剂盒说明书操作, 200  $\mu$ L血清可得到50  $\mu$ L混合的核酸提

表 1 新生儿随访倒数和trRNA检测结果 (n)

| 分组       | 新生儿采血时间(出生后) |      |      |      |      |
|----------|--------------|------|------|------|------|
|          | 24 h         | 1 mo | 3 mo | 6 mo | 9 mo |
| trRNA(+) | 40           | 23   | 13   | 8    | 4    |
| trRNA(-) | 45           | 20   | 7    | 5    | 3    |
| 合计       | 85           | 43   | 20   | 13   | 7    |

表 2 按母婴是否接受HBIG治疗分组统计转录体检测结果 (n)

| HBIG(母/婴) | 总对数 | trRNA+(母/婴) | fRNA+(母/婴) |
|-----------|-----|-------------|------------|
| +/+       | 64  | 35/28       | 14/0       |
| -/-       | 12  | 10/8        | 4/0        |
| -/+       | 9   | 4/4         | 2/0        |
| 合计        | 85  | 49/40       | 20/0       |

取洗脱液。

1.2.3 fRNA和trRNA的扩增: 应用50  $\mu$ L单管RT-PCR系统进行逆转录和扩增, 逆转录后通过半巢式PCR检测HBV RNA 3'端结构。第一轮反应上游引物为txs(1445): 5'-GGA CCG TGT GCA CTT CGC TT-3', 第二轮反应上游引物为txs2(1464): 5'-TCA CCT CTG CAC GTC GCA TG -3', 共用锚定引物为txas5(1683): 5'-(T)15GCT GG -3'。由于锚定Oligo d(T)引物能够特异的扩增poly(A)RNA, 检测病毒RNA的3'端结构的反应不需要DNase I预处理标本, 这一扩增也能同时显示trRNA和fRNA两种转录体分子, 其产物大小分别为235 bp和360 bp<sup>[4-5]</sup>。为了进一步显示反应的扩增效率及特异性, 始终应用质粒DNA pMT9T40A和pMT9T41A进行平行扩增, 前者为fRNA RT-PCR阳性而trRNA反应阴性, 后者为fRNA反应阴性而trRNA反应阳性。

1.2.4 电泳检测及Southern杂交验证: PCR产物10  $\mu$ L, 溴酚兰上样液2  $\mu$ L, 0.02 mg/ $\mu$ L琼脂糖凝胶电泳, 用UVP系统显示并采集图像后, 转印至尼龙膜上, 用自备的地高辛标记的针对trRNA和fRNA的探针进行Southern杂交, 验证PCR产物的特异性。

统计学处理 率的比较采用 $\chi^2$ 检验及Fisher确切法进行分析, 取 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 随访结果 64例接受HBIG治疗的孕妇采血2次, 21例未治疗的在分娩前采血1次, 新生儿采血情况见表1, 部分失访。在随访中, 孕妇所有

表 3 按孕妇HBeAg分组统计转录体检测结果 (n)

| HBeAg | 总对数 | trRNA+(母/婴) | fRNA+(母/婴) |
|-------|-----|-------------|------------|
| +     | 22  | 13/9        | 10/0       |
| -     | 54  | 32/27       | 8/0        |
| 合计    | 76  | 45/36       | 18/0       |

观察指标2次检测结果一样, 所有新生儿均HBsAg、HBeAg、HBV DNA定量、fRNA阴性, 满6 mo的随访者均HBsAb(+), 即新生儿均免疫成功, 没有HBV感染者。第1次检测trRNA(+)的新生儿, 在后续的检测均trRNA(+), 第1次检测trRNA(-)阴性者, 后续检测均阴性, 表明trRNA独立阳性的状态是稳定的。

2.2 HBIG治疗对新生儿转录体检测的影响 新生儿trRNA阳性率47.06%(40/85), 按新生儿是否行HBIG治疗分成2组, 治疗组43.84%(32/73), 非治疗组66.67%(8/12), 差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.156$ ,  $P = 0.142$ )。按母亲是否行HBIG治疗分成2组, 治疗组43.75%(28/64), 非治疗组57.14%(12/21), 差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.138$ ,  $P = 0.286$ , 表2)。表明新生儿trRNA的检出不受母婴HBIG治疗的影响。

2.3 孕妇HBeAg对母婴转录体检测的影响 母亲trRNA阳性率59.21%(45/76), 考虑到HBIG治疗的病例在HBeAg阳性组和阴性组分布均衡, 9例母亲未行HBIG治疗而新生儿接受治疗的病例未统计在内。76例新生儿trRNA阳性率47.37%(36/76), HBeAg阳性组40.91%(9/22), 阴性组50.00%(27/54), 差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.518$ ,  $P = 0.472$ )。76例母亲trRNA阳性率59.21%(45/76), HBeAg阳性组59.09%(13/22), 阴性组59.26%(32/54), 差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.000$ ,  $P = 0.989$ )。76例母亲fRNA阳性率23.68%(18/76), 阳性组45.45%(10/22), 阴性组14.81%(8/54), 差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.119$ ,  $P = 0.004$ , 表3)。表明母婴trRNA的检出不受孕妇HBeAg的影响, 而fRNA的检出与HBeAg有关。

2.4 HBV DNA定量对母亲转录体检测的影响 以HBV DNA定量分组统计结果如表4。<10<sup>3</sup>组55例, 母婴trRNA阳性率分别为54.55%(30/55), 41.82%(23/55), 母亲fRNA阳性率16.4%(9/55)。10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>组11例, 母婴trRNA阳性率均为63.64%(7/11), 母亲fRNA阳性率9.09.4%(1/11)。10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>组6例, 母婴trRNA阳性率分别为66.67%(4/6), 50.00%(3/6), 母亲fRNA阳性率

### 应用要点

本研究通过短期的观察, 证实新生儿trRNA单独阳性的状态是稳定的, 而远期的转归还需长期的随访, 以确定其转变为活动性HBV感染的可能以及与肝癌、肝硬化发展的关系。

## 同行评价

本文对新生儿trRNA独立阳性的HBV感染状态的稳定性进行了研究,对指导临床检测和阻断母婴传播的实践很有意义。

表 4 按孕妇HBV DNA定量分组统计转录体检测结果 (n)

| HBV DNA定量<br>(copy/mL)            | 总对数 | trRNA+(母/婴) | fRNA+(母/婴) |
|-----------------------------------|-----|-------------|------------|
| <10 <sup>3</sup>                  | 55  | 30/23       | 9/0        |
| 10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup> | 11  | 7/7         | 1/0        |
| 10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup> | 6   | 4/3         | 4/0        |
| 10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup> | 4   | 4/3         | 4/0        |
| 合计                                | 76  | 45/36       | 18         |

66.67%(4/6)。10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup>组4例,母婴trRNA阳性率分别为100.00%(4/4), 75.00%(3/4), 母亲fRNA阳性率100.00%(4/4)。各组间母亲、新生儿trRNA检出率差异无统计学意义( $\chi^2 = 3.478, P = 0.324$ ;  $\chi^2 = 3.089, P = 0.378$ )。组间母亲fRNA检出率差异有统计学意义( $\chi^2 = 21.948, P = 0.000$ )。表明HBV DNA定量与fRNA的检出呈正相关,而不影响trRNA的检出。

## 3 讨论

本研究表明,新生儿trRNA独立阳性的特殊HBV感染状态是稳定的,至少在短期内不会转变为活动性HBV感染。trRNA的检出不受母婴是否接受HBIG治疗、HBeAg及HBV DNA定量的影响,是代表HBV感染的稳定标志物。而fRNA的检出明显与HBeAg、HBV DNA定量呈正相关,是HBV复制活跃的标志物,与既往研究结论一致<sup>[2,6]</sup>。

一般认为出生时HBsAg阴性而在1-6 mo出现阳性者多属产时感染,而出生时即HBsAg阳性并持续到1 mo以上则为宫内感染,慢性HBV感染主要为宫内感染所致<sup>[7]</sup>。宫内感染的确切机制尚未完全阐明,目前学术界普遍认为宫内感染是通过胎盘感染的,其作用机制可分为血源性和细胞源性<sup>[8-9]</sup>,也有人提出经外周血单个核细胞感染学说<sup>[10-11]</sup>,阴道上行感染<sup>[12]</sup>和经受精卵传染<sup>[13-14]</sup>的可能。若不采取任何免疫措施,HBsAg和HBeAg双阳性的孕妇所产新生儿有将近90%会感染HBV,且其中90%会发展为慢性,而在HBeAg阴性的孕妇,只有低于5%的感染新生儿发展为慢性感染,可能原因是新生儿免疫系统未发育成熟,对经胎盘来自母亲的HBsAg不应答,产生了免疫耐受<sup>[15-16]</sup>。

现采用的综合免疫治疗预防措施在阻断HBV母婴传播方面起到了显著成效,联合应用乙型肝炎疫苗和HBIG阻断HBV母婴传播成功率可达90%以上<sup>[8,17]</sup>。在孕晚期使用HBIG主要考虑此时胎儿已发育成形,乙型肝炎免疫球蛋白

可通过胎盘转运给胎儿,一方面可中和孕妇体内乙型肝炎表面抗原、病毒颗粒,减少传染,更主要的是使胎儿在宫内即获得了被动免疫,可有效保护胎儿。

本研究也证实联合应用乙型肝炎疫苗和HBIG能有效阻断HBV母婴传播,但这是以传统的诊断标志物为标准,若以trRNA为评价指标,效果并不乐观,有将近一半的新生儿trRNA阳性。最早trRNA是在HBsAg阳性的肝癌患者肝组织中检测出的,其转录模板位于HBx基因区,以一隐匿的pIoy(A)终止信号成熟,称为trRNA,而其他转录体均用位于其下游的公认pIoy(A)信号成熟,称为全长型转录体(fRNA)<sup>[3]</sup>。由于新鲜肝组织来源有限,后来成功建立了从血清中检测HBV转录体的方法,研究表明fRNA是病毒复制活跃的标志,与HBV DNA定量、HBeAg、和血ALT水平呈正相关,而trRNA是一较稳定的指示,在部分HBV常规血清标志物均阴性的个体中仍可检测出,如隐匿性肝硬化和HCV携带者,此时推测trRNA转录的模板来源于与染色体整合的HBV DNA<sup>[5,18]</sup>。本研究中HBIG的应用不影响trRNA的检出率,也能同时说明血清中trRNA能独立于HBV病毒颗粒存在,来源于与染色体整合的HBV DNA,但其细胞来源和在血清中稳定存在的机制尚不清楚。HBV宫内感染机制中的外周血单个核细胞感染学说和经受精卵遗传传染学说,可以在一定程度上解释trRNA的母婴传播方式,即可以通过整合了HBV DNA宿主细胞传递。

总之,现通过短期的观察,证实新生儿trRNA单独阳性的状态是稳定的,而远期的转归还需长期的随访,以确定其转变为活动性HBV感染的可能以及与肝癌、肝硬化发展的关系。在后续的随访中,若出现活动性HBV感染病例,还需注意排除接触外来传染源的引起的感染,而不是自身状态的自然转归。另外, trRNA是否具有蛋白质表达功能,对应的蛋白质是否与HBV活动性感染和肝癌、肝硬化的发展有关,这也是在长期的随访时有待进一步研究的方向。

## 4 参考文献

- 1 谢新宝, 朱启熔. 乙型肝炎病毒母婴传播和阻断的研究进展. 传染病信息 2006; 19: 101-102
- 2 郭永, 马振芝, 修霞, 牟莹莹, 臧玉芹. 探讨乙肝病毒转录体在母婴传播中的意义. 中国优生与遗传杂志 2006; 14: 78-80
- 3 Hilger C, Velhagen I, Zentgraf H, Schröder CH. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel



- polyadenylation site on viral DNA. *J Virol* 1991; 65: 4284-4291
- 4 Zhang W, Hacker HJ, Mildenerberger M, Su Q, Schröder CH. Detection of HBV RNA in serum of patients. *Methods Mol Med* 2004; 95: 29-40
- 5 苏勤, 张伟, 刘节, 王淑芳, Takegoshi K, Schröder CH. 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 134-143
- 6 李艳红, 张伟, 朱少君, 崔云, 郭永, 王清图, 苏勤, 冯英明. 妊娠晚期抗病毒免疫阻断治疗对新生儿血清HBV转录体的影响. *第四军医大学学报* 2006; 27: 792-795
- 7 王建设, 朱启镭. HBsAg阳性母亲的婴儿接种乙肝疫苗后慢性HBV感染相关因素探讨. *临床儿科杂志* 2001; 19: 134-136
- 8 温慧. 乙肝免疫球蛋白阻断乙肝病毒宫内传播疗效探讨. *中国医疗前沿* 2009; 4: 19, 43
- 9 Bhat P, Anderson DA. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier. *J Virol* 2007; 81: 7200-7207
- 10 袁荣, 王晨虹, 刘晓梅, 王小青. HBV母婴传播致新生儿免疫失败的原因和机制. *第四军医大学学报* 2005; 26: 647-649
- 11 李淑红, 岳亚飞, 归巧娣, 石紫云, 杨秀莲, 白润芳, 葛文. HBV感染的外周血单个核细胞在母婴传播中的载体作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2229-2231
- 12 Yue YF, Jiang H, Shi L, Li LF, Xi BS, Yu YL, Chen GF. [Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2004; 39: 224-226
- 13 Ye F, Yue Y, Li S, Chen T, Bai G, Liu M, Zhang S. Presence of HBsAg, HBcAg, and HBVDNA in ovary and ovum of the patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 387-392
- 14 陈怀宇, 申东翔, 王少华, 王晓怀. 乙型肝炎病毒垂直传播在人早期胚胎感染的检测. *中国公共卫生* 2002; 18: 417-418
- 15 Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 50-57
- 16 Chang MH. Hepatitis B virus infection. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 160-167
- 17 Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2006; 332: 328-336
- 18 Su Q, Wang SF, Chang TE, Breitkreutz R, Hennig H, Takegoshi K, Edler L, Schröder CH. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2005-2015

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 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 2009-11-28)

# Fractalkine在正常人和肝纤维化与肝硬化患者肝脏组织内的表达

廖欣鑫, 廖彩仙, 黄勇平, 秦安成, 袁杰, 赖勇强, 龚祖元

**背景资料**  
自从1999年发现骨髓源性肝干细胞(BMDLSC)以来, 利用BMDLSC修复肝脏的疾病损伤就一直是国内外学者研究的热点, BMDLSC可以恢复因病变而减少的肝细胞数量, 修复因病变而破坏了肝组织结构, 但BMDLSC向肝内归巢的机制仍然不清楚, 趋化因子及其受体系统应该起着重要作用。

廖欣鑫, 廖彩仙, 黄勇平, 秦安成, 袁杰, 赖勇强, 龚祖元, 南方医科大学南方医院肝胆外科 广东省广州市 510515  
广州市科技攻关计划基金资助项目, No. 2007Z3-E0371  
作者贡献分布: 此课题由廖彩仙、廖欣鑫、黄勇平及赖勇强设计; 研究过程由廖欣鑫、黄勇平、秦安成、袁杰及龚祖元完成; 数据分析由廖欣鑫与黄勇平完成; 本论文写作由廖欣鑫与廖彩仙完成。

通讯作者: 廖彩仙, 教授, 主任医师, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学南方医院肝胆外科。

liaocx@fimmu.com

电话: 020-61641705

收稿日期: 2009-08-21 修回日期: 2009-10-23

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-28

## Intrahepatic levels of Fractalkine in healthy individuals and patients with hepatic fibrosis and cirrhosis

Xin-Xin Liao, Cai-Xian Liao, Yong-Ping Huang, An-Cheng Qin, Jie Yuan, Yong-Qiang Lai, Zu-Yuan Gong

Xin-Xin Liao, Cai-Xian Liao, Yong-Ping Huang, An-Cheng Qin, Jie Yuan, Yong-Qiang Lai, Zu-Yuan Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Guangzhou Municipality, No. 2007Z3-E0371

Correspondence to: Professor Cai-Xian Liao, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, 1838 Guangzhou Avenue North, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. liaocx@fimmu.com

Received: 2009-08-21 Revised: 2009-10-23

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the intrahepatic levels of chemokine Fractalkine in healthy individuals and patients with hepatic fibrosis and cirrhosis.

**METHODS:** Hepatic tissues were obtained in surgery from 9 normal persons, 10 patients with fibrotic liver, 11 patients with cirrhosis. The content of Fractalkine in hepatic tissue was assayed by ELISA.

**RESULTS:** The intrahepatic levels of Fractalkine

in patients with hepatic fibrosis and cirrhosis were remarkably higher than that in healthy individuals ( $13.72 \pm 5.59$  ng/g and  $14.70 \pm 3.52$  ng/g vs  $4.84 \pm 3.72$  ng/g, respectively; both  $P < 0.05$ ). No significant difference was noted in intrahepatic level of Fractalkine between patients with hepatic fibrosis and cirrhosis.

**CONCLUSION:** Intrahepatic level of Fractalkine increases with the aggravation of hepatic fibrosis and remains high in liver cirrhosis.

**Key Words:** Hepatic fibrosis; Liver cirrhosis; Fractalkine/CX3CL1; Chemokine

Liao XX, Liao CX, Huang YP, Qin AC, Yuan J, Lai YQ, Gong ZY. Intrahepatic levels of Fractalkine in healthy individuals and patients with hepatic fibrosis and cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3456-3459

## 摘要

**目的:** 观察正常人和肝纤维化与肝硬化患者肝组织中趋化因子Fractalkine的表达。

**方法:** 采用ELISA法分别检测9例正常人、10例肝纤维化及11例肝硬化患者肝组织中的Fractalkine含量。

**结果:** 肝纤维化组和肝硬化组Fractalkine浓度均显著高于正常对照组 ( $13.72 \pm 5.59$  ng/g,  $14.70 \pm 3.52$  ng/g vs  $4.84 \pm 3.72$  ng/g, 均  $P < 0.05$ ), 肝纤维化组和肝硬化组的Fractalkine浓度差异无统计学意义。

**结论:** 肝脏发生纤维化损伤时Fractalkine表达增强, 至肝硬化阶段仍维持较高水平。

**关键词:** 肝纤维化; 肝硬化; Fractalkine/CX3CL1; 趋化因子

廖欣鑫, 廖彩仙, 黄勇平, 秦安成, 袁杰, 赖勇强, 龚祖元. Fractalkine在正常人和肝纤维化与肝硬化患者肝脏组织内的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17(33): 3456-3459  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3456.asp>

**同行评议者**  
李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

## 0 引言

Fractalkine是1997年才发现的CX3C亚家族趋化因子唯一的成员<sup>[1]</sup>, 系统命名为CX3CL1, 其受体是CX3CR1. Fractalkine与白细胞的趋化和黏附功能密切相关<sup>[2]</sup>. 近年发现他对包括骨髓源性肝干细胞(bone marrow derived liver stem cells, BMDLSC)在内的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMMSC)也有趋化作用. 实验研究已证实, 肝病损伤可以引发BMDLSC向肝脏迁移并参与对损伤的修复<sup>[3-4]</sup>, 但驱使BMDLSC向肝脏迁移的物质基础不明, 肝病患者肝脏组织内Fractalkine水平有何变化也不清楚. 为此, 我们对正常人和肝纤维化与肝硬化患者肝内Fractalkine的含量变化进行了观察. 结果发现, 肝脏发生纤维化损害时, 肝组织表达Fractalkine的数量增多. 肝内Fractalkine在肝纤维化阶段就已经升高到显著水平, 至肝硬化阶段仍然维持在高水平状态. 提示在肝脏发生疾病损伤时, 肝脏产生的Fractalkine有可能是驱使BMDLSC向肝脏迁移的一个因素.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝脏组织, 样本量为30例, 男18例, 女12例. 年龄19-77(平均50)岁. 标本均来自2008-05/2009-05在南方医科大学南方医院肝胆外科接受手术(包括肝移植)的患者. 手术当天的术前采血查肝功能. 肝组织标本在手术中获取. 肝组织切取后立即分为2份, 一份甲醛固定后行组织病理学检查, 另一部分放入1.5 mL EP管内置于-80℃低温冰箱保存待测. 微量手动玻璃匀浆器、精密电子天平(北京赛多利斯仪器公司)、台式高速低温离心机、37℃孵箱、酶标仪(SpectraMax Plus384, 美国MD公司)及SoftMax Pro微孔板读数软件, 人Fractalkine试剂盒48T(美国ADL公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 肝组织病理学检查:** 常规石蜡包埋与切片, HE染色, 光镜观察.

**1.2.2 标本分组:** (1)正常对照组( $n = 9$ ): 无乙型肝炎病史, 乙型肝炎两对半显示乙型肝炎表面抗原阴性, 肝组织病理学检查显示肝组织结构正常. (2)肝纤维化组( $n = 10$ ): 有乙型肝炎病史或乙型肝炎病毒感染史, 乙型肝炎两对半显示乙型肝炎表面抗原阳性, 组织病理学检查显示肝内纤维组织广泛增生, 但未见假小叶形成. (3)肝硬化组( $n = 11$ ): 有乙型肝炎病史或乙型肝炎病毒

感染史, 乙型肝炎两对半显示乙型肝炎表面抗原阳性, 肝组织病理学检查提示肝内纤维组织广泛增生, 并有假小叶形成.

**1.2.3 Fractalkine的测定:** 肝组织经电子天平称质量后移入微量手动玻璃匀浆器中于冰水中匀浆5 min, 然后按1/8质量体积比加入1×PBS缓冲液将匀浆组织洗下并转移至1.5 mL EP管中, 再稀释1倍后, 低温高速离心机4℃下1000  $g$ 离心10 min, 提取上清液移至另一1.5 mL EP管中, 低温高速离心机4℃下25000 r/min离心20 min, 取上清液测定Fractalkine浓度, 操作程序按照人ELISA试剂盒的操作说明进行.

**统计学处理** 数据均以mean±SD表示, 应用SPSS13.0统计软件分析, 均数比较采用One-way ANOVA, 两两比较采用LSD检验. 相关分析数据符合双变量正态分布采用Pearson相关系数表示, 不符合双变量正态分布的采用Spearman相关系数表示.

## 2 结果

**2.1 肝脏组织内Fractalkine的浓度和肝功能各项指标** 正常对照组、肝纤维化组和肝硬化组组间Fractalkine浓度两两比较: 肝纤维化组的浓度显著高于正常对照组浓度( $P < 0.05$ ); 肝硬化组的浓度显著高于正常对照组浓度( $P < 0.05$ ); 肝纤维化组与肝硬化组比较, 2组的浓度差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1).

**2.2 肝脏组织内Fractalkine水平与患者肝功能指标的相关分析** Fractalkine与ALB、ALT、AST、TBIL具有相关性, 但相关系数都在0.7以下(表2).

## 3 讨论

BMDLSC是近年才发现的一群细胞, 它具有肝干细胞的特性与潜能, 在生理状态下定居在骨髓, 在肝脏发生疾病损伤时又可以向肝脏迁移并参与修复损伤<sup>[5-6]</sup>. 为什么肝脏损伤会导致BMDLSC向肝脏迁移? 驱使BMDLSC向肝脏迁移的物质基础又是什么? 这些都不清楚. 鉴于肝脏本身不是BMDLSC的生理性归巢场所, 正常情况下只有极小部分BMDLSC向肝内归巢. 因此, 对于肝脏受到损伤时出现BMDLSC向肝内归巢增多这个现象, 我们完全有理由推测并相信, 在肝脏受到损伤时产生了可以促使BMDLSC向肝内归巢的因子, 只是具体是什么因子还不清楚. 从现有资料来看, 趋化因子及其受体系统很可能在其中起重要作用, 因为实验

**研发前沿**  
驱使BMDLSC向肝脏迁移的物质基础不明, 趋化因子及其受体系统受到广泛关注. 国内外众多学者通过体外试验、动物模型实验等证明, 部分趋化因子及其受体系统在骨髓间充质干细胞(BMMSC)的迁移过程中起作用. 但在人体内, 这些趋化因子究竟起何作用、如何起作用都不清楚.



## 应用要点

本研究提示, 肝脏发生纤维化损伤时Fractalkine表达增强, 至肝硬化阶段仍维持较高水平. 从一个新的角度为Fractalkine促进干细胞的肝损伤修复作用提供理论依据.

表 1 Fractalkine浓度和肝功能各项指标检测结果 (mean  $\pm$  SD)

| 分组    | Fractalkine(ng/g) | ALB(g/L)         | ALT(U/L)            | AST(U/L)            | TBIL( $\mu$ mol/L) | PT(s)            |
|-------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| 正常对照组 | 4.84 $\pm$ 3.72   | 38.56 $\pm$ 2.96 | 24.00 $\pm$ 11.50   | 24.44 $\pm$ 10.10   | 9.77 $\pm$ 3.49    | 11.58 $\pm$ 0.70 |
| 肝纤维化组 | 13.72 $\pm$ 5.59  | 35.27 $\pm$ 7.46 | 60.60 $\pm$ 18.17   | 50.30 $\pm$ 19.95   | 14.36 $\pm$ 7.05   | 11.17 $\pm$ 0.77 |
| 肝硬化组  | 14.70 $\pm$ 3.52  | 32.95 $\pm$ 5.91 | 146.82 $\pm$ 139.19 | 174.18 $\pm$ 190.63 | 20.80 $\pm$ 24.32  | 13.23 $\pm$ 2.00 |
| F值    | 14.708            | 2.292            | 16.860              | 9.266               | 1.290              | 6.859            |
| P值    | 0.000             | 0.120            | 0.000               | 0.002               | 0.292              | 0.004            |

表 2 Fractalkine水平与肝功能指标的相关分析

| 统计量 | ALB    | ALT   | AST   | TBIL  | PT    |
|-----|--------|-------|-------|-------|-------|
| r值  | -0.391 | 0.608 | 0.695 | 0.645 | 0.312 |
| P值  | 0.033  | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.093 |

研究已证明基质细胞衍生因子1(stromal-derived factor-1, SDF-1)对CXCR4阳性BMDLSC有趋化作用<sup>[7]</sup>. 临床研究也已观察到肝病患者的肝内SDF-1浓度显著增加<sup>[8]</sup>.

趋化因子Fractalkine是唯一的CX3C类趋化因子, 有膜结合型和分泌型2种形式. 近年来, Fractalkine对BMMSC的趋化性受到广泛关注. Ji *et al*<sup>[9]</sup>的研究认为SDF-1/CXCR4和Fractalkine/CX3CR1的相互作用可介导BMMSC的迁移. Sordi *et al*<sup>[10]</sup>的实验研究证实Fractalkine对BMMSC有趋化作用, BMMSC中也存在Fractalkine的受体CX3CR1. 国内也有研究报道, Fractalkine/CX3CR1通路参与BMMSC体外迁移<sup>[11]</sup>. 最近, Zhu *et al*<sup>[12]</sup>的研究也表明Fractalkine/CX3CR1可以促进BMMSC向缺血性脑损伤部位的定向迁移.

Fractalkine对BMMSC包括对BMDLSC有趋化作用, 这在体外实验和动物实验中已得到充分肯定, 但人体发生肝病损伤时引发的BMDLSC向肝脏迁移与肝内Fractalkine的关系还有待确定, 肝病患者的肝内Fractalkine水平有何变化也有待观察. 本研究观察到, 肝内Fractalkine在肝纤维化阶段就已经升高到显著性水平, 至肝硬化阶段仍维持在高水平状态. 表明肝脏发生纤维化损伤时, 肝组织表达Fractalkine的数量显著增加, 随着肝纤维化向肝硬化阶段发展, Fractalkine的数量维持在高水平. BMMSC是一种循环的干细胞, 骨髓以一种较低的频率向循环血液中释放较低数量的BMMSC<sup>[13-14]</sup>, 从Fractalkine对BMMSC的趋化作用角度看, Fractalkine在肝病损伤诱发的

BMDLSC向肝脏迁移方面很可能发挥作用.

Fractalkine与肝功能指标的相关性分析, 提示Fractalkine的变化与肝脏的疾病损伤有关, 但变化的程度与肝病的损害程度不全一致.

## 4 参考文献

- 1 Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-644
- 2 Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol* 2001; 22: 602-607
- 3 Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, Yoo K, Moon IH, Han HS. Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 687-695
- 4 廖彩仙, 唐浩, 周杰, 苏俊, 张守华, 张春兴. 小鼠骨髓源性肝干细胞筛选及其分化潜能的研究. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 614-616
- 5 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 6 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 7 Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 339-351
- 8 赖勇强, 廖彩仙, 廖欣鑫, 秦安成, 袁杰, 黄勇平, 王宇. 肝纤维化和肝硬化患者肝内基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ 水平的变化. *肝胆外科杂志* 2009; 17: 306-308
- 9 Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 2004; 22: 415-427
- 10 Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106: 419-427
- 11 丁鹏, 冯忠堂, 余化霖, 王嘉沪, 李玉保, 严琪, 薛黎

- 萍, 林荣安. 趋化因子Fractalkine体外趋化骨髓基质细胞迁移的实验研究. *中华神经医学杂志* 2006; 5: 1205-1208
- 12 Zhu J, Zhou Z, Liu Y, Zheng J. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the migration of intravenously grafted human bone marrow stromal cells toward ischemic brain lesion in rats. *Brain Res* 2009; 1287: 173-183
- 13 Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-2625
- 14 Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 435-441

同行评价  
本研究有一定的  
创新性, 方法简单  
可行, 结论有一定的  
参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》计量单位标准

**本刊讯** 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa( $M$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ ( $A$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 $u$ (小写正体). 计量单位在+、-、 $\pm$ 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 $\text{CO}_2$ 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5%  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

# 血清VEGF及CRP表达对肝细胞癌术后早期复发的预测

马立辉, 周 健, 王助新, 胡大为, 史丽民, 敖亚洲, 张海峰

**背景资料**  
肝细胞癌在我国甚为常见, 术后5年内极易复发, 严重影响了肝细胞癌的预后, 采用什么方法能够早期预测肝细胞癌的复发是临床关注的重要课题。

马立辉, 王助新, 胡大为, 史丽民, 敖亚洲, 张海峰, 承德医学院附属医院肿瘤外科 河北省承德市 067000  
周健, 承德医学院附属医院老年病科 河北省承德市 067000  
作者贡献分布: 马立辉与周健对此文贡献均等; 此课题由马立辉和周健设计; 研究过程由马立辉、周健、王助新、胡大为、史丽民、敖亚洲及张海峰共同完成; 研究用试剂及分析工具由胡大为提供; 数据分析由马立辉与周健完成; 本论文写作由马立辉、周健及王助新共同完成。  
通讯作者: 胡大为, 主任医师, 067000, 河北省承德市南营子大街36号, 承德医学院附属医院肿瘤外科. malihui3939@sina.com  
电话: 0314-2065898  
收稿日期: 2009-10-12 修回日期: 2009-11-07  
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

## Use of preoperative serum VEGF and CRP levels for prediction of postoperative early recurrence in patients with hepatocellular carcinoma

Li-Hui Ma, Jian Zhou, Zhu-Xin Wang, Da-Wei Hu, Li-Min Shi, Ya-Zhou Ao, Hai-Feng Zhang

Li-Hui Ma, Zhu-Xin Wang, Da-Wei Hu, Li-Min Shi, Ya-Zhou Ao, Hai-Feng Zhang, Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China  
Jian Zhou, Department of Geriatrics, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Da-Wei Hu, Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China. malihui3939@sina.com  
Received: 2009-10-12 Revised: 2009-11-07  
Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the correlations between liver cancer recurrence and preoperative serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and C-reactive protein (CRP) levels in patient with hepatocellular carcinoma.

**METHODS:** The levels of serum VEGF and CRP in 32 liver cancer patients, 30 patients with benign liver diseases and 20 healthy controls were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and single immunodiffusion, respectively.

**RESULTS:** The levels of serum VEGF and CRP

in hepatocellular carcinoma patients were significantly higher than those in patients with benign liver diseases and healthy controls (VEGF:  $432.32 \pm 340.57$  ng/L vs  $158.54 \pm 120.58$  ng/L and  $124.03 \pm 51.65$  ng/L; CRP:  $9.80 \pm 0.86$  mg/L vs  $6.48 \pm 0.98$  mg/L and  $6.12 \pm 0.80$  mg/L, all  $P < 0.01$ ). The sensitivity and specificity of preoperative serum VEGF and CRP levels for prediction of postoperative early recurrence in patients with hepatocellular carcinoma were 77.27% and 59.09% as well as 30% and 60%, respectively.

**CONCLUSION:** Preoperative serum VEGF and CRP levels are potential predictors of postoperative early recurrence in hepatocellular carcinoma patients.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Vascular endothelial growth factor; C-reactive protein

Ma LH, Zhou J, Wang ZX, Hu DW, Shi LM, Ao YZ, Zhang HF. Use of preoperative serum VEGF and CRP levels for prediction of postoperative early recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3460-3464

## 摘要

**目的:** 探讨肝细胞癌(HCC)患者术前周围血清中血管内皮生长因子(VEGF)和C-反应蛋白(CRP)表达水平与肝癌术后早期复发的关系及其预测价值进行比较。

**方法:** 运用Sandwich酶联免疫吸附测定法定量检测32例HCC术前、30例肝脏良性疾病患者和20例健康人血清中VEGF的含量; 运用单向免疫扩散法检测上述病例的CRP水平。

**结果:** HCC组术前血清VEGF、CRP表达水平与肝脏良性疾病组、健康人组比较, 均有显著性差异( $432.32 \pm 340.57$  ng/L vs  $158.54 \pm 120.58$  ng/L,  $124.03 \pm 51.65$  ng/L;  $9.80 \pm 0.86$  mg/L vs  $6.48 \pm 0.98$  mg/L,  $6.12 \pm 0.80$  mg/L, 均  $P < 0.01$ )。VEGF和CRP预测肝癌复发的灵敏度和特异度分别为77.27%、30%; 59.09%、60%。

**结论:** HCC患者术前血清VEGF、CRP表达水

**同行评议者**  
钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院消化内科



平, 可能是预测HCC术后早期复发的一个较好的生物学指标。

**关键词:** 肝细胞癌; 血管内皮生长因; C-反应蛋白

马立辉, 周健, 王助新, 胡大为, 史丽民, 敖亚洲, 张海峰. 血清VEGF及CRP表达对肝细胞癌术后早期复发的预测. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3460-3464  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3460.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)临床甚为常见, 在我国其死亡率居恶性肿瘤第2位。早期肝切除术是其最主要的治疗手段, 但术后复发较高, 预后较差。如何早期预测术后复发以便及时采取相应的治疗措施是临床关注的一个课题。本文拟对HCC患者术前血清内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的表达水平与HCC术后复发转移之间的关系进行探讨, 并对预测术后早期复发的价值进行比较。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 32例HCC均为接受肝切除术的患者, 年龄32-80(平均52)岁。良性肝脏疾病30例, 包括肝脏良性肿瘤12例和18例肝硬化, 男:女为20:9, 年龄35-72(平均48)岁。健康正常人20例, 男:女为4:1, 年龄21-31(平均25)岁。患者入选标准: 能接受肝切除术的原发性肝癌患者, 无引起VEGF和CRP升高的其他疾患, 如其他肿瘤、急性炎症、类风湿及风湿活动期、组织坏死、结缔组织病等, 术前未进行全身化疗或经导管肝动脉栓塞治疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 VEGF检测:** 所有32例患者均为临床确诊的原发性肝癌患者。入院后抽取4 mL空腹外周静脉血, 室温静置1 h, 离心1000 r/min, 10 min, 吸取血清分装后于-70℃冰箱保存备用。应用Sandwich酶联免疫吸附测定法定量检测VEGF。

**1.2.2 CRP检测:** 32例原发性肝癌患者, 术前常规静脉采血, 采用单向免疫扩散法测定血清CRP水平。

**统计学处理** 运用SPSS12.0软件处理数据。计量资料以mean±SD表示, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料采用t检验。以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 VEGF及CRP在各组血清中表达水平** VEGF及CRP在各组血清中的表达水平以原发性肝癌组最高, 而在肝脏良性肿瘤、肝硬化、正常人表达较低(表1)。

**2.2 VEGF和CRP在肝脏疾病中的表达** 依据正常人血清VEGF均值( $124.03 \pm 2$  ng/L)可以计算出VEGF正常值为227.33 ng/L。以此为标准判定32例HCC血清标本中, VEGF表达阳性率为75.0%(24/32); 而在肝脏良性疾病30例中表达阳性率为23.3%(7/30); 20例正常人VEGF表达阳性率仅为5%(1/20)(表2)。CRP $\geq 8$  mg/L为阳性,  $<8$  mg/L为阴性。32例HCC患者血清表达阳性率为53.1%(17/32); 肝脏良性疾病30例中血清表达阳性率为20.0%(6/30); 20例正常人CRP表达阳性率为15.0%(3/20)(表2)。

**2.3 术前血清VEGF和CRP水平与术后2年内复发的关系** 本试验共32例HCC患者中, 术后2年内临床影像学检查及AFP检测证实为肝癌复发者为22例。32例HCC患者术前CRP阳性的患者17例, 其中2年内复发的患者13例, 灵敏度为59.09%, 特异度为60%。32例HCC患者术前VEGF阳性的患者24例, 其中2年内复发的患者17例, 灵敏度为77.27%, 特异度为30%。2项均阳性对肝癌复发诊断的灵敏度为45.45%, CRP与VEGF至少一项阳性作为判断标准, 灵敏度上升到95%, 特异度为40.9%。

## 3 讨论

肿瘤术后复发转移是恶性肿瘤的一个重要特征, 是导致患者死亡的重要原因。癌细胞的转移过程在肿瘤细胞生成的早期就已发生, 因此早期预测肿瘤术后复发以便及时采取治疗措施就显得十分重要。

HCC根治术后肝内复发转移较易出现<sup>[1]</sup>。一般认为肝癌术后5年复发率可高达45.2%-60%, 尤以术后2年内复发占大多数, 即便是小肝癌术后的复发率也比较高, 这是由于肝脏是一个体积较大的实体器官, 且具有丰富的血管网及丰富的血管窦, 为癌细胞在肝内的播散提供了有利条件<sup>[2-4]</sup>。

甲胎蛋白(alpha Fetoprotein, AFP)是较敏感、特异的肝癌诊断和随访的生物学指标, 但他并不能在治疗之前及转移灶出现之前预测肿瘤早期转移复发。而VEGF及CRP的测定可弥补这方面的不足。近年来, 肿瘤分子生物学有了飞

**研究前沿**  
肝细胞癌患者术前VEGF和CRP水平能否成为预测肝细胞癌术后早期复发的有效指标, 是当前研究的热点, 当前对其认识尚不统一, 尚应进行大量的临床试验和研究来证实。

## 应用要点

本文研究发现, 肝细胞癌患者术前 VEGF 与 CRP 水平与肝细胞癌术后早期复发有一定关系, 与肝脏良性疾病组、健康人组相比有显著性差异, 证实血清 CRP 和 VEGF 的联合检测对肝癌复发的诊断有互补作用。

表 1 VEGF及CRP在各组血清中的表达

| 分组     | n  | VEGF(ng/L)      |       |       | CRP(mg/L)   |        |       |
|--------|----|-----------------|-------|-------|-------------|--------|-------|
|        |    | mean ± SD       | F值    | P值    | mean ± SD   | F值     | P值    |
| 原发性肝癌  | 32 | 432.32 ± 340.57 |       |       | 9.80 ± 0.86 |        |       |
| 肝脏良性疾病 | 30 | 158.54 ± 120.58 | 15.74 | <0.01 | 6.48 ± 0.98 | 88.87  | <0.01 |
| 良性肿瘤   | 12 | 158.05 ± 181.34 | 8.16  | <0.01 | 6.48 ± 1.02 | 57.77  | <0.01 |
| 肝硬化    | 18 | 158.68 ± 94.11  | 11.66 | <0.01 | 6.48 ± 0.46 | 69.52  | <0.01 |
| 正常人    | 20 | 124.03 ± 51.65  | 10.39 | <0.01 | 6.12 ± 0.80 | 165.55 | <0.01 |

表 2 VEGF及CRP在肝脏患者血清中的表达

| 分组     | n  | VEGF表达 n(%) |          | $\chi^2$ 值 | P值    | CRP表达 n(%) |          | $\chi^2$ 值 | P值    |
|--------|----|-------------|----------|------------|-------|------------|----------|------------|-------|
|        |    | 阴性          | 阳性       |            |       | 阴性         | 阳性       |            |       |
| 原发性肝癌  | 32 | 8(25.0)     | 24(75.0) |            |       | 15(46.9)   | 17(53.1) |            |       |
| 肝脏良性疾病 | 30 | 23(76.7)    | 7(23.3)  | 30.24      | <0.01 | 24(80.0)   | 6(20.0)  | 11.29      | <0.01 |
| 正常人    | 20 | 19(95.0)    | 1(5.0)   | 9.21       | <0.01 | 17(85.0)   | 3(15.0)  | 5.99       | <0.01 |

速的发展, 有关肿瘤血管形成与肿瘤侵袭转移的关系已成为研究热点. VEGF是目前已知作用最强的促血管生成因子之一<sup>[5]</sup>. 很多肿瘤细胞可分泌VEGF, 其可诱导形成肿瘤血管, 并增加血管通透性, 协助肿瘤细胞进入脉管系统, 支持肿瘤侵袭转移<sup>[6-7]</sup>. 越来越多的资料显示肿瘤患者复发及预后和VEGF的高表达密切相关<sup>[8-9]</sup>. 研究显示肿瘤血管的形成是肿瘤生长、侵袭、转移过程中的重要环节, 他不仅提供了肿瘤生长所需的营养, 排除代谢产物, 而且也提供了癌细胞播散的途径. 当肿瘤生长到2-3 mm时, 需要从微血管网获得营养<sup>[10]</sup>. 文献报道, VEGF在肺腺癌、膀胱癌、纤维肉瘤、神经胶质瘤、胃癌、大肠癌、胰腺癌等各种肿瘤细胞均有表达<sup>[5]</sup>, 而且VEGF表达还是结肠癌肝转移、胃癌肝转移及其他肿瘤发生转移的预测指标<sup>[11-12]</sup>.

Jinno *et al*<sup>[7]</sup>研究发现, 血清VEGF水平在正常人组、肝炎组、肝硬化组及HCC组随着肝脏疾病的进展而逐步升高, HCC组VEGF的水平与其他组患者有显著性差异, 血浆中VEGF水平是确定肝转移的有效指标<sup>[13-14]</sup>. 本研究结果显示: 血清VEGF的水平在HCC与良性肝病、健康对照组之间有显著性差异( $P<0.01$ ).

CRP亦称丙种反应蛋白, 他是由5个完全相同的球体状单体组成, 主要在白介素-6(Interleukin-6, IL-6)介导下由肝脏产生, 少量由外周血淋巴细胞合成<sup>[15]</sup>. 与肺炎双球菌C多糖体起反应的急性时相反应蛋白, 广泛存在于血液及其他体液中<sup>[16]</sup>, 其可由致炎细胞因子进行调

节. CRP升高主要见于化脓性感染、组织坏死、恶性肿瘤、结缔组织疾病、器官移植、急性排斥、风湿活动期等<sup>[17-18]</sup>, 随着组织结构和功能的恢复, 其血清浓度也随之恢复正常, 近年CRP与肿瘤的关系逐渐引起学者的注意, 其中与大肠癌<sup>[19-21]</sup>、肾细胞癌<sup>[22]</sup>、肺癌<sup>[23]</sup>和食管癌<sup>[24-25]</sup>的关系已经有了较多的临床观察结果, 许多研究表明, 恶性肿瘤时, 血浆CRP水平明显升高, 并且与肿瘤的进展和预后有相关性, Chang对结肠癌的研究显示, CRP的水平与肿瘤的分期和复发明显相关<sup>[20]</sup>, Guilem研究了67例食管癌, 发现CRP血清浓度高者生存率要低于CRP低者<sup>[25]</sup>. Miyata对92例肾细胞癌的研究也发现, CRP虽然不是肾细胞癌的独立预测因子, 但与生存率明显相关<sup>[26]</sup>. 值得提出的是目前对CRP与肿瘤的相关性认识尚不统一, 研究结果甚至得出截然相反的结论, Lin对比研究了122例肝硬化的未治疗肝癌和76例肝硬化的血清CPR水平, 结果发现, 两者之间无显著性差异<sup>[25]</sup>, 但其在单独比较了弥漫型肝炎和肝硬化后发现, 前者的CRP水平明显高于后者, Zhan对直肠癌做了大宗病例的前瞻性研究发现CRP与发生结肠癌的风险无相关性<sup>[21]</sup>, 但另一学者Erlinger同样对直肠癌做了大宗前瞻性研究, 结论恰与Zhan的结论相反, CRP能增加结肠癌的风险<sup>[28]</sup>. 亦有研究证明CRP与肝硬化、肝细胞癌有某些联系<sup>[29-30]</sup>.

上述报道证明CRP与肿瘤的相关性一直存在争议, CRP与肿瘤的关系如何, 尚需大量的临床和实验研究.

本组病例HCC患者, 肝功能无异常, 无引起CRP升高的上诉其他疾病, 因此可认为本组HCC病例术前CRP升高可能系HCC所致. 学者Lin *et al*<sup>[31]</sup>研究发现, 瘤体旁有子灶及弥漫型病例血清CRP水平明显高于单病灶病例, 提示肝癌的病期或恶性生物学行为可能与血清CRP水平的提高有一定关系.

本组实验数据显示, 与肝脏良性病变的患者、正常对照组患者相比, HCC患者的血清CRP水平明显升高, 血清CRP的水平在HCC与良性肝病、健康对照组之间有显著性差异( $P < 0.01$ ). 本试验共32例HCC患者中, 术后2年内临床影像学检查及AFP检测证实为肝癌复发者为22例. 32例HCC患者术前CRP阳性的患者17例, 其中2年内复发的患者13例, 灵敏度为59.09%, 特异度为60%. 32例HCC患者术前VEGF阳性的患者24例, 其中2年内复发的患者17例, 灵敏度为77.27%, 特异度为30%. 2项均阳性对肝癌复发诊断的灵敏度为45.45%, CRP与VEGF至少一项阳性作为判断标准, 灵敏度上升到95%, 特异度为40.9%. 通过本实验的数据的分析, 对于高水平的CRP和VEGF血清浓度的患者, 要警惕肝癌复发的可能, 血清CRP和VEGF的联合检测对肝癌复发的诊断有互补作用.

#### 4 参考文献

- 1 吴孟超. 肝脏外科的回顾、现状及展望. 中国实用外科杂志 2000; 20: 5-6
- 2 吴孟超, 陈汉, 沈锋. 原发性肝癌的外科治疗—附5524例报告. 中华外科杂志 2001; 39: 25-28
- 3 周信达. 肝细胞癌转移复发研究现状与展望. 肝胆外科杂志 2003; 11: 241-243
- 4 吴孟超. 肝脏外科的回顾、现状及展望. 中国实用外科杂志 2000; 20: 5-6
- 5 Borgström P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res* 1996; 56: 4032-4039
- 6 Denekamp J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 1993; 66: 181-196
- 7 Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Doi T, Endo H, Yamashita T, Okada Y. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1998; 33: 376-382
- 8 Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77: 1722-1728
- 9 Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-481
- 10 Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934
- 11 周合山, 章士正. 血管内皮生长因子与肝癌关系研究进展. 浙江医学 2005; 27: 73-75
- 12 蒋扬富, 杨治华, 胡敬群, 蔡建强, 杨晓洁. 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9在原发性肝癌中的表达及其临床意义. 癌症 2000; 19: 17-33
- 13 罗庆丰, 黄传生, 高玫, 涂侃. 血管内皮生长因子表达及微血管生成在判断原发性肝癌转移潜能中意义. 江西医药 2006; 41: 958-960
- 14 易述红, 陈规划, 陆敏强, 杨扬, 蔡常洁, 胡斌. VEGF mRNA在预测肝癌肝移植术后肿瘤复发和转移中的应用价值. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 560-572
- 15 Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212
- 16 高建钢, 张彩虹, 刘凤华. C-反应蛋白的检测及临床应用研究进展. 内蒙古医学院学报 2008; 30: 636-639
- 17 Ohta K, Kanamaru T, Morita Y, Hayashi Y, Ito H, Yamamoto M. Telomerase activity in hepatocellular carcinoma as a predictor of postoperative recurrence. *J Gastroenterol* 1997; 32: 791-796
- 18 常家宝, 田玉岭, 龚希平, 周镇先. 血清C反应蛋白测定在肝硬化腹水合并感染早期的应用. 实用诊断与治疗杂志 2005; 19: 8-9
- 19 Kaminska J, Kowalska MM, Nowacki MP, Chwalinski MG, Rysinska A, Fuksiewicz M. CRP, TNF-alpha, IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-10 in blood serum of colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2000; 6: 38-41
- 20 Chung YC, Chang YF. Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 369-373
- 21 Zhang SM, Buring JE, Lee IM, Cook NR, Ridker PM. C-reactive protein levels are not associated with increased risk for colorectal cancer in women. *Ann Intern Med* 2005; 142: 425-432
- 22 Fujikawa K, Matsui Y, Oka H, Fukuzawa S, Takeuchi H. Serum C-reactive protein level and the impact of cytoreductive surgery in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1999; 162: 1934-1937
- 23 Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 48487-48490
- 23 McKeown DJ, Brown DJ, Kelly A, Wallace AM, McMillan DC. The relationship between circulating concentrations of C-reactive protein, inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1993-1995
- 24 Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Shiratori T, Aoki T, Sugaya M, Miyazawa Y, Hayashi H, Miyazaki S, Ochiai T. Elevation of preoperative serum C-reactive protein level is related to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2003; 83: 248-252
- 25 Guillem P, Triboulet JP. Elevated serum levels of C-reactive protein are indicative of a poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2005; 18: 146-150
- 26 Miyata Y, Koga S, Nishikido M, Noguchi M, Kanda

#### 同行评价

本文选题很好, 尤其是肝癌和C-反应蛋白(CRP)表达水平的研究文章较少, 结论有较好的参考价值.



- S, Hayashi T, Saito Y, Kanetake H. Predictive values of acute phase reactants, basic fetoprotein, and immunosuppressive acidic protein for staging and survival in renal cell carcinoma. *Urology* 2001; 58: 161-164
- 27 Lin ZY, Wang LY, Yu ML, Chen SC, Chuang WL, Hsieh MY, Tsai JF, Chang WY. Role of serum C-reactive protein as a marker of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 417-421
- 28 Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA* 2004; 291: 585-590
- 29 程玉萍, 华川, 许亚辉. 肝硬化和肝癌患者血清C-反应蛋白测定的临床价值. *华北国防医药* 2007; 19: 57-59
- 30 程道胜, 彭又生, 黄胜起, 尹和坤. 血清CRP检测在鉴别肝细胞癌和肝硬化中的作用. *中国实验诊断学* 2002; 6: 136-138

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t=4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

# 直肠癌腔内超声分期的诊断价值及其与TNM分期关系

史国红, 王学梅, 于英蛟, 李银燕, 董鲜普

史国红, 王学梅, 李银燕, 董鲜普, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科 辽宁省沈阳市 110001

于英蛟, 大庆油田总医院超声科 黑龙江省大庆市 163001

作者贡献分布: 此课题由王学梅、史国红、于英蛟、李银燕及董鲜普设计; 研究过程由史国红、于英蛟、李银燕及董鲜普操作完成; 数据分析由史国红与王学梅完成; 本论文写作由史国红与王学梅完成。

通讯作者: 王学梅, 主任医师, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科。

wxmlmt@yahoo.com.cn

电话: 024-83282098

收稿日期: 2009-09-15 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Transrectal ultrasonography in preoperative staging of rectal carcinoma: diagnostic value and relationship with TNM staging

Guo-Hong Shi, Xue-Mei Wang, Ying-Jiao Yu, Yin-Yan Li, Xian-Pu Dong

Guo-Hong Shi, Xue-Mei Wang, Yin-Yan Li, Xian-Pu Dong, Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Ying-Jiao Yu, Department of Ultrasound, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Xue-Mei Wang, Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Northern Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmlmt@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-15 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the diagnostic value of transrectal ultrasonography (TRUS) in preoperative staging of rectal carcinoma and the relationship between TRUS and TNM staging.

**METHODS:** Sixty-five patients with pathologically confirmed rectal carcinoma were detected by TRUS before surgery. The circumference of the bowel wall involved by tumor was recorded. The preoperative transrectal ultrasonographic staging of rectal carcinoma was performed using the TNM staging system. The preoperative staging results were then compared with those of

postoperative pathologic staging.

**RESULTS:** The overall accuracy rate of preoperative staging of rectal carcinoma by TRUS was 86.15%. The diagnostic accuracy in T1-T4-stage patients by TRUS was 93.85%, 87.69%, 90.77% and 100%, respectively. The circumference of the bowel wall involved by tumor was positively correlated with pathological tumor stage ( $r = 0.89$ ,  $P < 0.01$ ). The overall accuracy rate of preoperative staging of rectal carcinoma by TRUS in combination with the circumference of the bowel wall involved by tumor was 95.38%.

**CONCLUSION:** TRUS has a high diagnostic accuracy in preoperative staging of rectal carcinoma. TRUS in combination with the circumference of the bowel wall involved by tumor can improve the diagnostic accuracy of preoperative staging of rectal carcinoma.

**Key Words:** Rectal neoplasm; Neoplasm staging; Endosonography

Shi GH, Wang XM, Yu YJ, Li YY, Dong XP. Transrectal ultrasonography in preoperative staging of rectal carcinoma: diagnostic value and relationship with TNM staging. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3465-3468

## 摘要

**目的:** 探讨经直肠腔内超声(TRUS)对直肠癌术前分期的诊断价值及其与TNM分期的关系。

**方法:** 对65例经病理证实为直肠癌的患者术前进行TRUS检查, 记录癌肿浸润周径, 同时采用TNM分期标准进行分期, 并与术后TNM分期进行对照。

**结果:** 65例直肠癌术前TRUS检查总的诊断准确率为86.15%, T1-T4期TRUS诊断准确性分别为 93.85%、87.69%、90.77%及100%, 直肠癌癌肿浸润周径与TNM分期间呈正相关( $r = 0.89$ ,  $P < 0.01$ ), 结合直肠癌癌肿浸润周径程度可以使直肠癌术前分期总的诊断准确率明显提高(95.38%)。

## 背景资料

直肠癌是常见的消化系恶性肿瘤, 目前最有效的治疗方法仍是手术根治性切除, 而直肠肿瘤准确的术前分期对制定合理的治疗方案、选择术式及判断预后均具有重要价值。TRUS在直肠癌术前分期中的价值已得到广泛认可, 但在分期的准确性方面仍有不足, 而结合癌肿浸润周径可提高直肠癌术前分期诊断准确率。

同行评议者  
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

### 创新盘点

本研究将TRUS分期与肿块浸润周径程度两者联合,从而能够提高直肠癌术前分期诊断准确率,弥补了单独应用TRUS分期带来的分期过度或分期不足的现象。

**结论:** TRUS检查对于直肠癌术前分期有较高的诊断准确性,有助于制定合理的治疗方案,结合直肠癌组织浸润周径可提高术前分期诊断准确性。

**关键词:** 直肠肿瘤; 肿瘤分期; 腔内超声检查

史国红, 王学梅, 于英蛟, 李银燕, 董鲜普. 直肠癌腔内超声分期的诊断价值及其与TNM分期关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3465-3468

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3465.asp>

## 0 引言

直肠癌约占大肠癌的60%-75%,是常见的消化系统恶性肿瘤,并有逐年上升趋势。对于T1期和部分T2期直肠癌可行局部切除,而T3、T4期可考虑术前放化疗加手术等<sup>[1]</sup>,因此准确辨认癌肿对肠壁及其周围组织的浸润尤为重要。TRUS在直肠癌术前分期中的价值已得到广泛认可,但在分期的准确性方面仍有不足<sup>[2]</sup>。为避免TRUS对直肠癌术前分期过度或分期不足,本研究对65例直肠癌患者术前行TRUS分期,同时通过TRUS观察癌肿浸润肠管周径程度,并与术后病理分期行对比观察,以探讨直肠癌腔内超声分期的诊断价值及与病理分期的相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-09-01/2009-06-01于我院住院接受治疗的直肠癌患者65例,其中男38例,女27例,年龄32-78(平均62.0±10.9)岁。仪器采用PHILIPS IU22超声诊断仪,选择经直肠腔内探头,频率8 MHz。

**1.2 方法** 所有患者均于当日检查前行肠道准备,检查时,取左侧卧位,屈膝,双膝尽量向上,双手抱膝,使肛门暴露。将探头外涂少量耦合剂,然后套上乳胶套,嘱患者深呼吸,将探头缓慢插入肛门,注意观察肿瘤的位置、肠壁层次、对周围组织及脏器的浸润情况,同时转动探头动态观察癌组织侵犯肠管周径。

TRUS对直肠癌分期标准<sup>[3]</sup>及对肿瘤浸润周径分级: 1期(UT1): 病变深度仅限于黏膜或黏膜下层; 2期(UT2): 病变深入肠壁肌层; 3期(UT3): 病变深入浆膜层或肠壁外膜(直肠下段)达周围脂肪组织; 4期(UT4): 病变侵入邻近脏器。肿瘤浸润肠周径程度分为4级: 1级: 浸润周径程度≤1/4; 2级: 1/4<浸润周径程度≤1/2; 3级: 1/2<浸润周径程度≤3/4; 4级: 3/4<浸润周径程度≤1。

**统计学处理** 利用SPSS13.0软件进行统计

表 1 直肠癌术前超声分期与术后病理分期的比较 (n)

| TRUS分期<br>(UT) | 病理分期(PT) |     |     |     | 合计 |
|----------------|----------|-----|-----|-----|----|
|                | PT1      | PT2 | PT3 | PT4 |    |
| UT1            | 9        | 1   | 1   | 0   | 11 |
| UT2            | 2        | 16  | 3   | 0   | 21 |
| UT3            | 0        | 2   | 21  | 0   | 23 |
| UT4            | 0        | 0   | 0   | 10  | 10 |
| 合计             | 11       | 19  | 25  | 10  | 65 |

Kappa值 = 0.81,  $P = 0.00$ 。

学处理,对2种分期之间的比较,采用Kappa评价方法进行一致性分析;多分类有序资料应用Spearman等级相关进行相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 术后病理诊断** 65例直肠癌中,高分化腺癌14例,中分化腺癌43例,低分化腺癌6例,黏液腺癌2例。

**2.2 直肠癌术前TRUS分期与术后病理分期的比较** 对术前TRUS分期与术后病理分期行诊断实验一致性检验,差异有统计学意义,两者一致性较好(Kappa值 = 0.81,  $P = 0.00$ , 表1, 图1)。65例直肠癌患者术前TRUS分期过度4例,分期不足5例,超声分期总的诊断准确性为86.15%(56/65),各分期诊断准确性、敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值(表2)。

**2.3 直肠癌癌肿浸润肠管周径程度与病理分期的相关性** 直肠癌癌肿浸润肠管周径程度与病理分期呈正相关( $r = 0.89$ ,  $P<0.01$ , 表3),即随着癌肿浸润肠周径程度的增加,病理分期逐渐增高。本研究显示81.82%(9/11)PT1期肿瘤浸润肠管周径程度为1级;84.21%(16/19)PT2期肿瘤侵犯肠管周径程度为2级;72%(18/25)PT3期肿瘤侵犯肠管周径程度为3级;90%(9/10)PT4期肿瘤浸润肠管周径程度为4级。分期过度的4例中,2例病理定为PT2期,超声定为UT3期,超声检测癌肿浸润周径程度为2级,与病理分期相符;分期不足的5例中,3例病理定为PT3期,超声定为UT2期,1例病理定为PT3期,超声定为UT1期,而超声检测癌肿浸润周径程度均为3级。TRUS结合癌肿浸润周径程度可使直肠癌术前分期总的诊断准确率达95.38%(62/65)。

## 3 讨论

直肠癌术前准确分期是外科选择合理治疗方案的关键。正常直肠壁厚约3 mm,一般不超过5



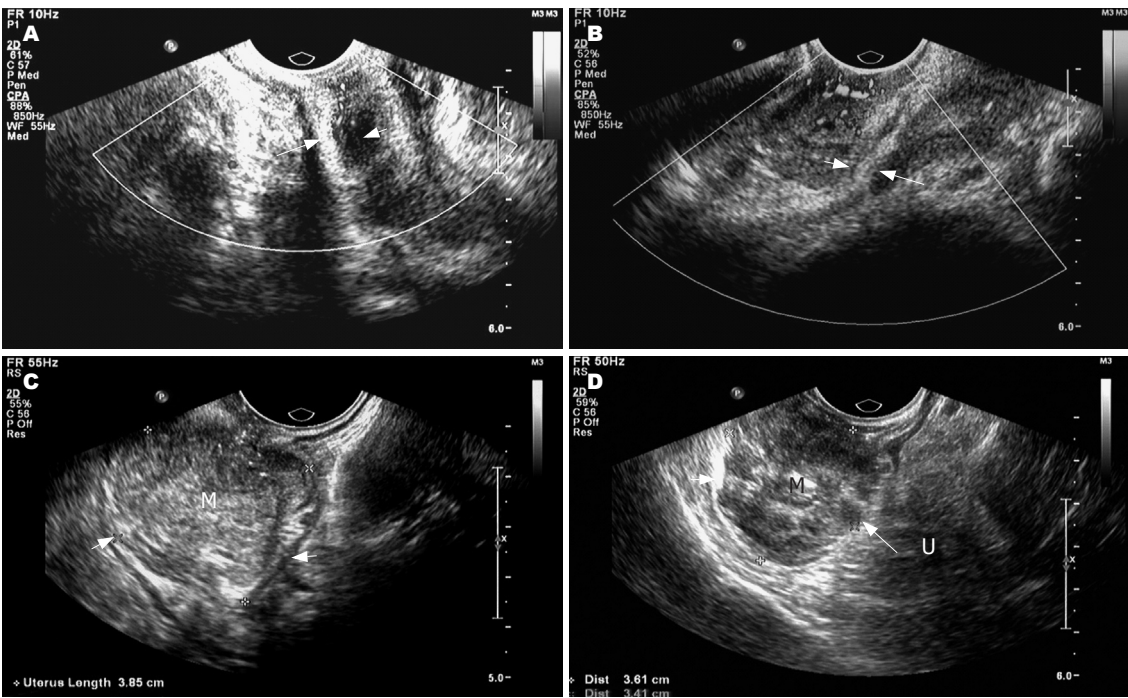


图 1 直肠癌的TRUS分期. A: T1期直肠癌, 黏膜层及黏膜下层回声中断, 肌层(小箭头)及浆膜层(大箭头)尚完整; B: T2期直肠癌, 侵及肌层(小箭头), 浆膜层(大箭头)完整; C: T3期直肠癌, 直肠全层均被肿块(M)占据, 周围脂肪间隙消失; D: T4期直肠癌, 穿透浆膜层(大箭头), 癌肿向前侵及子宫(U)后壁.

表 2 直肠癌术前TRUS分期诊断结果 (%)

| 参数    | TRUS分期       |              |              |            |
|-------|--------------|--------------|--------------|------------|
|       | UT1          | UT2          | UT3          | UT4        |
| 诊断正确率 | 93.85(61/65) | 87.69(57/65) | 90.77(59/65) | 100(65/65) |
| 诊断敏感度 | 81.82(9/11)  | 84.21(16/19) | 84.00(21/25) | 100(10/10) |
| 诊断特异度 | 96.30(52/54) | 89.13(41/46) | 95.00(38/40) | 100(55/55) |
| 阳性预测值 | 81.82(9/11)  | 76.20(16/21) | 91.30(21/23) | 100(10/10) |
| 阴性预测值 | 96.30(52/54) | 93.20(41/44) | 90.48(38/42) | 100(55/55) |

mm. 在肠腔内液性无回声的衬托下, 超声显示为强回声带和低回声带相互交替的5层结构<sup>[3]</sup>: 即3条强回声与其间的2条低回声. 从腔内向腔外依次为: 第1层较弱的强回声, 为腔内液体与肠黏膜表面构成的界面回声; 第2层低回声, 为肠黏膜肌层; 第3层强回声, 为黏膜下层, 是5层中回声最明显的一层; 第4层低回声, 为固有肌层; 第5层强回声, 为浆膜层或肠壁外纤维脂肪组织. 直肠癌浸润深度以肿瘤破坏的最深层作为判断标准, 此为直肠癌超声分期的基础, 其准确性达67%-93%<sup>[4]</sup>, 对于识别直肠病变并进行分期具有重要意义.

直肠癌分期主要在于辨认肿瘤的浸润层次及邻近脏器有无受累, 主要的影像学检查方法包括: CT、MRI、TRUS. 目前CT由于软组织对比度不如MRI和TRUS, 对于T1期和T2期肿瘤很

**应用要点**  
本文提示, 结合肠管浸润周径程度, 有助于提高直肠癌分期诊断的准确性, 可以为临床选择更为合适的治疗方案和评估预后提供参考.

难判断, 因而早期研究因大多选择进展期直肠癌而获得较高的准确率, 但当非进展期病变时, 分期的准确率就有很大程度降低. 然而早期的研究表明应用表面线圈的MRI技术并没有提高T分期的准确率, 即使是应用新一代具有更高分辨率的相控阵线圈技术, 其T分期的准确率也只有65%-86%<sup>[5]</sup>. 同时MRI检查价格昂贵, 所需时间长, 内部噪声较大, 因此, 大部分患者不愿意接受. 而TRUS对直肠癌肠壁浸润情况可以做出准确评估, 我们采用直肠腔内超声结合彩色多普勒技术能较清晰地显示肿瘤与肠壁及周围脏器的关系, 同时结合癌肿浸润肠管周径程度可以对其分期做出准确评估.

本研究中直肠腔内超声分期总的诊断准确性、敏感度和特异度均较高, 表明TRUS是直肠癌术前分期的良好方法, 与文献报道基本一

## 同行评价

本文应用高分辨率的直肠超声,从肿瘤对直肠壁的浸润层次和占直肠周径的比例双向判别直肠癌的分期,结论具有较好的临床参考价值。

表 3 直肠癌肿块浸润肠管周径程度与病理分期的关系(n)

| 浸润周径 | 病理分期(PT) |     |     |     | 合计 |
|------|----------|-----|-----|-----|----|
|      | PT1      | PT2 | PT3 | PT4 |    |
| 1级   | 9        | 2   | 0   | 0   | 11 |
| 2级   | 2        | 16  | 5   | 0   | 23 |
| 3级   | 0        | 1   | 18  | 1   | 20 |
| 4级   | 0        | 0   | 2   | 9   | 11 |
| 合计   | 11       | 19  | 25  | 10  | 65 |

$$r = 0.89, P < 0.01.$$

致<sup>[4,6]</sup>。分期不符合的9例中,分期过度4例,2例PT1期误诊为UT2期,2例PT2期误诊为UT3期。分期过度可能与癌肿周围肠壁炎症水肿、纤维化、瘢痕形成或声束与病变处肠壁平行造成回声失落有关,在超声声像图上肿瘤浸润和炎症反应很难区别。分期不足5例,3例PT3期误诊为UT2期,1例PT2期误诊为UT1期,1例PT3期误诊为UT1期。分期不足可能与超声不能分辨微小癌浸润有关,从而影响对肿瘤浸润深度的判断。

对于肿瘤的大小与直肠癌分期是否存在相关性,学者们对此尚有争议。一些学者认为直肠是空腔脏器,形态多变,体积和径线测量较困难,且重复性较差<sup>[7-8]</sup>。同时可能还与肿瘤的生长方式有关,当肿瘤径线较大而向腔内生长明显时,可能分期并不高,反之,肿瘤径线虽相对较小但向壁内浸润性生长明显时,分期固然升高。本研究通过观察肿瘤浸润直肠管腔周径程度,将其与病理分期进行相关分析,发现两者呈正相关:即浸润肠管周径越大,肿瘤浸润深度则越深。

直肠癌肿块本身有环绕肠管侵袭性生长的倾向,既可以沿肠壁生长,又可以向肠壁深层浸润,尚有学者认为癌肿浸润肠壁1周约需1-2年。因此,侵犯肠管周径越大的肿瘤,生长期越长,其浸润深度亦越深,与淋巴管接触的面积亦越大,引起淋巴结转移的机会越多,故分期越高,这与贾绍昌 *et al*<sup>[9]</sup>观点相一致。当肿瘤局限于黏膜层时,因该层无淋巴管,所以不发生淋巴道转移,而黏膜下层已有淋巴管道分布,故肿瘤浸润至黏膜下层时,即有可能发生淋巴道转移,随着肿瘤向肠壁深层浸润,淋巴结转移率明显增加,同时肠壁肌层与浆膜层对癌细胞扩散起到一定的阻碍作用,浆膜层较肌层有较丰富的淋巴管,癌细胞一旦侵入浆膜层,进入淋巴管的机会增加,转移率亦显著增高,癌细胞浸润突破浆膜层

后,更容易侵及周围组织、血管及淋巴管,使其转移率显著增加。虽然以往有些学者对直肠癌肿块浸润肠管周径方面有过研究,但都未将其与直肠癌分期相结合。本研究通过结合直肠癌肿块浸润肠管周径程度,可使直肠癌术前分期的诊断准确率达95.38%,这提示观察癌肿浸润周径程度有助于评估直肠癌肿块的浸润深度,可以对直肠癌分期进行有益的补充。

总之,直肠腔内超声是一种无创、快捷、价格低廉、可重复实施、并能显示肿瘤全貌的检查方法,TRUS检查对于直肠癌术前分期有较高的诊断准确性,但尚存在分期过高或分期过低现象;而直肠癌肿块浸润肠管周径程度与病理分期呈正相关,因此,结合肠管浸润周径程度,有助于提高直肠癌分期诊断的准确性,可以为临床选择更为合适的治疗方案和评估预后提供参考。

## 4 参考文献

- Kim HJ, Wong WD. Role of endorectal ultrasound in the conservative management of rectal cancers. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 358-366
- Marusch F, Koch A, Schmidt U, Zippel R, Kuhn R, Wolff S, Pross M, Wierth A, Gastinger I, Lippert H. Routine use of transrectal ultrasound in rectal carcinoma: results of a prospective multicenter study. *Endoscopy* 2002; 34: 385-390
- Beynon J, Foy DM, Roe AM, Temple LN, Mortensen NJ. Endoluminal ultrasound in the assessment of local invasion in rectal cancer. *Br J Surg* 1986; 73: 474-477
- Heriot AG, Grundy A, Kumar D. Preoperative staging of rectal carcinoma. *Br J Surg* 1999; 86: 17-28
- Gagliardi G, Bayar S, Smith R, Salem RR. Preoperative staging of rectal cancer using magnetic resonance imaging with external phase-arrayed coils. *Arch Surg* 2002; 137: 447-451
- Kim NK, Kim MJ, Yun SH, Sohn SK, Min JS. Comparative study of transrectal ultrasonography, pelvic computerized tomography, and magnetic resonance imaging in preoperative staging of rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 770-775
- Kim YH, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Jeong SY, Sohn DK, Choi HS, Ahn JB, Kim DH, Lim SB, Lee JS, Park JG. Usefulness of magnetic resonance volumetric evaluation in predicting response to preoperative concurrent chemoradiotherapy in patients with resectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 761-768
- Kim NK, Baik SH, Min BS, Pyo HR, Choi YJ, Kim H, Seong J, Keum KC, Rha SY, Chung HC. A comparative study of volumetric analysis, histopathologic downstaging, and tumor regression grade in evaluating tumor response in locally advanced rectal cancer following preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 204-210
- 贾绍昌, 张樱, 王跃华, 张卫兵. 直肠癌淋巴结转移相关影响因素的临床研究. *临床肿瘤学杂志* 2008; 13: 541-544

编辑 李军亮 电编 何基才

## 铋剂在雷贝拉唑为主的四联疗法中的作用

徐 娴, 张振玉

徐 娴, 张振玉, 南京医科大学附属南京市第一医院消化科  
江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 徐娴为此课题做主要贡献; 课题由张振玉与徐娴  
共同设计; 研究过程在张振玉指导下由徐娴操作完成; 数据分析  
由徐娴完成; 本论文写作由徐娴完成.

通讯作者: 张振玉, 主任医师, 副教授, 江苏省南京市, 南京医科  
大学附属南京市第一医院消化科.

davidlichuanhong@yahoo.com.cn

电话: 025-52271260

收稿日期: 2009-09-03 修回日期: 2009-11-13

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

### Therapeutic effects of colloidal bismuth subcitrate in rabeprazole-based quadruple therapy

Xian Xu, Zhen-Yu Zhang

Xian Xu, Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterol-  
ogy, Nanjing First Hospital, Affiliated to Nanjing Medical  
University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Zhen-Yu Zhang, Depart-  
ment of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Affiliated  
to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu  
Province, China. davidlichuanhong@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-03 Revised: 2009-11-13

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

### Abstract

**AIM:** To evaluate the therapeutic effects of  
colloidal bismuth subcitrate in rabeprazole-  
based quadruple therapy in peptic ulcer patients  
positive for *Helicobacter pylori* (*H pylori*).

**METHODS:** Seventy-six peptic ulcer patients with  
*H pylori* infection were randomly divided into two  
groups: control group and experimental group.  
The control group received rabeprazole plus  
amoxicillin and levofloxacin, while the experimen-  
tal group received rabeprazole plus amoxicillin,  
levofloxacin and colloidal bismuth pectin. After a  
7-day treatment course, the therapy for peptic ul-  
cer was carried out. The eradication rate of *H pylori*  
infection, the ulcer healing rate and side-effects  
were compared between the two groups.

**RESULTS:** The eradication rate of *H pylori* in-  
fection was significantly lower in the control  
group than in the experimental group (71.05% vs

92.10%,  $P < 0.05$ ). No significant difference was  
noted in the ulcer healing rate between the two  
groups (92.11% vs 94.74%,  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Colloidal bismuth subcitrate in  
rabeprazole-based quadruple therapy is effec-  
tive and safe in peptic ulcer patients positive for  
*H pylori*.

**Key Words:** Peptic ulcer; *Helicobacter pylori*; Quad-  
ruple therapy

Xu X, Zhang ZY. Therapeutic effects of colloidal bismuth  
subcitrate in rabeprazole-based quadruple therapy. *Shijie*  
*Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3469-3471

### 摘要

**目的:** 探讨铋剂在雷贝拉唑为主的四联疗法  
对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)阳  
性的消化性溃疡的治疗效果.

**方法:** 选取*H pylori*阳性的消化性溃疡76例, 随  
机分为对照组与试验组: 对照组使用雷贝拉  
唑+左氧氟沙星+阿莫西林, 试验组在上述药  
物外加用果胶铋, 疗程7 d, 然后进行抗溃疡治  
疗. 观察*H pylori*根除率、溃疡愈合率及不良  
反应.

**结果:** 对照组*H pylori*根除率为71.05%, 试验组  
为92.10%, 2组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ); 对  
照组溃疡愈合率92.11%, 试验组为94.74%, 2  
组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ).

**结论:** 铋剂在雷贝拉唑为主的四联疗法对*H pylori*  
阳性的消化性溃疡的治疗中安全、有效.

**关键词:** 消化性溃疡; 幽门螺杆菌; 四联疗法

徐娴, 张振玉. 铋剂在雷贝拉唑为主的四联疗法中的作用. 世界  
华人消化杂志 2009; 17(33): 3469-3471  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3469.asp>

### 0 引言

消化性溃疡是临床常见病、多发病, 其主要发病  
原因是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)

### 背景资料

消化性溃疡是临  
床常见病, 主要指  
发生在胃和十二  
指肠的溃疡, 其  
主要病因为胃酸  
分泌过多、胃肠  
黏膜保护减弱及  
*H pylori*感染. 根  
除*H pylori*是治疗  
消化性溃疡和防  
止溃疡复发的重要  
治疗方法.

### 同行评议者

张筱茵, 副教授,  
中国人民解放军  
第四军医大学西  
京医院消化疾病  
研究所



### 应用要点

本研究提示, 铋剂在根除*H pylori*的治疗中有其独特优势, 即: 疗效确切、相对价廉、患者的治疗依从性好, 这对*H pylori*感染的根除有很大的影响, 值得临床推广使用。

感染及胃酸和胃蛋白酶的消化作用。因此, 根除*H pylori*是治疗消化性溃疡和防止溃疡复发的重要治疗方法。本文采用雷贝拉唑、左氧氟沙星、阿莫西林及果胶铋治疗*H pylori*阳性消化性溃疡, 取得良好的效果, 现汇报如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2008-10/2009-04我院消化科经电子胃镜证实胃或/和十二指肠溃疡患者76例,  $^{13}\text{C}$ 或 $^{14}\text{C}$ -尿素呼气试验( $^{14}\text{C}$ -UBT)或快速尿素酶试验(RUT)检查有任意一项阳性者入选。其中十二指肠溃疡48例, 胃溃疡20例, 复合性溃疡8例; 男52例, 女24例, 年龄18-68(平均34.6)岁, 病程2月到3年(平均1.4年)。2组患者性别比例、年龄、病程及溃疡大小差异无统计学意义。

排除标准: (1)治疗前4 wk使用抗生素、铋剂、 $\text{H}_2$ 受体抑制剂( $\text{H}_2$ -receptor antagonist,  $\text{H}_2\text{RA}$ )和质子泵抑制剂(proton-pump inhibitor, PPI)者; (2)妊娠或哺乳期妇女; (3)患者同时服用非甾体类消炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)、酗酒或者存在其他影响本研究评价的严重疾病如严重心、肝、肾疾病等; (4)对所用药物过敏者; (5)年龄<18岁和>70岁; (6)胃镜下不能排除溃疡恶变者; (7)患者不能正确表达自己的主诉, 如精神病、严重神经官能症或不能合作完成本试验者。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及治疗:** 将76例符合上述观察入选条件的患者随机分为2组, 每组38例。分别采用雷贝拉唑、左氧氟沙星及阿莫西林三联疗法作为对照组和上述三联药物外添加铋剂的四联疗法的试验组。对照组采用雷贝拉唑10 mg, 每日2次, 清晨及睡前空腹服用; 左氧氟沙星0.2 g, 每日2次, 早晚饭后30 min, 阿莫西林1.0 g, 每日2次, 早晚饭后30 min; 试验组在上述方案基础上增加果胶铋100 mg, 每日3次, 2组治疗时间均为7 d, 结束后对照组选用雷贝拉唑10 mg, 每日2次, 治疗21 d; 试验组联合应用雷贝拉唑10 mg, 每日2次, 果胶铋100 mg, 每日3次, 治疗21 d。治疗期间不用其他任何抗生素及抗溃疡的药物, 治疗结束4 wk后复查胃镜、RUT检查及 $^{13}\text{C}$ -UBT或 $^{14}\text{C}$ -UBT。

**1.2.2 疗效标准判定:** 以内镜检查结果、*H pylori*根除率、不良反应的发生率及症状评定作为判断标准: (1)内镜判断标准: (a)溃疡面消失或仅留瘢痕者为治愈; (b)溃疡面较前缩小1/2以上或仅

留少许薄白苔为好转; (c)溃疡面无明显变化为无效; (2)*H pylori*检测标准: 胃镜下分别取胃窦及胃体2块黏膜行RUT试验及 $^{13}\text{C}$ -UBT或 $^{14}\text{C}$ -UBT均为阴性视为*H pylori*已根除; (3)记录治疗过程中2组不良反应的发生情况; (4)症状评定: 主要以腹痛为观察指标, 疼痛分为无痛、轻度、中度、重度4级, 轻度为偶有疼痛或经提醒才感到; 中度疼痛为影响部分工作, 服抗酸药才能缓解; 重度疼痛需休息, 服抗酸药亦无效。治疗后疼痛消失或偶然出现轻度疼痛者为疼痛缓解。

**统计学处理** 计量资料采用 $t$ 检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验。以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 *H pylori*根除率** 试验组38例, *H pylori*根除35例, 根除率为92.10%; 对照组38例, *H pylori*根除27例, 根除率为71.05%。试验组*H pylori*根除率较对照组升高, 2组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.2 溃疡愈合情况** 试验组治愈率94.74%(36/38), 好转2例; 对照组溃疡治愈率92.11%(35/38), 好转1例, 2例无明显变化。2组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.3 不良反应发生情况** 2组均坚持完疗程, 不良反应轻微, 主要为恶心、口干、纳差或转氨酶轻度异常。其中治疗组3例(7.89%), 对照组4例(10.52%), 2组比较无显著性差异( $P>0.05$ )。

**2.4 症状缓解率** 试验组症状缓解率为97.37%(37/38), 对照组症状缓解率为84.21%(32/38), 试验组症状缓解率较对照组为高, 但2组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

消化性溃疡是临床常见病, 主要指发生在胃和十二指肠的溃疡, 其主要病因为胃酸分泌过多、胃肠黏膜保护减弱及*H pylori*感染。目前对该病的药物治疗主要采取根除*H pylori*、抑制胃酸分泌及保护胃黏膜的原则。近年来, 认为*H pylori*为消化性溃疡的重要原因, 主要依据: (1)消化性溃疡患者*H pylori*检出率显著高于普通人群。其中在十二指肠溃疡的检出率约为90%, 胃溃疡为70%-80%。大量临床研究表明, 成功根除*H pylori*后溃疡复发率明显下降, 用常规抑酸治疗后愈合的溃疡年复发率50%-70%, 而根除*H pylori*可使溃疡复发率降至5%以下, 这表明祛除病因后消化性溃疡可获治愈<sup>[1]</sup>; (2)*H pylori*凭借其毒力

因子作用, 诱发胃和十二指肠黏膜发生炎症和免疫反应, 损伤局部黏膜的防御修复机制; 同时, *H pylori*感染可增加促胃液素和胃酸的分泌, 增强了侵袭因素, 这两方面的协同作用造成了胃十二指肠黏膜损害和溃疡形成<sup>[2]</sup>.

目前认为一个理想的根除*H pylori*的治疗方案应该包括(1)*H pylori*根除率>90%; (2)不良反应最小; (3)患者耐受性好; (4)溃疡愈合迅速、症状消失快; (5)不产生耐药性; (6)疗程短、价格低; (7)效果持续, 不易复发<sup>[3]</sup>. 但至今还没有任何一种疗法能够完全符合上述要求. 且*H pylori*的耐药问题日趋严重, 甲硝唑、克拉霉素和阿莫西林曾经为治疗*H pylori*感染的首选药物, 随着抗生素的普遍使用, 人群感染耐药性*H pylori*菌株的比例越来越高, 耐药往往成为治疗失败的主要原因. 其中甲硝唑的耐药率最高, 发展中国家可高达90%, 发达国家有的也近50%. 克拉霉素的耐药率虽然平均为10%左右, 但呈上升趋势. 其耐药性的形成与23S rRNA V区的点突变A2142G、A2143G及A2142C等密切相关. *H pylori*的阿莫西林耐药率非常低, 平均不到1%, 可分为稳定性耐药和不稳定性耐药. 据报道, 耐药菌株中未检测到 $\beta$ -内酰胺酶的活性, 其耐药性形成可能与青霉素结合蛋白变化有关<sup>[4]</sup>.

我们治疗方案的机制为: 雷贝拉唑为新一代PPI, 具有较高的解离常数(PKa), 为迄今作用时间较长、起效迅速、强度最高的抑制胃酸分泌的药物, 他可与壁细胞分泌小管和囊泡内 $H^+$ - $K^+$ -ATP酶结合, 使其不可逆的失去活性, 使壁细胞内的 $H^+$ 不能移到胃腔中, 从而阻滞胃酸的最后分泌过程, 达到治疗消化性溃疡的目的<sup>[5]</sup>. 国外研究表明, 雷贝拉唑10 mg, 每日2次, 24 h胃酸能明显受到抑制, 尤其雷贝拉唑夜间抑酸作用明显, 并无夜间酸分泌现象, 从而保证具有较高的溃疡愈合率. 同时, 雷贝拉唑的代谢很少依赖细胞色素酶P450(CYP, 最主要是CYP2C19), 而且经CYP2C19代谢后的代谢产物仍具有药理活性, 从而使雷贝拉唑根除*H pylori*的疗效较其他PPI更为稳定等也有关<sup>[6]</sup>; 左氧氟沙星是氧氟沙星的左旋体, 其体外抗菌活性约为氧氟沙星的2倍. 他通过抑制细菌DNA旋转酶的活性, 阻止细菌DNA的合成和复制而导致细菌死亡. 具有抗菌谱广、半衰期长、性质稳定、耐酸、口服易吸收等特点, 缺点为易引起胃肠道反应、过敏致瘙痒及皮疹等. 有关研究证实<sup>[7]</sup>, 左氧氟沙星对*H pylori*的最小抑菌浓度(MIC)范围与常用

的克拉霉素和阿莫西林的MIC<sub>50</sub>类似, 而耐药率却明显低于克拉霉素, 同时发现其在酸性环境下抗菌活性降低, 提示临床应用时应同时合用抑酸药; 胶体果胶铋以生物大分子果胶酸为酸根, 提高铋剂的稳定性, 联合使用果胶铋可加强黏膜防御机制, 促进黏液分泌及杀死作用, 同时由于铋剂能防止和克服*H pylori*对抗生素产生耐药, 其在*H pylori*根除治疗方案中的应用正重新受到重视<sup>[8]</sup>. 迄今为止, 尚无*H pylori*对铋剂原发或继发耐药的报道. 已证实铋剂有防止和克服*H pylori*对克拉霉素和替硝唑等抗生素产生耐药的作用, 并可与克拉霉素等发挥协同作用<sup>[9]</sup>. 本实验也说明联合使用果胶铋可作为对*H pylori*耐药菌株的感染及三联疗法失败的患者的补救措施, 提高*H pylori*根除率, 明显改善症状, 试验组不良反应包括恶心、纳差、食欲减退或转氨酶轻度异常等发生率明显降低. 总之, 铋剂在根除*H pylori*的治疗中有其独特优势, 即: 疗效确切、相对价廉、患者的治疗依从性好, 这对*H pylori*感染的根除有很大的影响, 值得临床推广使用.

#### 4 参考文献

- 1 Israel DA, Peek RM Jr. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 3-7
- 2 Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A, Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-563
- 3 胡伏莲. 《幽门螺杆菌感染若干问题共识意见》解读. *中国医刊* 2007; 42: 5-6
- 4 van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, van der Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998; 352: 1595
- 5 曾民德. 雷贝拉唑治疗消化性溃疡的多中心临床研究. *中华消化杂志* 2001; 21: 404-406
- 6 Hokari K, Sugiyama T, Kato M, Saito M, Miyagishima T, Kudo M, Nishikawa K, Ishizuka J, Komatsu Y, Mizushima T, Kagaya H, Hige S, Takeda H, Asaka M. Efficacy of triple therapy with rabeprazole for *Helicobacter pylori* infection and CYP2C19 genetic polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1479-1484
- 7 邹军, 扬昭徐, 覃卓明. 左旋氧氟沙星抗幽门螺杆菌的实验室评价和临床研究. *中华医学杂志* 2003; 83: 1778-1781
- 8 Wong BC, Wong WM, Wang WH, Fung FM, Lai KC, Chu KM, Yuen ST, Leung SY, Hu WH, Yuen MF, Lau GK, Chan CK, Lam SK. One-week ranitidine bismuth citrate-based triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* in Hong Kong with high prevalence of metronidazole resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 403-409
- 9 李岩. 消化性溃疡的药物治疗进展. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 25-27

**同行评价**  
本文从临床实际出发, 针对铋剂在根治幽门螺杆菌方面的作用设计了临床速记对照试验, 结果有一定临床及学术价值.

# 胃十二指肠复合型溃疡合并空肠异位胰腺1例

赵兴文, 王胜, 陶守军, 苏传伟, 刘建斌

**背景资料**  
异位胰腺指位于正常解剖部位以外, 与胰腺本身无解剖联系或共同的血管供应的胰腺组织, 异位胰腺在临床上很少见, 且临床表现不一, 他引起消化系出血时很容易被误诊为其他消化系出血性疾病, 特别是合并其他消化系出血性疾病时往往被漏诊。

赵兴文, 王胜, 陶守军, 苏传伟, 刘建斌, 深圳市观澜人民医院 广东省深圳市 518110  
通讯作者: 赵兴文, 主任医师, 518110, 广东省深圳市, 深圳市观澜人民医院普外科. iceeyesok@163.com  
收稿日期: 2009-07-23 修回日期: 2009-09-15  
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-11-28

## Concomitant gastric and duodenal ulcers with jejunal pancreatic heterotopia: a report of one case

Xing-Wen Zhao, Sheng Wang, Shou-Jun Tao, Zhuan-Wei Su, Jian-Bin Liu

Xing-Wen Zhao, Sheng Wang, Shou-Jun Tao, Zhuan-Wei Su, Jian-Bin Liu, Shenzhen Guanlan People's Hospital, Shenzhen 518110, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Xing-Wen Zhao, Department of General Surgery, Shenzhen Guanlan People's Hospital, Shenzhen 518110, Guangdong Province, China. iceeyesok@163.com  
Received: 2009-07-23 Revised: 2009-09-15  
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-11-28

### Abstract

Heterotopic pancreas is a congenital anomaly that can occur in any part of the digestive tract, especially in the gastrointestinal tract. Here, we report a case of concomitant gastric and duodenal ulcers with jejunal pancreatic heterotopia. Jejunal pancreatic heterotopia was unexpectedly diagnosed during a surgery for concomitant gastric and duodenal ulcers, suggesting that heterotopic pancreas is easily missed and should attract clinical attention.

**Key Words:** Concomitant gastric and duodenal ulcers; Heterotopic pancreas; Jejunum

Zhao XW, Wang S, Tao SJ, Su ZW, Liu JB. Concomitant gastric and duodenal ulcers with jejunal pancreatic heterotopia: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3472-3473

### 摘要

异位胰腺是一种先天性疾病, 可以发生在消化系的任何部位, 以胃肠道最多见。胃十二指肠复合型溃疡患者术中探查发现空肠异位胰腺,

提示异位胰腺容易漏诊, 应引起临床上的重视。

**关键词:** 胃十二指肠复合型溃疡; 异位胰腺; 空肠

赵兴文, 王胜, 陶守军, 苏传伟, 刘建斌. 胃十二指肠复合型溃疡合并空肠异位胰腺1例. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3472-3473  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3472.asp>

### 0 引言

异位胰腺临床上比较少见, 发病部位广、临床表现多样, 常易误诊和漏诊。我院收治胃十二指肠复合型溃疡合并空肠异位胰腺1例, 现报告如下。

### 1 病例报告

男, 36岁, 因“上腹部阵发性疼痛伴呕血黑便3 h”入院, 查体: T 36.1℃, P 124次/min, R 22次/min, BP 110/70 mmHg。入院后给予止血、抗酸、输血输液等治疗, 1 h后, 患者反复呕血、便血4次, 总量约3000 mL, 血压下降80/40 mmHg, 面容苍白, 额头冷汗, 皮肤湿冷, 急诊胃镜不能检查。急诊剖腹探查, 术中胃镜, 经胃部切口进镜, 见腔内较多鲜红色血, 胃窦小弯侧见一约1.0 cm × 0.8 cm, 溃疡面出血(图1A), 十二指肠球部变形, 腔内有新鲜积血, 局部黏膜有渗血(图1B), 内镜诊断: 复合型溃疡并出血, 探查空肠, 距Treitz韧带50 cm处肠壁肿物约3 cm × 5 cm(图2), 可疑出血, 术中诊断: 胃十二指肠复合型溃疡并出血, 空肠肿瘤, 行胃大部切除, 空肠肿瘤切除。术后给予抗炎, 营养支持治疗, 无并发症, 15 d痊愈出院。术后病理诊断: 胃慢性糜烂性胃炎, 有淋巴滤泡形成, 局部见慢性溃疡, 空肠胰腺组织异位黏膜层, 黏膜下层及肌层浆膜层可见胰腺组织。

### 2 讨论

异位胰腺指位于正常解剖部位以外, 与胰腺本身无解剖联系或共同的血管供应的胰腺组织, 又称迷走胰腺(aberrant pancreas), 其发生机制尚不清楚, 可能与胚胎期胰腺组织的异常迁徙有关。1927年Jean-Schultz首次报告本病<sup>[1]</sup>。李新

**同行评议者**  
张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科



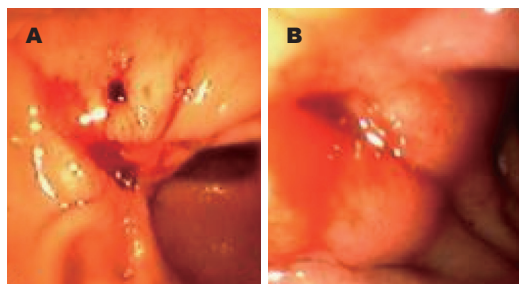


图 1 患者术中胃镜检查. A: 胃溃疡出血; B: 十二指肠球部出血.



图 2 空肠异位胰腺.

**同行评价**  
本文报道了胃十二指肠复合型溃疡合并空肠异位胰腺, 这一罕见病例, 具有较好的临床参考价值.

*et al*<sup>[2]</sup>总结分析异位胰腺可发生于腹腔或胸腔内, 主要在腹腔器官: 十二指肠占27.7%, 胃占25.5%, 空肠占15%, 回肠仅占7.5%, 少数见于大网膜、肠系膜、肝、胆、脾等周围组织. 国内则以空肠多见. *Biswas et al*<sup>[3]</sup>对空肠异位胰腺统计分析得出: 大多为单发, 少见多发; 位于黏膜下层者占50%-60%、肌层占25%、浆膜下占4%, 少数可侵及全层. 异位胰腺在临床上很少见, 且临床表现不一, 而以引起消化系出血最为多见, 这可能与异位胰腺压迫或分泌各种消化酶有很大关系<sup>[4]</sup>. 异位胰腺引起消化系出血时很容易被误诊为其他消化系出血性疾病, 特别是合并其他消化系出血性疾病时往往被漏诊. 由于异位胰腺无特异性的临床表现, 这加大了诊断难度, 目前所报道的大多是在剖腹探查术中被发现的. 据郭礼镒 *et al*<sup>[5]</sup>统计148例异位胰腺中, 140多例是在术中发现. 本例就是在消化系大出血急诊剖腹探查术中发现. 异位胰腺虽然临床表现很不一致, 但形态学上有相似之处: 具有正常胰腺组织特性, 色泽由淡黄色至腊白, 表面有分叶状小结节, 质地中等有韧性等; 大多直径在1.0-2.0 cm范围, 形态多为不规则椭圆形等.

大多异位胰腺具有胰腺内、外分泌功能. 异位胰腺可并发急慢性胰腺炎、出血、囊肿、甚至癌变, 且胃肠道异位胰腺还可引起胃肠道溃疡、出血或梗阻, 特别是位于壶腹附近的异位胰腺则可引起胆道梗阻等. 因此, 术中发现的异位胰腺都应手术治疗, 但要注意与恶性肿瘤相区别, 必要时应作术中冰冻切片, 以免盲目扩大切除范围带来不良后果及并发症. 本例异位胰腺侵及空肠壁全层且引起空肠溃疡、出血合并胃十二指肠复合型溃疡出血, 进一般加大了术前诊断的难度. 本例是我院第1例, 使我们对消化系大出血诊治有了新的认识.

### 3 参考文献

- 1 施勇, 钱金岳, 陈吴兴. 异位胰腺的临床研究进展. 肝胆胰外科杂志 2004; 16: 31
- 2 外科学分册 1997; 24: 91-93
- 3 Biswas A, Husain EA, Feakins RM, Abraham AT. Heterotopic pancreas mimicking cholangiocarcinoma. Case report and literature review. *JOP* 2007; 8: 28-34
- 4 方茂勇, 吕成余, 李永翔. 小肠异位胰腺致消化道出血5例诊治体会. 中国实用外科杂志 1996; 16: 375
- 5 郭礼镒, 姚育修. 异位胰腺 - 附202例分析. 临床医学 1990; 10: 57-59

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (科学编辑: 李军亮 2009-11-28)

## 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!

陈建杰 主任医师

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

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

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

杜雅菊 主任医师

哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜慧卿 教授

河北医科大学第二医院消化科

李涛 副主任医师

北京大学人民医院肝胆外科

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

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

钱林学 教授

首都医科大学附属北京友谊医院消化内科

沈柏用 副教授

上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

邵升 副教授

哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

唐世刚 教授

大连大学附属中山医院消化内科

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

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

吴健雄 教授

中国医学科学院中国协和医科大肿瘤医院腹部外科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

宣世英 教授

山东省青岛市市立医院肝病内科

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

张筱茵 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心