

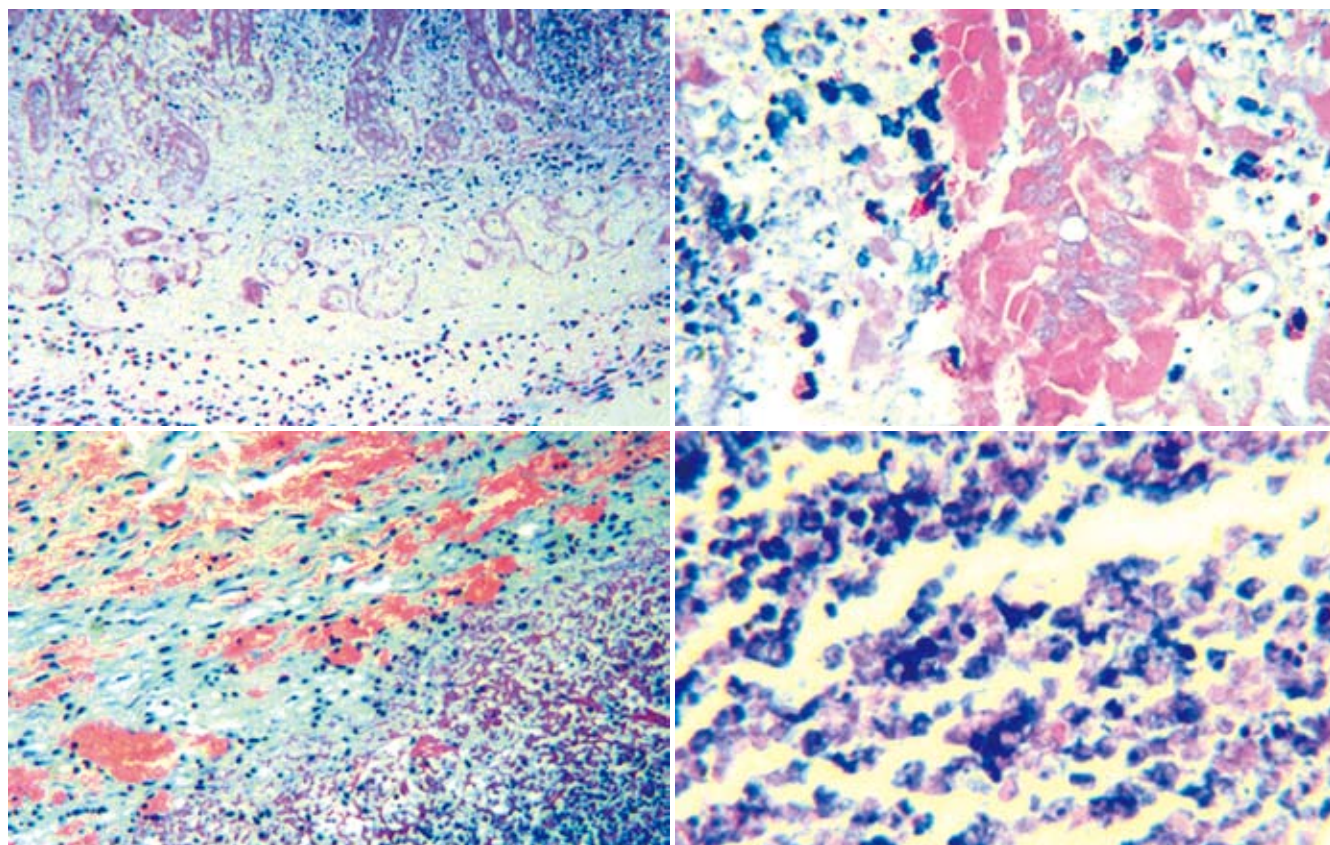
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年4月28日 第18卷 第12期 (Volume 18 Number 12)



12 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊,是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

www.wjgnet.com

二零一零年四月二十八日

第十八卷

第十二期

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂黎明教授
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
郝建宇教授
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
刘冰焯教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授

马红主任医师
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
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈任珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员

李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授

周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年4月28日 第18卷 第12期 (总第308期)

述 评	1191 胆固醇结石病的发生机制 蒋兆彦, 韩天权, 张圣道
基础研究	1196 凋亡抑制蛋白Livin在胃癌及癌旁组织中的表达 侯毅鞠, 李艳, 袁忠海, 郭素红 1201 刺参糖胺聚糖对HBV转基因小鼠肝组织HBV相关抗原表达的影响 周丽, 辛永宁, 罗兵, 宣世英 1206 MMP-2和ICAM-1在裸鼠体内塞来昔布抑制肝癌组织中的表达 殷积彬, 李宝馨, 谢新玉, 刘冰熔, 吕志武, 关景明, 高善玲 1211 高糖对体外培养的Cajal间质细胞P2X ₇ 嘌呤能受体表达的影响 高显奎, 余跃, 杨琰, 陈军, 王巧民
临床研究	1217 食管鳞癌clusterin表达及其临床意义 宋振梅, 孙玉琳, 毛友生, 刘芳, 周兰萍, 赵晓航 1222 Wnt-5a基因在胃癌中的表达及意义 刘晓红, 曹智新, 耿明, 曹永成, 王义, 辛莹, 王翠翠, 毕利泉 1227 PUMA基因在胃癌组织及细胞中的表达 陈鑫, 张允历, 乌慧玲, 孔梅, 邵长江, 宋永站 1232 MAL基因在胃癌组织中的甲基化及其mRNA的表达 林若阳, 沈萍萍, 黄智铭, 郑建建, 王良兴 1237 大肠癌潜在标志物-热休克蛋白27 刘伟杰, 秦环龙, 马延磊, 彭佳远
文献综述	1244 肝硬化低钠血症与Vaptans 向慧玲 1250 晚期复杂性肝癌的临床处理 张怡安, 朱畴文 1255 应用跨种属肿瘤基因筛选策略探寻肿瘤关键分子 史俊林, 李瑗
研究快报	1261 顺铂结合CIK细胞对裸鼠人胃癌模型体内的抗肿瘤作用 孙利兵, 杨光
临床经验	1264 无痛胃肠镜与常规胃肠镜临床应用1 800例 叶芬, 王红玲, 郑国荣, 韩洁, 王一鸣, 黄星, 黄梅芳, 施先艳, 夏冰 1270 CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性的Meta分析 曹伟军, 张振玉, 岳巧艳 1275 APE1 D148E、PARP1 V762A、XRCC1 R399Q的多态性与结直肠癌的易感性 叶慈慈, 黄智铭, 周春燕 1280 直肠后囊肿23例 段小亮, 李晓霞, 李鑫

病例报告	1284 胃癌伴黑棘皮病1例 何立丽, 张培彤, 孙桂芝 1287 肝淀粉样变1例 郝礼森, 郭剑, 郑力博, 朱芳丽, 刘小娟, 张晓岚, 秦玉彩 1290 肝脏孤立性坏死结节2例 王红群, 吴正升
附 录	1294 《世界华人消化杂志》投稿须知 1299 2010年国内国际会议预告
志 谢	1300 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1195 《世界华人消化杂志》出版流程 1205 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 1216 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 1231 《世界华人消化杂志》栏目设置 1236 《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 1249 汤姆森-路透公布2008年 <i>WJG</i> 影响因子2.081 1260 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 1274 《世界华人消化杂志》计量单位标准 1279 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1283 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 1286 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1289 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 1293 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547
封面故事	Xu HM, Wang ZJ, Han JG, Ma HC, Zhao B, Zhao BC. Application of acellular dermal matrix for intestinal elongation in animal models. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(16): 2023-2027 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i16/2023.htm
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2010-04-28

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总 编 辑 马连生

编辑部主任 李军亮

期 刊 名 称 世界华人消化杂志

主 管 单 位 山西省科学技术厅

主 办 单 位 太原消化病研治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656

E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656

E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wjcd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2010年版版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每期56.00元 全年2016.00元

广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

April 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 12

EDITORIAL	1191 Pathogenesis of cholesterol gallstone disease <i>Jiang ZY, Han TQ, Zhang SD</i>
BASIC RESEARCH	1196 Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in gastric cancer and adjacent non-cancerous tissue <i>Hou YJ, Li Y, Yuan ZH, Guo SH</i> 1201 Effects of glycosaminoglycan extracted from <i>Stichopus japonicus</i> Selenka on the expression of HBV-associated antigens in the liver of HBV transgenic mice <i>Zhou L, Xin YN, Luo B, Xuan SY</i> 1206 Celecoxib inhibits the expression of MMP-2 and ICAM-1 in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice <i>Yin JB, Li BX, Xie XY, Liu BR, Lv ZW, Guan JM, Gao SL</i> 1211 High concentration of glucose enhances the expression of P2X ₇ purine receptor in interstitial cells of Cajal <i>in vitro</i> <i>Gao XK, Yu Y, Yang Y, Chen J, Wang QM</i>
CLINICAL RESEARCH	1217 Clinical significance of clusterin expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Song ZM, Sun YL, Mao YS, Liu F, Zhou LP, Zhao XH</i> 1222 Significance of Wnt-5a expression in gastric carcinoma <i>Liu XH, Cao ZX, Geng M, Cao YC, Wang Y, Xin X, Wang CC, Bi LQ</i> 1227 Expression of the PUMA gene in gastric cancer tissue and cell lines <i>Chen X, Zhang YL, Wu HL, Kong M, Shao CJ, Song YZ</i> 1232 MAL mRNA expression and DNA methylation in gastric cancer <i>Lin RY, Shen PP, Huang ZM, Zheng JJ, Wang LX</i> 1237 Heat shock protein 27: a potential biomarker for colorectal carcinoma <i>Liu WJ, Qin HL, Ma YL, Peng JY</i>
REVIEW	1244 Hyponatremia in cirrhosis and vaptans <i>Xiang HL</i> 1250 Management of advanced hepatocellular carcinoma <i>Zhang YA, Zhu CW</i> 1255 A cross-species strategy to screen crucial molecules in carcinogenesis <i>Shi JL, Li Y</i>
RAPID COMMUNICATION	1261 Antitumor effects of cisplatin and CIK cells against human gastric cancer in nude mice <i>Sun LB, Yang G</i>
CLINICAL PRACTICE	1264 Clinic application of painless gastroscopy versus conventional gastroscopy: an analysis of 1 800 cases <i>Ye F, Wang HL, Zheng GR, Han J, Wang YM, Huang X, Huang MF, Shi XY, Xia B</i> 1270 CDH1 C-160A promoter polymorphism and genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis <i>Cao WJ, Zhang ZY, Yue QY</i>

	1275 APE1 D148E, PARP1 V762A and XRCC1 R399Q polymorphisms and genetic susceptibility to colorectal cancer <i>Ye CC, Huang ZM, Zhou CY</i>
	1280 Diagnosis and treatment of retrorectal cyst: a report of 23 cases <i>Duan XL, Li XX, Li X</i>
CASE REPORT	1284 Gastric carcinoma with acanthosis nigricans: a report of one case <i>He LL, Zhang PT, Sun GZ</i>
	1287 Hepatic amyloidosis: a case report and literature review <i>Hao LS, Guo J, Zheng LB, Zhu FL, Liu XJ, Zhang XL, Qin YC</i>
	1290 Solitary necrotic nodule of the liver: a report of two cases and review of the literature <i>Wang HQ, Wu ZS</i>
APPENDIX	1294 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
	1299 Meeting events calendar in 2010
ACKNOWLEDGMENT	1300 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Xu HM, Wang ZJ, Han JG, Ma HC, Zhao B, Zhao BC.</i> Application of acellular dermal matrix for intestinal elongation in animal models. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 16(16): 2023-2027 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i16/2023.htm
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date April 28, 2010

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspa-
pers 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: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 Published by *WCJD*. All rights re-
served; 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, re-
cording, or otherwise without the prior per-
mission of *WCJD*. Authors are required to
grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal repre-
sent the viewpoints of the authors except
where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2010 by Editorial Department
of *World Chinese Journal of Digestology*

胆固醇结石病的发生机制

蒋兆彦, 韩天权, 张圣道

蒋兆彦, 韩天权, 张圣道, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所 上海市 200025
韩天权, 教授, 主要从事胆道胰腺疾病的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30672042, No. 30700310
上海市重点学科-外科学基金资助项目, No. S30204
作者贡献分布: 蒋兆彦与韩天权的贡献相等, 完成选题、文献检索、资料收集、课题研究与论文撰写, 张圣道负责研究方向与文章审核。
通讯作者: 韩天权, 教授, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科. digsurgrj@yahoo.com.cn
电话: 021-64373909
收稿日期: 2010-01-22 修回日期: 2010-04-10
接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-04-28

Pathogenesis of cholesterol gallstone disease

Zhao-Yan Jiang, Tian-Quan Han, Sheng-Dao Zhang

Zhao-Yan Jiang, Tian-Quan Han, Sheng-Dao Zhang, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China
Correspondence to: Professor Tian-Quan Han, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China. digsurgrj@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-22 Revised: 2010-04-10
Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-04-28

Abstract

Cholesterol gallstone disease is a common disorder with an incidence rate of about 10%. In recent years, the research on metabolic disorders involving the gut-liver axis and the relation between gallstone disease and metabolic syndrome is attracting more attention. This article focuses on the origin of biliary cholesterol, intestinal cholesterol absorption, regulation of gallbladder motility, cholesterol transporters and metabolic syndromes and their role in the pathogenesis of gallstone disease.

Key Words: Cholesterol gallstone disease; Liver, Small intestine; Gallbladder; Pathogenesis

Jiang ZY, Han TQ, Zhang SD. Pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1191-1195

摘要

胆石病是常见病, 患病率在10%左右。近期, 胆

固醇结石病与代谢综合征, 肠肝轴脂质代谢异常受到关注。本文论述胆固醇结石发病机制的研究领域中有关胆汁胆固醇的主要来源, 肠道吸收胆固醇, 胆囊运动的调节, 胆固醇的载体以及代谢综合征的进展, 并提出胆囊结石病基础研究的若干任务。

关键词: 胆固醇结石病; 肝脏; 小肠; 胆囊; 发病机制

蒋兆彦, 韩天权, 张圣道. 胆固醇结石病的发生机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1191-1195
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1191.asp>

0 引言

胆石病是全球常见病, 患病率在10%左右。胆囊胆固醇结石占胆石病的大多数, 是胆道疾病的主要类型^[1]。尽管有金标准的腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊结石和慢性胆囊炎, 然而国内外仍不断研究胆石病的发病机制, 这是由于该病存在高发病率和严重并发症。胆固醇结石病隶属于代谢综合征的范畴^[2,3], 肠肝轴(Gut-liver axis)脂质代谢异常作为结石发病机制的重要组成部分^[4,5]近期受到关注。以往的肠肝循环, 是胆汁酸从肝脏分泌, 胆囊储存, 继排入肠道, 在末端回肠重吸收, 最后经门静脉回流到肝脏的完整循环, 当前肠肝轴的概念扩大, 包括肝胆与小肠系统的脂质代谢。鉴于胆汁胆固醇过饱和是胆固醇结石形成的首要发病条件, 脂质代谢异常成为胆固醇结石病的基础。研究探索胆固醇代谢在肝脏、胆囊与小肠多个环节, 以及与代谢综合征的相关性, 对胆石发病机制的认识有重要意义。

1 胆汁胆固醇的主要来源

上海瑞金医院与瑞典Karolinska Institute合作探索胆囊结石患者肝脏胆固醇和胆汁酸代谢相关基因表达发现, 胆石症患者肝脏脂质代谢异常的特点表现为与脂质代谢相关基因^[6]的表达异常增高: 胆小管侧膜胆固醇转运蛋白-三磷酸腺苷结合盒(ATP binding cassette, ABC)G5/G8、调控其表达的核受体-肝脏X受体 α (liver X receptor

■背景资料

胆石病是常见病, 其发病率在我国呈逐年上升趋势。胆石病发生机制研究认为其发生与胆汁胆固醇过饱和有关, 胆囊动力功能障碍和胆汁成核异常则促进了胆石病发生。近年来的研究显示, 胆固醇代谢在肝脏、胆囊与小肠多个环节的变化, 以及与代谢综合征的相关性, 对认识胆石的发生机制有重要意义。

■同行评议者

王德盛, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

■相关报道

国内外对胆石发生机制的探索从研究胆石、胆汁以及胆囊开始,目前更侧重于整个肝胆肠胆固醇与胆汁酸的代谢异常及其调节。近年来,国内外关于肠肝轴途径中胆固醇转运蛋白的发现及调节功能的研究有了很大进展,为胆石病发生机制研究的进一步深入提供了方向。

α , *LXR* α)及肝脏高密度脂蛋白受体-B1型清道夫受体(scavenger receptor B type I, *SRB1*)。胆石症患者胆汁胆固醇主要来源于SRB1摄取血液高密度脂蛋白胆固醇进入肝脏,在核受体LXR α 转录调节增强作用下,胆固醇转运蛋白ABC*G5/G8*功能上调,将胆固醇大量转运入胆汁,使肝脏向胆汁分泌过多胆固醇。这三个基因的异常表达向我们揭示胆汁过饱和胆固醇来源的轮廓,成为胆石症发生的起源。

胆固醇结石患者不但有ABC*G5/G8*在肝脏表达增强的特点,而且多态性临床研究显示在ABC*G8*的Y54C和T400K两位点存在较强的连锁不平衡, T400K可能是男性胆石病的遗传标记位点。男性K400携带者的ABC*G8*基因表达增强,伴有低血清甘油三酯和低胆汁磷脂含量,是胆石病的易感基因位点^[7]。此外,胆石症患者还表现胆囊黏膜的ABC*G5/G8*表达升高,限制胆囊上皮吸收胆固醇,维持胆汁胆固醇过饱和状态^[8]。

Niemann-Pick C1样蛋白1(Niemann Pick C1 like 1, NPC1L1)是小肠吸收胆固醇的主要转运蛋白,在人类肝脏胆小管侧膜也有表达,并具有调节胆汁胆固醇含量的作用。我们的研究发现NPC1L1基因和蛋白表达在女性胆石症患者中明显降低,并与胆汁胆固醇相对含量以及胆固醇饱和指数呈负相关,这提示女性胆石症患者肝脏NPC1L1表达下调导致肝脏重吸收胆汁胆固醇减少,是引起胆汁胆固醇过饱和的又一因素。NPC1L1与转录调节因子-甾醇调节元件结合蛋白2(sterol regulatory element binding protein 2, *SREBP2*)基因表达呈正相关,提示NPC1L1的转录表达受到*SREBP2*的调控。通过构建NPC1L1启动子荧光素酶报告基因,染色质免疫沉淀和凝胶迟滞电泳等方法,在人肝细胞HuH7实验证实, NPC1L1基因主要受两个肝脏核受体-*SREBP2*和肝细胞核因子1 α 的转录调节^[9]。此外,女性肝脏胆固醇酯化酶-乙酰辅酶A胆固醇酯转移酶2(acyl Coenzyme A: cholesterol acyl transferase 2, ACAT2)活性低于男性,说明肝脏ACAT2活性存在性别差异,并与血清HDL呈负相关,成为女性较少发生冠心病的原因之一,但与胆石病不存在相关性^[10]。肝脏胆固醇代谢的合成、酯化、胆汁酸合成等过程中变化在胆石病机制中的意义尚有继续深入探讨的价值。

2 肠道吸收胆固醇增加

体内胆固醇主要来源于自身合成和食物吸收两

部分。机体20%-25%胆固醇由肝脏合成。以往研究多数显示胆石病患者肝脏胆固醇合成限速酶活性并不增加,表示胆汁胆固醇含量的增加不是来自于肝脏合成增多。近期研究显示胆石患者空肠黏膜NPC1L1基因表达显著增加,同时ACAT2基因表达也增加^[11]。胆石症患者的小肠胆固醇摄取和酯化增加,表示从肠道吸收胆固醇的来源增多,可能成为胆石发病的重要机制,同时提示,小肠是研究胆石症机制时需要考虑的重要器官。动物实验证实,药物ezetimibe抑制NPC1L1或者靶向阻断Acat2基因, Apo B48基因等均可以降低小肠胆固醇摄取而预防小鼠胆石的形成^[12,13]。

3 胆囊在胆石形成机制中的意义

尽管成石胆汁来源于肝脏,肠道也参与成石机制,然而胆囊是胆囊结石病的终末器官,是结石形成的病灶部位,并最终产生一系列结石的病变,其病理意义不言而喻。胆囊运动功能异常直接导致结石形成已有临床和动物研究的多方面依据。胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)作为调节胆囊运动的重要胃肠道激素,主要参与餐后胆囊收缩与排空。体内、体外研究显示胆石患者的胆囊CCK受体数目减少、受体表达降低以及信号传导减弱^[14,15]。纤维母细胞生长因子19(fibroblast growth factor 19, FGF19)是新近发现的调节胆囊舒张的因子^[4,16]。小鼠实验显示末端回肠分泌FGF15(在人体是FGF19)的作用是使胆囊充盈。当前对胆囊运动调节过程的认识概括为:(1)空腹移行运动复合波的II期末分泌胃动素,维持胆囊较弱的收缩;(2)餐后分泌CCK,导致胆囊强烈收缩,使胆汁酸进入十二指肠和小肠,直接溶解、消化吸收胆固醇、脂肪以及脂溶性维生素;(3)当胆汁酸到达末端回肠时,通过Farnesoid X受体介导产生和分泌FGF19,作为胆囊再充盈的信号传导,为进餐前作准备。因此,CCK和FGF19都参与胆囊的运动调节,在胆石形成的动力机制中占有突出地位。Choi等通过小鼠*Fgf15*基因敲除、胆囊的体内外实验、CCK与FGF19/FGF15的不同作用等系列精细研究证实了胆囊充盈的激素调节现象^[16],为从胆囊动力角度研究胆石发病机制提供了详实资料。我们检测发现,除回肠末端外,人体胆囊黏膜FGF19 mRNA表达水平也较高,可能通过旁分泌作用直接调节胆囊的充盈,或者也参与了对肝脏胆汁酸合成的调节作用。肝胆系统与胃肠道(特别是

胆囊的空腹与餐后运动)的协调功能调节在预防过量胆固醇结晶沉淀于胆囊内起到特殊的作用. 胆囊自身还参与胆汁脂类的吸收, 具有一系列的生理功能和病理机制. 在当前国内保留胆囊治疗胆囊结石的研究中, 胆囊功能尤其具有不可或缺的地位^[17].

4 胆固醇转运的载体

胆固醇结石的主要成分-胆固醇溶于脂类物质, 其非水溶性的特点构成了胆石形成机制中的重要基础, 为研究的焦点之一. 胆固醇在胃肠道与肝胆系统的流动和代谢需要载体. SRB1是细胞膜上高密度脂蛋白受体^[18], 同时位于小肠刷状缘膜的囊泡上^[19], 具有高胆固醇亲和力特性, 为肝脏摄取血浆胆固醇的重要受体, 并参与了小肠胆固醇吸收, 其对胆囊转运胆固醇的可能性也正在受到关注. 另一重要载体-NPC1L1发现于2000年^[20], 在小鼠仅表达于小肠与胆囊, 而在人体肝脏也有大量NPC1L1表达^[21]. 虽然还未确定其与胆石病的关系, 但理论上可以推测, 失去肝脏NPC1L1的功能降低对胆汁胆固醇的重吸收, 可能对胆汁胆固醇含量增加具有促进作用. Ezetimibe通过抑制小肠NPC1L1, 减少小肠胆固醇吸收能降低高胆固醇血症患者血浆胆固醇含量^[22]. 在转运胆固醇的载体中, ABC转运器的作用十分重要, 现已明确其定位于质膜和细胞内膜, 依赖能量转运胆固醇通过生物膜. 异二聚体ABCG5/G8负责肝细胞胆小管侧膜分泌胆固醇进入胆汁, 同时也负责小肠细胞刷状缘将胆固醇分泌入肠腔^[23]. 通过增强胆汁分泌和限制肠道吸收, ABCG5/G8在增加胆固醇排出过程中起关键作用. ABC家族又一成员ABCA1与肝细胞和小肠细胞在基底膜侧向血浆分泌胆固醇有关, 对血浆前- β -HDL的形成具有重要作用^[24].

ABC转运器的表达受核受体的调节. 动物实验证明Lxrs激动剂使小鼠腹腔巨噬细胞*Abca1*表达升高, 增强胆固醇逆转运; 并提高肝脏*Abcg5*、*Abcg8*表达, 导致胆汁胆固醇含量升高, 具有促成石作用^[25]. *Lxr*基因敲除动物实验进一步证实, 胆固醇饲料无法通过激活Lxr α 上调*Abcg5/Abcg8*基因并向胆汁分泌或上调*Cyp7a1*转化为胆汁酸, 过多的胆固醇则经Acat2酶转化为胆固醇酯积蓄在肝脏. 同时体外实验也得到相应的结果: 采用LXR α 的RNA干扰和LXR α 激动剂T0901317的细胞实验都显示LXR α 调节人类肝细胞*ABCG8*、*ABCA1*、*ABCG1*、*SRBI*等

基因的表达^[26].

5 胆固醇结石病与代谢综合征

1988年Reaven等在Banting报告中首次提出代谢综合征, 又称为胰岛素抵抗综合征, 即靶器官与组织对胰岛素作用不敏感^[27]. 胆固醇结石随年龄而发病增加以及女性、肥胖多发的特点、胆石病与肥胖之间的关系反映与代谢综合征的相关性. 代谢综合征主要表现为向心性肥胖, 糖耐量异常或糖尿病, 高血压病、血脂增高、心血管病危险性增加. 胰岛素抵抗患者常发展为2型糖尿病, 后者的胆石发病率增加2-3倍^[2]. Méndez-Sánchez等^[28]研究显示在胆石病患者合并代谢综合征的比例是对照组的2倍左右. Tsai等^[29]则发现, 在胆石患者腰围和腰围-臀围比例均明显增高, 且该两项指标对胆石病的发生危险度具有预测作用. 我们的研究也显示^[30,31], 采用空腹血清胰岛素, 血清胆固醇含量, 高血压等代谢综合征相关的指标对胆石病高危人群具有一定的预测作用. Biddinger等通过基因敲除技术除去肝细胞的胰岛素受体, 构建小鼠LIRKO模型, 模拟胰岛素抵抗的代谢综合征^[3]. 实验证明, 肝脏对胰岛素抵抗的病理状态通过增加肝细胞胆小管侧膜*Abcg5/g8*表达增加对胆汁胆固醇的分泌, 直接促进胆固醇结石的形成, 该研究为代谢综合征增加胆固醇结石发生危险性的分子生物学机制提供了实验依据^[3].

6 结论

胆石病基础与临床研究^[32]的最终目的是造福于胆石患者. 当胆石病进展到症状期与并发症期, 有效的是采用腹腔镜胆囊切除或开腹胆囊切除术治疗, 而当胆石病处于无症状期或者成石前期, 则应采用非手术疗法或保留胆囊的治疗, 以及预防胆石病的发生. 目前胆石病研究的首要任务是了解中国胆石病的发病现状, 因为距离1992年第二次全国胆石病临床调查已近20年, 且我国局部地区人群的胆石病发病率研究也在20世纪80-90年代, 尚缺乏全国范围的流行病学研究^[33]. 其次, 尽管保留胆囊治疗胆石病的热情很高, 但需要科学的大样本前瞻性研究, 制定手术适应证以及长期的随访计划. 邹一平等400多例保胆取石术的5年与10年复发率分别为37.6%与43.2%^[34], 具有很好的代表性, 保胆手术后适当的药物预防, 如statin抑制胆固醇合成^[35]和ezetimibe抑制肠道胆固醇摄取^[36], 或可进一步

■应用要点

调控肠肝轴胆固醇代谢, 降低小肠胆固醇摄取, 调节胆汁胆固醇含量, 将是实现胆石病预防研究的新策略.

■同行评价

本文介绍了胆汁胆固醇来源、吸收和转运以及代谢综合征在胆固醇结石发病机制中的作用,从分子水平阐述了胆固醇结石的易发因素,内容详实可靠,基本概括了近年来有关此方面研究的最新进展。

降低复发率。降低保胆治疗后复发的措施完全是建立在胆石发病机制研究结果的基础上。最后,如何将预测胆石病危险人群的研究过渡到胆石病的预防已提到议事日程^[1]。这些工作都摆在胆石研究者的面前。胆石病研究,已经初现端倪,但任重而道远。

7 参考文献

- 1 韩天权, 蒋兆彦, 张圣道. 胆固醇结石形成机制的基因研究现状与展望. *外科理论与实践* 2009; 14: 125-127
- 2 Kuipers F, Groen AK. Chipping away at gallstones. *Nat Med* 2008; 14: 715-716
- 3 Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, Unterman TG, Carey MC, Kahn CR. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med* 2008; 14: 778-782
- 4 Portincasa P, Di Ciaula A, Wang HH, Palasciano G, van Erpecum KJ, Moschetta A, Wang DQ. Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. *Hepatology* 2008; 47: 2112-2126
- 5 Wang DQ, Cohen DE, Carey MC. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S406-S411
- 6 Jiang ZY, Parini P, Eggertsen G, Davis MA, Hu H, Suo GJ, Zhang SD, Rudel LL, Han TQ, Einarsson C. Increased expression of LXR alpha, ABCG5, ABCG8, and SR-BI in the liver from normolipidemic, nonobese Chinese gallstone patients. *J Lipid Res* 2008; 49: 464-472
- 7 Wang Y, Jiang ZY, Fei J, Xin L, Cai Q, Jiang ZH, Zhu ZG, Han TQ, Zhang SD. ATP binding cassette G8 T400K polymorphism may affect the risk of gallstone disease among Chinese males. *Clin Chim Acta* 2007; 384: 80-85
- 8 王勇, 韩天权, 费健, 蒋兆彦, 蔡劬, 姜志宏, 张圣道. 胆囊黏膜ABCG5和ABCG8基因在胆固醇结石病中的作用. *中华实验外科杂志* 2007; 24: 51-52
- 9 Pramfalk C, Jiang ZY, Cai Q, Hu H, Zhang SD, Han TQ, Eriksson M, Parini P. HNF1alpha and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver. *J Lipid Res* 2009 Dec 21. [Epub ahead of print]
- 10 Parini P, Jiang ZY, Einarsson C, Eggertsen G, Zhang SD, Rudel LL, Han TQ, Eriksson M. ACAT2 and human hepatic cholesterol metabolism: identification of important gender-related differences in normolipidemic, non-obese Chinese patients. *Atherosclerosis* 2009; 207: 266-271
- 11 Jiang ZY, Jiang CY, Wang L, Wang JC, Zhang SD, Einarsson C, Eriksson M, Han TQ, Parini P, Eggertsen G. Increased NPC1L1 and ACAT2 expression in the jejunal mucosa from Chinese gallstone patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 49-54
- 12 Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese RV Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 1341-1347
- 13 Wang HH, Wang DQ. Reduced susceptibility to cholesterol gallstone formation in mice that do not produce apolipoprotein B48 in the intestine. *Hepatology* 2005; 42: 894-904
- 14 Maselli MA, Piepoli AL, Pezzolla F, Guerra V, Caruso ML, Mennuni L, Lorusso D, Makovec

- F. Effect of three nonpeptide cholecystokinin antagonists on human isolated gallbladder. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2773-2778
- 15 Zhu J, Han TQ, Chen S, Jiang Y, Zhang SD. Gallbladder motor function, plasma cholecystokinin and cholecystokinin receptor of gallbladder in cholesterol stone patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1685-1689
- 16 Choi M, Moschetta A, Bookout AL, Peng L, Umetani M, Holmstrom SR, Suino-Powell K, Xu HE, Richardson JA, Gerard RD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat Med* 2006; 12: 1253-1255
- 17 韩天权, 张圣道. 保胆取石术后胆石的复发及预防. *中华肝胆外科杂志* 2009; 15: 4-5
- 18 Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518-520
- 19 Labonté ED, Howles PN, Granholm NA, Rojas JC, Davies JP, Ioannou YA, Hui DY. Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1132-1139
- 20 Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics* 2000; 65: 137-145
- 21 Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201-1204
- 22 Spener F. Ezetimibe in search of receptor(s)--still a never-ending challenge in cholesterol absorption and transport. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1113-1116
- 23 Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002; 110: 671-680
- 24 Lee J, Shirk A, Oram JF, Lee SP, Kuver R. Polarized cholesterol and phospholipid efflux in cultured gallbladder epithelial cells: evidence for an ABCA1-mediated pathway. *Biochem J* 2002; 364: 475-484
- 25 姜翀弋, 韩天权, 蒋兆彦, 蔡劬, 吴卫泽, 张圣道. 肝脏X受体对小鼠胆汁脂质成分与胆固醇代谢基因表达的影响. *中华实验外科杂志* 2007; 24: 1457-1459
- 26 王蕾, 蔡劬, 蒋兆彦, 施敏敏, 崔巍, 韩天权, 袁耀宗, 吴卫泽, 张圣道. 肝脏X受体 α 对肝细胞HepG2胆固醇代谢基因表达的调控. *内科理论与实践* 2010; 5: 165-169
- 27 Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
- 28 Méndez-Sánchez N, Chavez-Tapia NC, Motola-Kuba D, Sanchez-Lara K, Ponciano-Rodríguez G, Baptista H, Ramos MH, Uribe M. Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1653-1657
- 29 Tsai CJ, Leitzmann MF, Willett WC, Giovannucci EL. Prospective study of abdominal adiposity and gallstone disease in US men. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 38-44
- 30 陈胜, 张圣道, 蒋兆彦, 韩天权, 朱全梅, 沈树权, 何小伟, 黄桂余, 顾建平, 乙芳. 胆固醇结石病高危人群预测的进一步研究. *中华医学杂志* 2001; 81: 1010-1011
- 31 蒋兆彦, 韩天权, 陈胜, 乙芳, 姜志宏, 商俊, 蔡杏兴, 张

- 圣道, 顾建平, 黄桂余. 胆囊结石病高危人群预测结果的随访研究和预测准确性评判. 消化外科 2002; 1: 400-403
- 32 韩天权, 崔巍, 张圣道. 胆石形成机制基础与临床研究. 中国实用外科杂志 2009; 29: 599-601
- 33 韩天权, 张圣道. 胆石病流行病学研究的现状和发展. 胃肠病学 2003; 8: 166-168
- 34 邹一平, 萧荫祺. 保胆取石术有关问题的探讨. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 1-3
- 35 Bodmer M, Brauchli YB, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Statin use and risk of gallstone disease followed by cholecystectomy. *JAMA* 2009; 302: 2001-2007
- 36 Wang HH, Portincasa P, Mendez-Sanchez N, Uribe M, Wang DQ. Effect of ezetimibe on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 2008; 134: 2101-2110

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

凋亡抑制蛋白Livin在胃癌及癌旁组织中的表达

侯毅鞠, 李艳, 袁忠海, 郭素红

■背景资料

近年大量文献报道凋亡抑制基因Livin在多种肿瘤组织中高表达, 可以作为肿瘤早期诊断和判断预后的新指标。但通过图像分析系统定量检测胃癌组织、癌旁组织中Livin蛋白表达的量, 并对其在胃癌诊断和预后评估中的意义做出评价分析的报道尚较少见。

侯毅鞠, 李艳, 袁忠海, 郭素红, 吉林医药学院临床检验系 吉林省吉林市 132013

侯毅鞠, 2004年第四军医大学硕士, 讲师, 主要从事肿瘤基因诊断相关研究。

吉林省教育厅“十一五”基金资助项目, No. 2008405

作者贡献分布: 此课题由侯毅鞠与李艳设计; 研究过程由侯毅鞠与郭素红操作完成; 数据分析由袁忠海完成; 论文写作由侯毅鞠与袁忠海完成。

通讯作者: 侯毅鞠, 132013, 吉林省吉林市, 吉林医药学院检验系, houyiju@163.com

电话: 0432-64560538

收稿日期: 2010-01-20 修回日期: 2010-04-06

接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-04-28

Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in gastric cancer and adjacent non-cancerous tissue

Yi-Ju Hou, Yan Li, Zhong-Hai Yuan, Su-Hong Guo

Yi-Ju Hou, Yan Li, Zhong-Hai Yuan, Su-Hong Guo, Department of Clinical Laboratory, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China

Supported by: the Foundation of the Department of Education of Jilin Province during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008405

Correspondence to: Yi-Ju Hou, Department of Clinical Laboratory, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China. houyiju@163.com

Received: 2010-01-20 Revised: 2010-04-06

Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To detect the expression of Livin protein in gastric cancer and adjacent non-cancerous tissue, and to analyze its prognostic significance by exploring the relationship between Livin expression and the biological behavior of gastric cancer.

METHODS: The expression of Livin was detected by immunohistochemistry (streptavidin-peroxidase method) in 50 gastric cancer and matched adjacent non-cancerous tissue samples. Quantitative analysis of Livin expression was performed with the Image-Pro Plus 6.0 software. The significance of Livin expression in gastric cancer was then analyzed.

RESULTS: The integrated absorbance (IA) value

of Livin staining in gastric cancer tissue was significantly higher than that in adjacent non-cancerous tissue ($283\ 270.55 \pm 199\ 604.16$ vs $6\ 878.08 \pm 9\ 214.56$, $P < 0.01$). The IA value was lower in well and moderately differentiated cancer tissue than in poorly and undifferentiated tissue ($41\ 288.94 \pm 27\ 891.09$ vs $359\ 690.5 \pm 166\ 583.17$, $P < 0.01$), in cancer tissue not invading the serosal layer than in that invading the serosal layer (T_{3-4}) ($85\ 529.62 \pm 115\ 287.42$ vs $360\ 174.77 \pm 170\ 507.09$, $P < 0.01$), and in gastric cancer without lymph node metastasis than in that with lymph node metastasis ($148\ 547.51 \pm 152\ 479.47$ vs $380\ 949.72 \pm 171\ 073.92$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Livin protein is highly expressed in gastric cancer. Livin expression is significantly associated with tumor differentiation, infiltration and lymph node metastasis in gastric cancer. Livin protein may be used as a prognostic marker for gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Livin; Diagnosis; Prognosis

Hou YJ, Li Y, Yuan ZH, Guo SH. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in gastric cancer and adjacent non-cancerous tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1196-1200

摘要

目的: 分析Livin蛋白在胃癌及癌旁组织中的表达, 并根据其与胃癌生物学行为之间的关系分析对胃癌预后评估的意义。

方法: 采用免疫组织化学SP法检测50例胃癌及癌旁组织中Livin蛋白, 以Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件定量分析其表达。并通过比较不同类型组织切片中表达量的差异, 分析其在胃癌中表达的意义。

结果: Livin蛋白在胃癌组织中表达显著高于癌旁组织(IA: $283\ 270.55 \pm 199\ 604.16$ vs $6\ 878.08 \pm 9\ 214.56$, $P < 0.01$)。不同类型癌组织中表达亦有显著差异, 高-中分化癌组织明显低于低-未分化($41\ 288.94 \pm 27\ 891.09$)。

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

vs 359 690.5±166 583.17, $P<0.01$); 浸润未达浆膜层(T₁₋₂)者显著低于达浆膜层(T₃₋₄)者(85 529.62±115 287.42 vs 360 174.77±170 507.09, $P<0.01$); 伴淋巴转移者显著高于无淋巴转移(380 949.72±171 073.92 vs 148 547.51±152 479.47, $P<0.01$).

结论: Livin蛋白高表达于胃癌组织, 在不同分化程度、浸润度以及有无淋巴转移组间的表达都有显著差异. Livin蛋白高度表达预示肿瘤有较高的侵袭性, 可用于判断胃癌预后.

关键词: 胃癌; Livin; 诊断; 预后

侯毅翔, 李艳, 袁忠海, 郭素红. 凋亡抑制蛋白Livin在胃癌及癌旁组织中的表达. 世界华人消化杂志. 2010; 18(12): 1196-1200
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1196.asp

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率在恶性肿瘤中排名居高. 胃癌的发生与胃黏膜上皮细胞和胃癌细胞的增殖与凋亡调控失衡有关. Livin是近年新发现的凋亡抑制基因, 特异性表达于人的胚胎组织以及大多数人类实体瘤组织^[1], 这种异常的表达与肿瘤的发生、发展、转移甚至于后相关^[2]. 本研究应用免疫组织化学法检测胃癌患者癌组织以及癌旁组织中Livin蛋白表达, 并对不同年龄、性别以及不同分化程度、浸润度淋巴转移情况的胃癌组织Livin表达进行比较, 综合分析评价Livin在胃癌诊断和预后评估中的应用意义.

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗人Livin多克隆抗体(浓度为1 g/L)购自北京博奥森生物技术有限公司. 免疫组织化学试剂盒SP-9001、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥技术有限公司. Leica EG1150C包埋机、Leica RM2245切片机、Leica HI1210/1220展片/烤片机以及Image-Pro Plus 6.0软件图像定量分析处理系统.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 收集吉林医药学院附属医院2008-01/2009-09已经确诊为胃癌的癌组织及癌旁组织50例, 所有患者采集标本前均未接受化疗、放疗. 记录所有患者相关资料(性别、年龄、分化程度、浸润深度、淋巴结转移). 高-中分化组包括乳头状腺癌和管状腺癌, 低-未分化组包括低分化腺癌、未分化癌、印戒细胞癌和

黏液腺癌.

1.2.2 免疫组织化学染色: 标本离体后立即40 g/L甲醛内固定, 随后石蜡包埋制作切片. 组织切片置于0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液, 煮沸行抗原修复, SP免疫组织化学染色. 所用抗Livin抗体浓度为1:100. 染色步骤按说明书进行, DAB显色, 中止反应后苏木素复染, 脱水、透明、封片. 以已知的阳性切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.3 图像采集、半定量分析: 在高倍镜下, 对每张切片随机选择3个视野照相, 操作时所有照片在完全同样的显微镜条件下拍摄, 在拍照全过程中, 仅调整焦距和视野. 图像采集后, 以Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件对胃癌以及癌旁组织切片内Livin的表达量进行测量, 选取整合吸光度(IA)值进行半定量分析^[3].

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 数据统计分析采用 t 检验进行组间比较, 以 $P<0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 组织标本 50例胃癌患者中男性36例, 女性14例; ≥60岁者33例, <60岁者17例; 高-中分化腺癌组12例, 低-未分化腺癌组38例; 侵及黏膜、黏膜下或肌层(T₁₋₂)者14例; 侵及浆膜层和侵出浆膜层(T₃₋₄)者36例; 无淋巴结转移者21例, 有淋巴结转移者29例.

2.2 Livin蛋白在胃癌组织和癌旁组织中的表达 Livin蛋白表达主要定位于肿瘤细胞质, 光学显微镜下细胞质被染成淡黄至棕黄色的粗细不一的颗粒者即为阳性. 在50例胃癌组织中Livin蛋白大多呈阳性, 而癌旁组织中多数呈阴性(图1). 胃癌组织Livin表达阳性率显著高于癌旁组织(76% vs 12%, $P<0.01$). 应用Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件测定胃癌以及癌旁组织切片内Livin表达的IA值, 统计学分析Livin蛋白在两组之间的表达具有显著性差异(LA: 283 270.55±199 604.16 vs 6 878.08±9 214.56, $t = 16.94$, $P<0.01$).

2.3 Livin蛋白表达与胃癌临床生物学行为的关系 光学显微镜下低-未分化肿瘤细胞质所呈现的颜色大多较高-中分化组深(图2), IA在两组间有显著差异($P<0.01$); 按浸润程度分为T₁₋₂、T₃₋₄两组, 组间IA的差异具有统计学意义($P<0.01$); 在淋巴结转移组与无淋巴结转移组间也存在统计学差异($P<0.01$, 表1). 总之, 组织分化越差, 浸润程度越深, 并伴有淋巴结转移的组织, Livin蛋

■ 研发前沿

Livin在某些恶性肿瘤中异常表达, 这种肿瘤特异性表达使其成为近几年肿瘤诊断和基因治疗研究的新靶点. 近年有在浅表性膀胱癌、胃肠道肿瘤和肺癌等实体瘤组织和血清中检测出Livin和抗Livin抗体异常表达的研究报道, 认为Livin对评价某些肿瘤的预后具有一定价值.

■创新盘点

以往有关Livin蛋白表达的研究中,实验结果大多以标本阳性表达“率”为计量单位,本研究则是以I4作为单位进行客观定量分析,克服了阅片时主观误差,结果更为精确。

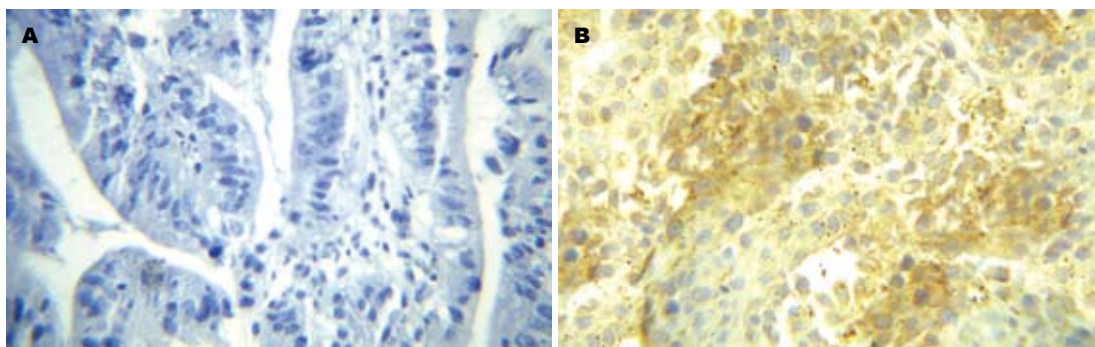


图 1 Livin蛋白在胃癌组织和癌旁组织中的表达($\times 400$). A: 癌旁组织; B: 胃癌组织.

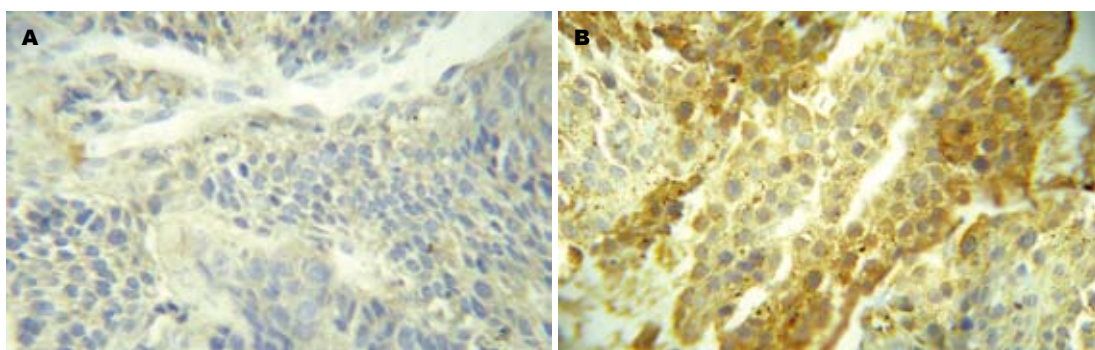


图 2 Livin蛋白在不同分化程度胃癌组织中的表达($\times 400$). A: 高-中分化癌组织; B: 低-未分化癌组织.

表 1 Livin蛋白表达I4与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	I4	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别						
男	36	30	83.3	290 555.74 \pm 189 742.65		
女	14	8	57.1	263 121.40 \pm 224 584.19	0.754	>0.05
年龄(岁)						
≥ 60	33	27	81.8	295 973.63 \pm 198 276.23		
<60	17	11	64.7	258 622.16 \pm 201 843.28	1.086	>0.05
组织分化度						
高-中分化	12	6	50.0	41 288.94 \pm 27 891.09		
低-未分化	38	32	84.2	359 690.50 \pm 166 583.17	11.390	<0.01
浸润度						
T ₁₋₂	14	7	50.0	85 529.62 \pm 115 287.42		
T ₃₋₄	36	31	86.1	360 174.77 \pm 170 507.09	9.609	<0.01
淋巴转移						
无	21	13	61.9	148 547.51 \pm 152 479.47		
有	29	25	86.2	380 949.72 \pm 171 073.92	8.591	<0.01

白的表达I4越高,这表明Livin的表达与患者的预后评估密切相关. Livin表达的I4在性别组间以及年龄组间无统计学差异($P>0.05$).

3 讨论

胃癌的发生和失控性生长是肿瘤细胞增殖和细胞凋亡两个过程共同作用的结果,细胞凋亡与

肿瘤的关系已受到普遍关注. 细胞凋亡是在基因的调控下进行的,目前认为存在三类与细胞凋亡相关的基因: 促细胞凋亡基因、抑制细胞凋亡基因、细胞凋亡过程中表达的基因,其中凋亡抑制基因是一类具有高度保守序列的基因,通过BIR结构域与caspase结合并抑制caspase活性,发挥抗细胞凋亡的作用^[4-6]. Livin是近年来

发现的人类凋亡抑制家族的新成员, 与其他成员一样, Livin在多数肿瘤中表达, 如肺癌、黑色素瘤、前列腺癌、膀胱癌、白血病以及淋巴瘤等, 尤其是消化系肿瘤的研究^[7-11], 食管癌、结肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌, 并且与其他凋亡相关基因之间关系的研究也已经开展^[12-14]. 实验证实Livin能够直接抑制caspase-3、caspase-7、caspase-9的酶水解作用^[15], 此外Livin的抗凋亡作用还受到线粒体释放的caspase活化蛋白(Smac)的调节, Smac为凋亡过程中胞质线粒体产生的内源性蛋白, 能结合并抑制IAPs, 因此有学者研究推测认为Livin主要是通过作为Smac的沉默子起作用^[16,17]. 所以, 目前关于Livin抑制剂作用的研究有可能基于Livin和SMAC的关系而不是Livin和caspases的关系^[18-20], Livin调节机制的研究可为Livin抑制剂的研究提供思路^[21]. 新近研究发现在肾癌, 胃肠道癌, 乳腺癌和肺癌患者的血清中有抗Livin抗体^[22-26], 这一研究结果表明Livin作为主要的肿瘤相关性抗原被MHC I型细胞提呈. 在此基础上Livin抗体的研究将成为肿瘤免疫治疗的新方向, 抗Livin抗体作为肿瘤疫苗注射, 使肿瘤细胞发生坏死, 达到肿瘤化疗或手术治疗使肿瘤缩小的目的. 目前以Livin作为促凋亡治疗靶点的研究也已开展^[27-29], 针对Livin基因序列设计的特异性小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和反义核酸序列, 在哺乳动物肿瘤细胞中阻断Livin mRNA表达, 从而增强了肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性^[30,31]. 还有研究认为Livin除肿瘤外, 还参与了血管性痴呆的发生发展, 表达水平与血管损伤修复有关^[32]. 众多研究资料均显示Livin表达与肿瘤的重要关系, 并且可能是肿瘤细胞免疫逃避的主要途径之一, 提示Livin在肿瘤细胞凋亡抵抗中所起着非常重要的作用, 是肿瘤发生、发展的重要因素.

本文对Livin蛋白在胃癌组织中以及癌旁组织中表达的情况进行相关检测, 揭示胃癌的发病机制, 探讨Livin蛋白检测在胃癌诊断中的作用, 并根据其与胃癌生物学行为之间的关系分析在胃癌预后评估的意义. 本实验结果显示, 胃癌黏膜组织Livin蛋白表达的IA明显高于癌旁黏膜组织, 提示Livin参与了胃癌的发生, 可作为一个新的标志物检测诊断胃癌. 但同时该项结果也表明, 用免疫组织化学方法检测Livin蛋白的表达, 如果只是单纯依据Livin蛋白表达与否, 作为对胃癌的诊断指标, 是欠妥的. 这是因为我们

在6例癌旁组织中检测到了Livin蛋白表达, 该结果的出现是由于在本研究中作为正常胃黏膜组织的癌旁组织并不是真正意义上的正常组织, 有可能存在增生、化生、炎症等. 所以我们认为在胃癌的诊断过程中, Livin蛋白的检测可以作为胃癌辅助诊断或验证诊断的指标. 在Livin蛋白表达与胃癌临床生物学行为的关系研究中, 我们得到的结论是: Livin蛋白表达的IA与胃癌患者的性别、年龄无关; 但在低-未分化组、T_{3,4}组、有淋巴结转移组表达的IA都明显高于高中分化组、T_{1,2}组、无淋巴结转移组. 此结果表明高表达Livin蛋白患者的胃癌恶性程度高, 易发生侵袭和转移, 患者预后差. 这是由于Livin蛋白高强度的表达造成肿瘤细胞凋亡受抑程度高, 并且凋亡受抑愈强烈, 预后愈差. 因此, Livin蛋白的检测对于判断胃癌患者的恶性程度、进展情况、预后具有重要的应用意义^[33,34], 对于进一步制定患者相应治疗方案也有指导意义.

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁生命健康. 到目前为止, 手术仍然是治疗胃癌的最佳方法, 而手术治疗效果很大程度上依赖于早期发现、早期诊断. 但实际胃癌往往起病隐匿, 早期常无明显症状. 因此, 探寻一种行之有效的早期发现肿瘤、判断预后的方法, 具有十分重要的临床意义. 所以, 在本研究的基础上, 如果能够针对胃黏膜轻度不典型增生、重度不典型增生、早期胃癌到胃癌一系列病变过程中, Livin蛋白表达进行进一步检测分析, 获得Livin蛋白在良性胃黏膜病变组织中的表达趋势, 有效预测胃癌癌前病变^[35], 将真正有助于胃癌的早期诊断和癌前诊断, 具有十分重要的临床意义. 总之, Livin较强的抑制凋亡能力以及其在恶性肿瘤细胞中的过表达使其成为一个热门研究目标, 虽然已经有大量的关于Livin与肿瘤研究的相关报道, 但伴随研究的进一步展开, 会发现有更多的、更加深入的问题有待我们去解决.

4 参考文献

- 1 Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 231-243
- 2 Wagener N, Crnković-Mertens I, Vetter C, Macher-Göppinger S, Bedke J, Gröne EF, Zentgraf H, Pritsch M, Hoppe-Seyler K, Buse S, Haferkamp A, Autschbach F, Hohenfellner M, Hoppe-Seyler F. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and non-tumorous adult kidney. *Br J Cancer* 2007; 97: 1271-1276
- 3 吕宏升, 朱庆生, 王军, 朱锦宇, 赵广跃, 张大伟. 全自

■应用要点

本研究有助于胃癌发病机制的阐明, 并能够为临床正确应用和评析Livin蛋白在肿瘤诊断和预后判定的意义提供更详尽充分的理论依据.

■同行评价

本研究具有一定新颖性,设计规范,有一定的说服力。

- 4 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- 5 吕建, 陈智超. Livin与肿瘤研究新进展. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 1347-1350
- 6 孙建国, 廖荣霞, 陈正堂, 王志新, 张青, 伍伟玲. 一种新的凋亡抑制蛋白Livin在非小细胞肺癌组织中的表达. *重庆医学* 2004; 33: 982-984
- 7 何群力, 苗立群, 赵国新, 孙翔, 王永玲, 张明智. 调控Livin基因表达对食管癌EC9706细胞生物学行为的影响. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 42: 623-625
- 8 何翦太, 李珍发, 张阳德, 邓丽萍, 王吉伟, 潘一峰. 凋亡抑制因子Livin在大肠癌中的表达意义. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 654-657
- 9 袁莹, 魏金荣, 冯晨, 宗志红, 关一夫. 凋亡抑制蛋白Livin在胃癌组织中的表达. *贵阳医学院学报* 2006; 31: 205-207
- 10 崔东旭, 魏晰麟, 刘宝林, 孙韶龙, 刘臻, 张小薄. 肝癌组织中Livin蛋白的表达及其与临床病理特征的关系. *中国普通外科杂志* 2008; 17: 711-713
- 11 杜媛, 冯一中, 李峰. Livin在胰腺癌组织芯片中的表达及其临床意义. *苏州大学学报(医学版)* 2008; 28: 244-246
- 12 杨春鹿, 黄青远, 赵君, 陈东义, 张林. Livin蛋白在食管癌中的表达及与p53蛋白相关性研究. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 632-634
- 13 程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌. 凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 850-855
- 14 王同杉, 游思洪, 葛红梅, 陈子庆, 丁小健, 刘平. 凋亡抑制蛋白livin在人胃癌中的表达以及和survivin表达的关系. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2006; 26: 39-43
- 15 Franklin MC, Kadkhodayan S, Ackerly H, Alexandru D, Distefano MD, Elliott LO, Flygare JA, Mausisa G, Okawa DC, Ong D, Vucic D, Deshayes K, Fairbrother WJ. Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Biochemistry* 2003; 42: 8223-8231
- 16 Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 2005; 385: 11-20
- 17 Yuan D, Liu L, Gu D. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 171-178
- 18 Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13: 2079-2088
- 19 Gaither A, Porter D, Yao Y, Borawski J, Yang G, Donovan J, Sage D, Slisz J, Tran M, Straub C, Ramsey T, Iourgenko V, Huang A, Chen Y, Schlegel R, Labow M, Fawell S, Sellers WR, Zawel L. A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cancer Res* 2007; 67: 11493-11498
- 20 赵毅, 邓鑫, 王强. Livin、Smac/DIABLO和PTEN在胃癌组织中的表达及其与胃癌的相关性. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1303-1311
- 21 Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 24-30
- 22 Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Hariu H, Asanuma H, Hirohashi Y, Sato E, Sato N, Tsukamoto T. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients. *Urology* 2007; 70: 38-42
- 23 Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208
- 24 Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 125-130
- 25 Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer* 2005; 48: 217-221
- 26 Andersen MH, Becker JC, Straten P. Identification of an HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope from ML-IAP. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1336-1337
- 27 韩高雄, 蔡明, 王国斌, 陶凯雄, 蔡昌学. Livin和Survivin基因联合靶向siRNA重组表达载体的构建和鉴定. *华中科技大学学报(医学版)* 2009; 38: 673-676
- 28 王琳琳, 郑洪, 唐薇薇, 厉国慧, 安文波. livin基因沉默对人恶性黑色素瘤A375细胞周期和凋亡的影响. *肿瘤* 2009; 29: 345-349
- 29 陈鹏, 王春松, 孔令斌, 杨景玉. siRNA沉默Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1346-1349
- 30 Crnković-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, Butz K. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells. *J Mol Med* 2006; 84: 232-240
- 31 Wang R, Lin F, Wang X, Gao P, Dong K, Zou AM, Cheng SY, Wei SH, Zhang HZ. Silencing Livin gene expression to inhibit proliferation and enhance chemosensitivity in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 2008; 15: 402-412
- 32 杨健, 蔡志友, 晏勇, 郭坪生, 叶燕, 唐秦. 血管性痴呆患者血清Livin、VEGF与MMP-9水平的临床意义. *重庆医学* 2009; 38: 1314-1318
- 33 Liu HB, Kong CZ, Zeng Y, Liu XK, Bi JB, Jiang YJ, Han S. Livin may serve as a marker for prognosis of bladder cancer relapse and a target of bladder cancer treatment. *Urol Oncol* 2009; 27: 277-283
- 34 Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR, Gu L, Zhou M, Soe MM, Sullivan K, George B, Schemankewitz E, Findley HW. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome. *Pediatr Dev Pathol* 2005; 8: 621-629
- 35 孙迪文, 陈启. Survivin在早期胃癌及癌前病变组织中的表达及其与PTEN表达的关系. *实用癌症杂志* 2008; 23: 28-30

编辑 李军亮 电编 何基才

刺参糖胺聚糖对HBV转基因小鼠肝组织HBV相关抗原表达的影响

周丽, 辛永宁, 罗兵, 宣世英

周丽, 青岛大学医学院传染病学教研室 山东省青岛市 266021
辛永宁, 宣世英, 青岛市市立医院消化内二科 山东省青岛市 266011
罗兵, 青岛大学医学院微生物学教研室 山东省青岛市 266021
周丽, 青岛大学医学院在读硕士, 研究方向为肝脏疾病.
山东省科技厅基金资助项目, No. 2006GG2205019
作者贡献分布: 本研究项目负责人为宣世英; 研究设计由周丽、辛永宁、罗兵及宣世英共同完成; 研究操作由周丽与罗兵完成; 数据分析及论文的撰写由周丽、辛永宁、罗兵及宣世英共同完成.
通讯作者: 宣世英, 教授, 266011, 山东省青岛市胶州路1号, 青岛市市立医院消化内二科. dxyxyn@163.com
电话: 0532-82789565 传真: 0532-82789302
收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-03-29
接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-04-28

Effects of glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka on the expression of HBV-associated antigens in the liver of HBV transgenic mice

Li Zhou, Yong-Ning Xin, Bing Luo, Shi-Ying Xuan

Li Zhou, Department of Lemology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Yong-Ning Xin, Shi-Ying Xuan, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Bing Luo, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Department of Shandong Province, No. 2006GG2205019

Correspondence to: Professor Shi-Ying Xuan, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, 1 Jiaozhou Road, Qingdao 266011, Shandong Province, China. dxyxyn@163.com

Received: 2010-02-02 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To study the potential anti-hepatitis B virus (HBV) effects of glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka (SJ-GAG) *in vivo*.

METHODS: Thirty HBV transgenic mice were divided into five groups: saline group, interferon (IFN) group, and low-, medium- and high-dose

SJ-GAG group, which were intraperitoneally injected with normal saline, IFN- α 2b (45 U/kg), and SJ-GAG (30, 40 and 50 mg/kg, respectively) once daily for 30 d, respectively. After treatment, all mice were killed to take liver samples for analysis of the expression of HBsAg and HBcAg by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to the saline group, the expression of HBsAg and HBcAg in the liver of HBV transgenic mice was dose-dependently inhibited in all the SJ-GAG groups (4.93 ± 1.43 , 3.57 ± 1.02 , 3.27 ± 0.64 vs 6.97 ± 0.75 ; 5.73 ± 1.62 , 4.27 ± 1.03 , 4.27 ± 1.03 vs 7.23 ± 0.53 ; $P < 0.01$ or 0.05). However, SJ-GAG has lower inhibitory effects on the expression of HBsAg and HbcAg than IFN ($P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: SJ-GAG has anti-HBV activity *in vivo*.

Key Words: *Stichopus japonicus* Selenka; Glycosaminoglycan; Mouse; Hepatitis B virus; HBsAg; HBcAg

Zhou L, Xin YN, Luo B, Xuan SY. Effects of glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka on the expression of HBV-associated antigens in the liver of HBV transgenic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1201-1205

摘要

目的: 研究刺参糖胺聚糖在动物活体内的抗HBV作用。

方法: 开放性动物实验。HBV转基因小鼠30只, 按性别随机分为生理盐水对照组(每天给予等容积的生理盐水)、刺参糖胺聚糖低(30 mg/kg)、中(40 mg/kg)、高(50 mg/kg)三个剂量组及干扰素(45 U/kg)对照组, 每组雌雄各半, 分笼饲养。给药方式为腹腔注射, 每日1次, 连续用药30 d。给药结束后处死小鼠, 剥离其肝脏组织。免疫组织化学染色法及综合评分法观察并半定量分析小鼠肝脏组织HBsAg, HBcAg的表达。

背景资料

乙型肝炎至今仍然是全世界所面临的一大公共卫生难题, 其具有难以治愈、易复发、传染性等特征。目前乙型肝炎的治疗关键是抗病毒治疗, 目前的抗病毒药物主要是干扰素和核苷类抗病毒药物, 但无论哪一种药物都不能彻底清除患者体内的病毒。所以抗HBV新药的研发仍然是目前研究的重点。

同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科; 高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

■ 研发前沿

刺参糖胺聚糖具有多种生物学活性, 目前对其在抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等方面的研究均较多。

结果: 与生理盐水对照组比较, 刺参糖胺聚糖低、中、高剂量对小鼠肝脏HBsAg, HBcAg的表达均有抑制作用(4.93 ± 1.43 , 3.57 ± 1.02 , 3.27 ± 0.64 vs 6.97 ± 0.75 ; 5.73 ± 1.62 , 4.27 ± 1.03 , 4.27 ± 1.03 vs 7.23 ± 0.53 , $P < 0.01$ 或 0.05), 但其抑制作用低于干扰素对照组($P < 0.01$ 或 0.05), 并呈现一定的量效反应关系。

结论: 刺参糖胺聚糖具有一定的体内抗HBV作用。

关键词: 刺参; 糖胺聚糖; 小鼠; 乙型肝炎病毒; HBsAg; HBcAg

周丽, 辛永宁, 罗兵, 宣世英. 刺参糖胺聚糖对HBV转基因小鼠肝组织HBV相关抗原表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1201-1205

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1201.asp>

0 引言

乙型病毒性肝炎是威胁人类健康的重大问题之一。据统计, 全球约有20亿人感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV), 约3.5亿人为HBV携带者, 每年约有100万人死于乙型肝炎相关疾病(肝硬化、肝衰竭、原发性肝癌等)^[1,2]。我国是HBV感染的高发区, 约有1.3亿人感染HBV^[3], 占我国总人口的9.09%, 所以乙型病毒性肝炎的防治是目前亟待解决的问题, 其中抗病毒药物的研发是工作的重点。刺参糖胺聚糖是从刺参体壁提取的一种硫酸多糖, 具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、提高免疫力等多种功能。目前对于刺参糖胺聚糖抗HBV的研究并不多, 我们采用乙型肝炎转基因小鼠作为动物模型, 研究了刺参糖胺聚糖的活体内抗HBV活性。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级Balb/c-HBV转基因小鼠, 周龄10 wk, 体质量18-22 g, 购自中国人民解放军第四五八医院全军肝病中心。刺参糖胺聚糖由中国海洋大学海洋药物与食品研究所提供。注射用重组人干扰素 α -2b(利分能), 由哈药集团生物工程有限公司生产, 产品批号为200803032。主要试剂及仪器: 鼠抗人-HBs, 兔抗人-HBc及SABC免疫组织化学试剂盒, 购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 药物的配制: 刺参糖胺聚糖为白色干燥粉末, 实验时用生理盐水配制所需浓度的溶液, 再经0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

表1 刺参糖胺聚糖对乙型肝炎转基因小鼠肝脏HBsAg和HBcAg表达的影响 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	HBsAg	HBcAg
生理盐水组	6.97 ± 0.75^b	7.23 ± 0.53^b
刺参糖胺聚糖		
低剂量组	4.93 ± 1.43^{bd}	5.73 ± 1.62^{bd}
中剂量组	3.57 ± 1.02^{bd}	4.27 ± 1.03^{bd}
高剂量组	3.27 ± 0.64^{bd}	4.27 ± 1.03^{bd}
干扰素组	1.50 ± 1.02	2.07 ± 1.11

^b $P < 0.01$ vs 干扰素组; ^d $P < 0.01$ vs 生理盐水组。

1.2.2 分组与给药: 30只乙型肝炎转基因小鼠, 雌雄各半, 随机分为5组, 每组雌雄各半, 分笼饲养, 分别为生理盐水对照组(每天给予等容积的生理盐水), 刺参糖胺聚糖低剂量组(30 mg/kg), 刺参糖胺聚糖中剂量组(40 mg/kg)^[4,5], 刺参糖胺聚糖高剂量组(50 mg/kg), 干扰素对照组(45 U/kg)。给药方式为腹腔注射^[6,7], 1次/日, 连续给药30 d。

1.2.3 检测项目及方法: 给药结束后脱颈处死小鼠, 剥离肝脏组织, 以100 g/L的中性甲醛液固定, 石蜡包埋, 切片, 采用SABC免疫组织化学染色法进行常规脱蜡、水化, 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶10 min, 依次滴加一抗、增强剂、生物素化山羊抗兔、DAB显色剂、苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片。显微镜下观察小鼠肝脏组织HBsAg, HBcAg的表达情况, 采用综合评分法进行免疫组织化学半定量分析: (1)每只小鼠肝组织高倍镜下随机计数5个视野, 计算阳性细胞百分比: $\leq 10\%$ 为0分, 11%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, $\geq 76\%$ 为4分。(2)阳性为棕色: 浅棕色为1分, 棕色为2分, 深棕色为3分, 不着色为0分。(3)上述两项指标的两积分相乘得到综合评分。

统计学处理 所有数据采用SPSS16.0统计软件进行单因素方差分析(LSD法), 进行组间两两比较。

2 结果

2.1 刺参糖胺聚糖对乙型肝炎转基因小鼠肝脏HBsAg表达的影响 与生理盐水组相比, 刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组对小鼠肝脏组织HBsAg的表达具有显著的抑制作用, 但是其抑制作用弱于干扰素对照组, 差异具有显著性。而且刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组随着药物浓度的增加对小鼠肝脏组织HBsAg表达的抑制作用也增强, 呈现一定的量效反应关系(表1)。免疫组织

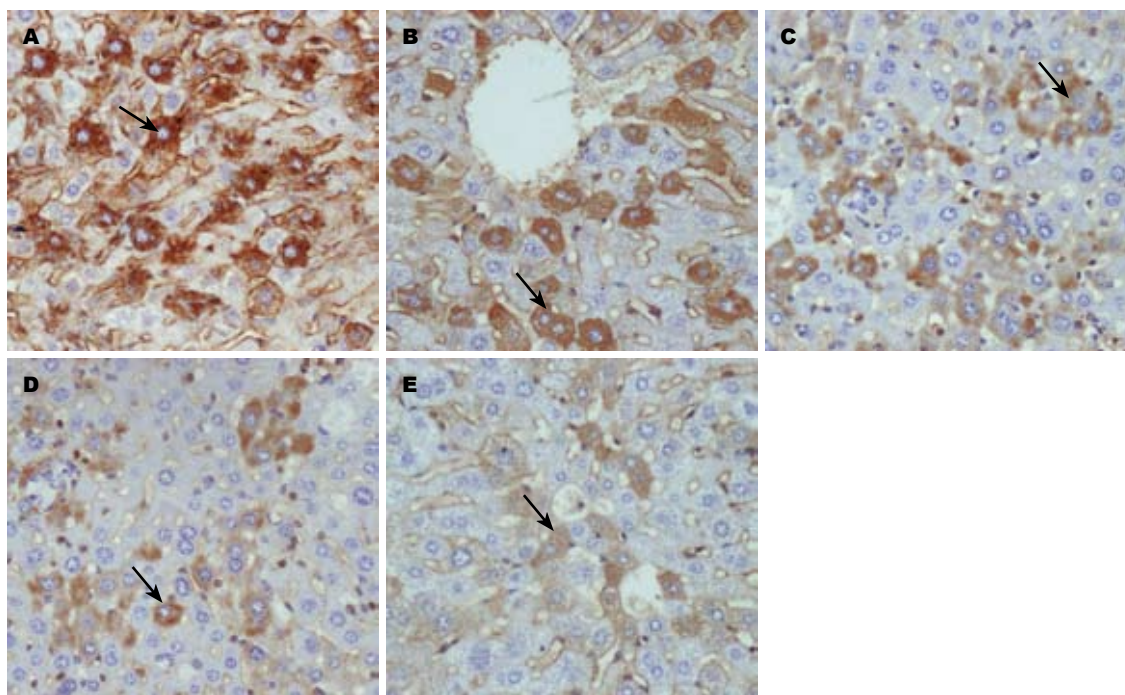


图 1 免疫组织化学法观察刺参糖胺聚糖对小鼠肝脏HBsAg表达的影响($\times 200$)。A: 生理盐水对照组; B: 刺参糖胺聚糖组(低剂量); C: 刺参糖胺聚糖组(中剂量); D: 刺参糖胺聚糖组(高剂量); E: 干扰素对照组。

■ 创新盘点

刺参糖胺聚糖具有多种生物学活性, 但是其抗HBV的研究目前并不多见, 本研究首次从抗HBV方面研究了其抗病毒活性, 从而为海洋抗病毒药物的研发提供了新思路。

化学染色如图1中箭头所示, 阳性细胞的胞质被染为棕褐色, 生理盐水对照组阳性细胞的染色数量及染色强度均高于其他组, 而且随着刺参糖胺聚糖药物浓度的增高, 刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组小鼠肝脏组织HBsAg的表达量依次相对减弱, 但与干扰素对照组比较仍然较强。

2.2 刺参糖胺聚糖对乙型肝炎转基因小鼠肝脏HBcAg表达的影响 刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组与生理盐水组相比, 其对乙型肝炎转基因小鼠肝脏组织HBcAg的表达均具有显著的抑制作用, 但这种抑制作用与干扰素组相比较弱, 差异具有显著性。刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组之间相比, 其对小鼠肝脏组织HBcAg表达的抑制作用也具有差异性, 并且随着浓度的增加其抑制作用明显增强, 呈现一定的量效反应关系(表1)。免疫组织化学染色结果如图2所示, 阳性细胞的胞核被染为棕褐色。与生理盐水对照组比较, 刺参糖胺聚糖低、中、高剂量组小鼠肝脏组织阳性细胞数量及染色强度均呈现一定程度的减弱, 但与干扰素对照组比较仍然较强。

3 讨论

乙型肝炎的治疗关键在于抗病毒治疗, 目前的抗HBV药物主要分为干扰素和核苷类药物^[8-11]。干扰素兼有抗病毒和免疫调节的功能, 但具有价格较贵, 不良反应大, 而且需皮下注射, 使用

不便等缺点^[8,12]。核苷类药物如拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦等, 其抗病毒机制主要是在人体内磷酸化成为三磷酸核苷类似物后, 抑制病毒DNA聚合酶和逆转录酶的活性, 并与核苷竞争性深入病毒DNA链, 终止DNA链的延长和合成^[6,9]。但这类药物疗程长, 长期用药易发生病毒变异, 产生耐药性, 而且存在交叉耐药^[11-13]。另外亦有非核苷类药物, 例如1, 3, 4-噁二唑类化合物, 以及二氢嘧啶类化合物等^[14,15], 可能也具有抗HBV的作用, 目前临床尚处于起步研究阶段。

刺参糖胺聚糖是一种硫酸化多糖, 旧称刺参酸性黏多糖或刺参粘多糖, 是从刺参体壁中提取的一种硫酸多糖, 系由D-N-乙酰氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸、L-岩藻糖和硫酸基组成, 是多糖大分子链中单糖分子上的某羟基被硫酸根所取代而形成的一类多功能生理活性物质^[12,16]。刺参糖胺聚糖在溶液中以离子形式存在, 具有与带正电的离子或成分(包括生物大分子成分)相互作用的能力, 所以这种带有较多负离子的糖胺聚糖称为聚阴离子。糖胺聚糖类共有的聚阴离子性质以及他们在溶液中的不同构象形成了他们多种生物学作用基础^[17-20], 其抗凝血、抗肿瘤、免疫调节等功能目前研究较多^[21-25], 而抗HBV的研究尚未见报道。本研究采用目前研究已经相当成熟而且应用广泛的HBV转基因小鼠作为实验动物模型, 进行体内实验研究^[26-30]。

应用要点

本研究为慢性乙型肝炎抗病毒药物的研发以及海洋抗病毒药物的研究开创了新的领域。

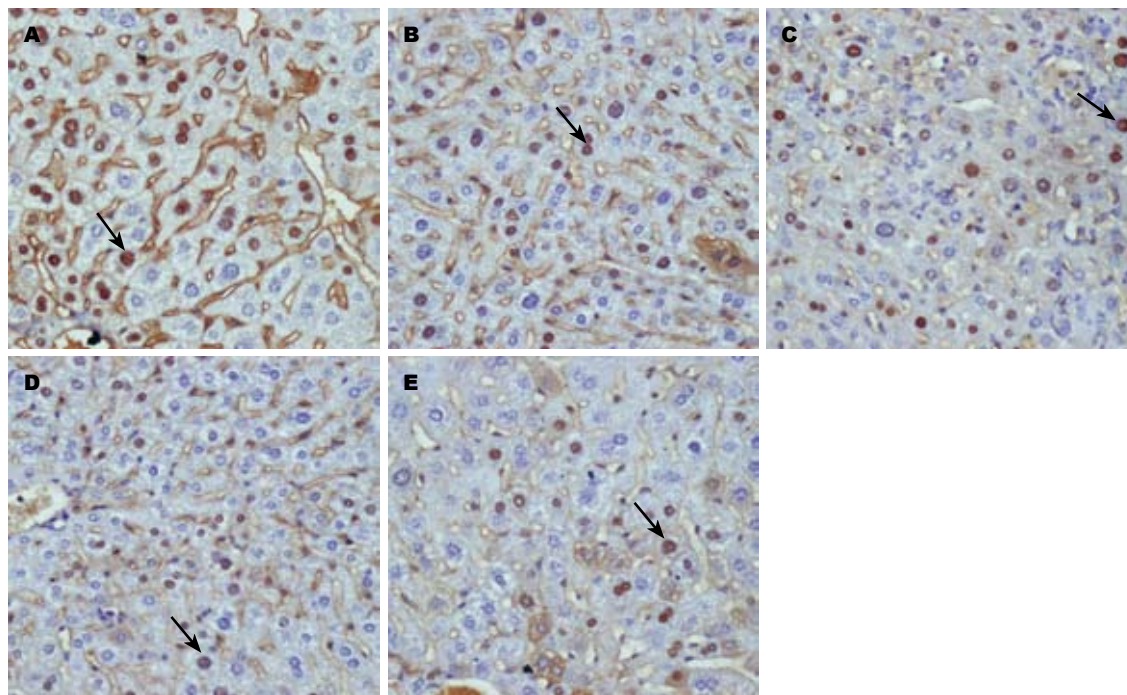


图2 免疫组织化学法观察刺参糖胺聚糖对小鼠肝脏HBcAg表达的影响($\times 200$)。A: 生理盐水对照组; B: 刺参糖胺聚糖组(低剂量); C: 刺参糖胺聚糖组(中剂量); D: 刺参糖胺聚糖组(高剂量); E: 干扰素对照组。

HBV转基因小鼠饲养容易、成本低、繁殖周期短、遗传背景清楚, 其能在个体水平, 从时间和空间角度同时观察HBV单个核多个基因区的整合与表达功能及致病作用。而且高水平复制型HBV转基因小鼠与人HBV慢性感染相似, 从而为抗HBV药物的研究提供了广阔空间^[31-33]。

本研究采用不同浓度的刺参糖胺聚糖作用于HBV转基因小鼠, 研究表明: 免疫组织化学结果显示刺参糖胺聚糖从低剂量(30 mg/kg)开始对小鼠肝脏组织HBsAg, HBcAg的表达均具有抑制作用, 而且随着药物剂量的增加其抑制作用增强。综合上述结果, 说明刺参糖胺聚糖在HBV转基因小鼠体内具有一定的抗HBV作用, 而且其抗病毒作用呈现一定的量效反应关系。

多糖抗HBV作用的机制目前尚不明确, 其途径可能主要为抑制HBsAg, HBcAg的分泌, 以及抑制病毒DNA的复制。另有研究报道其机制可能为直接抑制病毒进入细胞后某一复制环节; 非特异性免疫增强作用、提高树突状细胞的抗原递呈能力; 防止和推迟耐药株的出现; 提高其他药物的抗病毒活性; 抗氧化作用, 减轻肝损伤等^[8,19,34,35]。本研究表明刺参糖胺聚糖活体内具有抗HBV的作用, 并呈现一定的量效反应关系。但小鼠感染HBV的体内病理生理改变与人感染HBV并不完全一样, 存在种属差异, 而且目前对于刺参糖胺聚糖的提取、分离、纯化、鉴定等

技术尚需改进, 这在一定程度上亦影响了其抗病毒作用的效果。基于上述因素的影响, 刺参糖胺聚糖的抗HBV作用仍需进一步深入研究和完善。

4 参考文献

- 1 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 395-403
- 2 赵伟. 核苷类药物在慢乙肝抗病毒治疗中的作用. 世界感染杂志 2008; 8: 253-256
- 3 Vildózola Gonzales H, Salinas JL. [Natural history of chronic hepatitis B virus infection] *Rev Gastroenterol Peru* 2009; 29: 147-157
- 4 胡人杰, 于苏萍, 姜卉, 王士贤. 刺参酸性粘多糖与可的松联用方案对小鼠肿瘤的抑制作用. *癌症* 1997; 16: 422-424
- 5 王静凤, 逢龙, 董平, 赵芹, 薛长湖. 北极刺参和日本刺参对大鼠血脂水平调节和血管内皮保护作用的研究. *中国海洋药物* 2007; 26: 10-13
- 6 李萌, 杜国威, 刘赛, 于囡, 李文. 牡蛎糖胺聚糖小鼠体内抗病毒作用的实验研究. *中国海洋药物* 2008; 27: 50-51
- 7 王克霞, 湛孝东, 李朝品, 刘群红, 张超, 刘小燕. 江西巴蜗牛多糖对乙肝病毒复制的抑制作用研究. *中国药理学通报* 2006; 22: 378-379
- 8 赵丽红, 任玉新. 抗乙肝病毒药物的研究进展. *医学理论与实践* 2008; 21: 5511-7511
- 9 De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004; 30: 115-133
- 10 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 11 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirol* 2003; 46: 413-420
- 12 蒋泽伟, 辛永宁, 罗兵, 宣世英. 刺参糖胺聚糖对

- HepG2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的影响. 实用医学杂志 2008; 24: 1289-1291
- 13 Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1: 100-107
- 14 Tseng YP, Kuo YH, Hu CP, Jeng KS, Janmanchi D, Lin CH, Chou CK, Yeh SF. The role of helioxanthin in inhibiting human hepatitis B viral replication and gene expression by interfering with the host transcriptional machinery of viral promoters. *Antiviral Res* 2008; 77: 206-214
- 15 李长恭, 渠桂荣. 抗乙肝病毒药物研究的进展. 天然产物研究与开发 2002; 14: 81-87
- 16 Kariya Y, Mulloy B, Imai K, Tominaga A, Kaneko T, Asari A, Suzuki K, Masuda H, Kyogashima M, Ishii T. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydr Res* 2004; 339: 1339-1346
- 17 陈昊然, 胡庭俊. 硫酸多糖抗病毒作用研究进展. 动物医学进展 2005; 26: 54-57
- 18 陈丽萍, 王弘. 硫酸多糖的结构与生物活性关系研究现状. 广州化工 2005; 33: 21-23
- 19 黄皓, 干信. 天然多糖类活性物质抗乙肝病毒的研究进展. 中草药 2006; 37: 1594-1596
- 20 Lu Y, Wang BL. The research progress of antitumor effectiveness of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide in north of China. *Am J Med Sci* 2009; 337: 195-198
- 21 Lu Y, Zhang BY, Dong Q, Wang BL, Sun XB. The effects of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on the apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Am J Med Sci* 2010; 339: 141-144
- 22 王静凤, 王奕, 赵林, 逢龙, 薛长湖. 日本刺参的抗肿瘤及免疫调节作用研究. 中国海洋大学学报(自然科学版) 2007; 37: 93-96
- 23 Shen WZ, Zhou RF, Wang XF, Ding QL, Wang HL. [Antithrombotic mechanisms of holothurian glycosaminoglycan extracted from sea cucumber] *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2006; 27: 579-583
- 24 Kelly MS. Echinoderms: their culture and bioactive compounds. *Prog Mol Subcell Biol* 2005; 39: 139-165
- 25 周湘盈, 徐贵发. 东海刺海参冻干粉对荷瘤小鼠的抑瘤作用及其免疫指标的影响. 卫生研究 2008; 37: 30
- 26 刘光泽, 孔祥平, 任向荣, 李秀梅, 胡蓬美, 黄黎珍, 顾为望. 高复制HBV转基因小鼠模型对抗乙型肝炎病毒药物的效应研究. 中国病理生理杂志 2007; 23: 99-102
- 27 Yang XG. [Preliminary observations on the effect of sjamp on the fibrinolytic system] *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 1990; 12: 187-192
- 28 熊一力, 刘光泽, 贾彦征. HBV转基因小鼠免疫耐受机制的实验研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 642-645
- 29 邱英锋, 缪晓辉. 乙型肝炎动物模型及其建立方法. 西北民族大学学报(自然科学版) 2003; 24: 73-76
- 30 Fan Y, Jiang WZ, Wen JJ, Hao WL, Du JN, Liu X, Qian M. B7-DC-silenced dendritic cells induce stronger anti-HBV immunity in transgenic mice. *Arch Virol* 2009; 154: 1813-1821
- 31 原丽红, 林本夫. 转基因小鼠在现代生命科学中的应用. 生物技术通报 2009; z1: 67-70
- 32 党双锁, 宋平. HBV转基因小鼠在乙型肝炎防治方面的研究. 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2008; 2: 99-104
- 33 刘大斌, 童贻刚. HBV的小鼠模型研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3859-3864
- 34 迟玉森, 仇宏伟, 庄桂东, 朱玉强, 韩荣伟, 张路遥. 长岛刺参多糖的提取精制及基本性质. 精细化工 2007; 24: 480-483
- 35 郑子瑞, 戴玲, 钟辉. 多糖抗病毒活性的研究进展. 生物技术通讯 2008; 19: 763-764

■同行评价

本研究设计比较合理, 实验图片比较清楚地说明刺参糖胺聚糖具有抑制HBV复制的作用, 具有进一步深入研究的必要性和参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

MMP-2和ICAM-1在裸鼠体内塞来昔布抑制肝癌组织中的表达

殷积彬, 李宝馨, 谢新玉, 刘冰熔, 吕志武, 关景明, 高善玲

■背景资料

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 手术切除病灶是最佳选择。目前肝癌的治疗还缺少有效的药物, 因此, 研究新型抗肿瘤药物的抗癌效果十分必要。选择性COX-2抑制剂具有一定的抗肿瘤作用, 其作用机制的研究尚不够深入和全面。

殷积彬, 刘冰熔, 吕志武, 关景明, 高善玲, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150081
李宝馨, 哈尔滨医科大学药学院药理学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150081
谢新玉, 北京市朝阳区垂杨柳医院消化一科, 北京市 100025
殷积彬, 主治医师, 医学博士, 主要从事肝脏疾病的诊断与治疗。
黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 11521184
作者贡献分布: 殷积彬与李宝馨对此文所作贡献均等; 此研究由殷积彬、李宝馨、刘冰熔及吕志武共同设计; 研究过程由殷积彬、谢新玉、吕志武及关景明操作完成; 数据分析由殷积彬、谢新玉及高善玲完成; 本论文写作由殷积彬、李宝馨及谢新玉完成。

通讯作者: 李宝馨, 教授, 硕士及博士生导师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学药学院药理学教研室。
li.baixin@sohu.com
收稿日期: 2010-01-05 修回日期: 2010-03-12
接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-28

Celecoxib inhibits the expression of MMP-2 and ICAM-1 in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice

Ji-Bin Yin, Bao-Xin Li, Xin-Yu Xie, Bing-Rong Liu, Zhi-Wu Lv, Jing-Ming Guan, Shan-Ling Gao

Ji-Bin Yin, Bing-Rong Liu, Zhi-Wu Lv, Jing-Ming Guan, Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Bao-Xin Li, Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Xin-Yu Xie, Department of Gastroenterology, Beijing Chuiyangliu Hospital, Beijing 100025, China

Supported by: the Science and Technology Research of Heilongjiang Provincial Department of Education, No. 11521184
Correspondence to: Professor Bao-Xin Li, Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. li.baixin@sohu.com
Received: 2010-01-05 Revised: 2010-03-12
Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the antitumor effects of celecoxib (a selective cyclooxygenase-2 inhibitor) against hepatocellular carcinoma *in vivo*.

METHODS: Human hepatoma cells (HepG2, BEL-7402 and SMMC-7721) were injected beneath the hepatic capsule of six-week-old nude mice. The mice were then randomly divided into three groups: negative control group (intra-

gastrically given normal saline), experimental group (intragastrically given celecoxib), and positive control group (intragastrically given normal saline and intraperitoneally injected with adriamycin). Three weeks later, tumor tissue samples were taken for immunohistochemical analysis to examine the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).

RESULTS: Compared to the negative control group, the expression of MMP-2 was down-regulated ($P < 0.05$) and that of TIMP-2 was up-regulated ($P < 0.05$) in hepatocellular carcinoma xenografts derived from HepG2, BEL-7402 and SMMC-7721 cells in the experimental group. The expression of ICAM-1 was also down-regulated in hepatocellular carcinoma xenografts derived from BEL-7402 and SMMC-7721 cells in the experimental group when compared with the negative control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Celecoxib may be able to inhibit the metastasis and improve the prognosis of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Selective COX-2 inhibitor; Hepatocellular carcinoma; Matrix metalloproteinase-2; Intercellular adhesion molecule-1

Yin JB, Li BX, Xie XY, Liu BR, Lv ZW, Guan JM, Gao SL. Celecoxib inhibits the expression of MMP-2 and ICAM-1 in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1206-1210

摘要

目的: 研究机体内选择性环氧合酶-2(COX-2)抑制剂对肝细胞癌的抑制作用。

方法: 将三种肝癌细胞株HepG2、BEL-7402和SMMC-7721分别接种于6周龄裸鼠肝脏被膜下; 将接种了不同肝癌细胞株的裸鼠分别分为3组, 阴性对照组给予生理盐水灌胃, 实验组给予塞来昔布灌胃, 阳性对照组进行生理盐水灌胃的同时使用阿霉素腹腔注射; 3 wk

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科; 郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

后对裸鼠肝脏肿瘤取材、免疫组织化学法观察肿瘤组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及其抑制剂(TIMP-2)以及细胞间黏附因子-1(ICAM-1)的表达。

结果:在肝脏被膜下接种了HepG2、BEL-7402和SMMC-7721肝癌细胞株的裸鼠中,应用塞来昔布的裸鼠肿瘤组织中MMP-2的表达下降($P<0.05$),MMP-2的表达增加($P<0.05$),TIMP-2/MMP-2比值增加。在肝脏被膜下接种了BEL-7402和SMMC-7721肝癌细胞株的裸鼠中,应用塞来昔布的裸鼠肿瘤组织中ICAM-1表达下降。

结论:塞来昔布在机体内部可能具有抑制肝癌细胞转移和改善预后的作用。

关键词:选择性环氧合酶-2抑制剂;肝癌;基质金属蛋白酶-2;细胞间黏附因子-1

殷积彬, 李宝馨, 谢新玉, 刘冰熔, 吕志武, 关景明, 高善玲. MMP-2和ICAM-1在裸鼠体内塞来昔布抑制肝癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1206-1210
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1206.asp>

0 引言

选择性环氧合酶-2(selective cyclooxygenase-2 inhibitor, COX-2)抑制剂能够抑制恶性肿瘤细胞的增殖和侵袭,促进肿瘤细胞的凋亡。然而,这些研究资料大多来自细胞培养^[1-6],机体内部的药物抗肿瘤效果仍不十分清楚,尤其是口服COX-2抑制剂塞来昔布对肝脏原发肿瘤的疗效仍未见报道。我们将肝癌细胞株接种于裸鼠肝脏组织中,以塞来昔布灌胃法观察裸鼠体内选择性COX-2抑制剂的抗肿瘤效果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2、BEL-7402、SMMC-7721购于中国科学院上海生命研究所。清洁级BALB/c裸鼠购于中国北京维通利华试验动物技术有限公司,周龄6 wk, ♂, 体质量17-20 g, 共45只。1640培养基购自Gibco公司,多克隆基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及其抑制剂(TIM-2)抗体购自英国Abcam公司,细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)抗体购于北京中杉生物技术有限公司,阿霉素(Adriamycin)为意大利Pharmacia生产,塞来昔布由PPLLC公司生产。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞培养和接种: 0.5×10^6 个细胞接种培养瓶中,48 h换培养液1次,当培养瓶中细胞增

殖到90%面积时,台盼蓝法测定细胞活力, $>95\%$ 后制备成 5×10^7 个/L的肝癌细胞悬液。沿裸鼠左肋弓下缘切一长约1 cm的斜行无菌切口,剥开腹肌,暴露小鼠肝脏;用BD针抽取细胞悬液0.1 mL,使BD针尖与小鼠肝脏呈30度进针,刺入肝脏约0.3 cm,缓慢注入细胞悬液,注射完毕后,有酒精棉签压迫注射部位30 s,确定无渗液和出血后,逐层缝合腹肌和皮肤。21 d后,处死裸鼠,留取肝脏的肿瘤组织用100 g/L甲醛固定。

1.2.2 分组:将裸鼠随机分为3组,阴性对照组、实验组和阳性对照组,各15只。每组裸鼠的肝脏被膜下分别接种HepG2肝癌细胞株、BEL-7402肝癌细胞株、SMMC-7721肝癌细胞株,各5只。

1.2.3 药物处理:于术后24 h,实验组给予塞来昔布混悬液(300 mg/kg)灌胃;阴性对照组给予等量的生理盐水灌胃;阳性对照组灌胃同时,前3 d给予浓度为1 g/L的阿霉素按6 mg/kg腹腔注射,共3次。

1.2.4 免疫组织化学:标本按常规分别固定、脱水、透明、浸蜡。石蜡切片、脱蜡、抗原修复后,依次加入一抗,二抗,常规HE染色,然后中性树胶封片。MMP-2、TIMP-2和ICAM-1结果的判定:显微镜下每张切片中计记录视野中的阳性细胞的平均百分比,阳性细胞数占视野中全部细胞的比例 $<5\%$ 为(-),阳性细胞数的比例占5%-25%为(+),阳性细胞数的比例占25%-50%为(++),阳性细胞数的比例占50%-75%为(+++),阳性细胞数的比例 $>75\%$ 为(++++)。

统计学处理 等级资料的统计学比较用秩和检验。 $P<0.05$ 为统计学差异存在显著性。

2 结果

2.1 细胞株的生长差异 100 mL/L胎牛血清常规培养HepG2、BEL-7402、SMMC-7721三种肝癌细胞系。HepG2细胞呈梭形,体积较小,折光性好,核仁2-3个,细胞生长旺盛,接种后4-5 d长满培养瓶。BEL-7402细胞呈三角形,体积较大,伪足短,折光性差,核仁2-3个,细胞生长较慢,接种后7-8 d长满培养瓶。SMMC-7721细胞形态舒展,伪足数量差异较大,1-4个,细胞折光性好,核仁4-5个,细胞生长旺盛,接种后4-5 d长满培养瓶。

2.2 裸鼠肝脏接种瘤情况 在裸鼠肝脏接种肿瘤细胞后3 wk,肉眼观察,可见肿瘤位于肝脏被膜下,肿瘤组织呈灰白色,质韧,呈块状不规则形分布(图1)。

2.3 塞来昔布对肿瘤组织中MMP-2表达的影响 HepG2、BEL-7402和SMMC-7721三种细胞系表达MMP-2较高,应用塞来昔布或阿霉素后,

■研发前沿

选择性COX-2抑制剂的抗肿瘤作用的研究多侧重于细胞培养,机体内部的抗肿瘤效果仍不完全清楚。

■相关报道

Xie等研究发现,在较高表达乙型肝炎病毒X蛋白的肝癌细胞株中,塞来昔布抑制癌细胞增殖和促进其凋亡的效果更佳,其中的作用机制虽然不十分清楚,却提供了一个新的探索思路,即选择性COX-2抑制剂的抗肿瘤作用可能受到肿瘤细胞自身特点的影响。

■ 创新盘点

本研究首先建立肝脏原位移植瘤裸鼠模型,然后经口给予塞来昔布,观察药物在机体内部的是否存在抗肿瘤的效果,为选择性COX-2抑制剂的临床抗肿瘤治疗提供动物实验参考。

表 1 塞来昔布对裸鼠肝接种瘤MMP-2、TIMP-2表达的影响

	MMP-2表达			TIMP-2表达		
	HepG2	BEL-7402	SMMC-7721	HepG2	BEL-7402	SMMC-7721
阴性对照组	(+)-(++)	(+)-(++)	(++)-(+++)	(-)(+)	(++)-(+++)	(-)(++)
实验组	(-)(+) ^a	(-) ^{bc}	(+)-(++) ^{bc}	(++)-(+++) ^{bc}	(++)-(+++) ^{bc}	(++)-(+++) ^{bc}
阳性对照组	(-)(+)	(-)(+)	(++)-(+++)	(-)(+)	(++)-(+++)	(-)(+)

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^b $P < 0.05$ vs 阳性对照组。

MMP-2的表达均受到抑制,统计学比较显示实验组与阴性对照组之间有统计学差异($P < 0.05$)。提示塞来昔布具有抑制MMP-2在肝癌细胞中表达的作用。进一步比较实验组与阳性对照组发现,在HepG2肝癌细胞组织中两组中MMP-2的含量差别不大,经统计学检验无统计学差异($P > 0.05$)。在BEL-7402和SMMC-7721肝癌细胞中实验组的MMP-2的含量低于阳性对照组,且均有统计学差异($P < 0.05$),提示在BEL-7402和SMMC-7721肝癌中塞来昔布的疗效要好于阿霉素的疗效(表1)。

2.4 塞来昔布对肿瘤组织中TIMP-2表达的影响 HepG2和SMMC-7721两种细胞系低度表达TIMP-2, BEL-7402细胞系高表达TIMP-2,应用塞来昔布后,三种不同的肿瘤细胞中TIMP-2表达增加,统计学分析显示实验组与阴性对照组间有统计学差异($P < 0.05$),实验组与阳性对照组间有统计学差异($P < 0.05$,表1)。

2.5 塞来昔布对ICAM-1表达的影响 ICAM-1在HepG2细胞中未见表达,在BEL-7402和SMMC-7721两种肝癌细胞中高表达,免疫组织化学染色结果分别为(+)-(+++和(+)-(+++);使用塞来昔布后ICAM-1表达显著受到抑制,免疫组织化学染色结果分别为(-)-(+)和(-)-(+)。裸鼠使用阿霉素后肝癌组织ICAM-1表达分别为(++)-(+++和(++)-(+++)。以上两种不同的肝癌组织分别进行统计学比较显示,塞来昔布组与阴性对照组的差异均有统计学意义($P < 0.05$),因此,裸鼠体内塞来昔布对肝癌细胞的ICAM-1表达具有抑制作用(图2,3)。

3 讨论

选择性COX-2抑制剂是一种非甾体抗炎药,较多用于治疗骨与关节的疼痛性疾病^[7]。近年的研究认为,选择性COX-2抑制剂可以通过非前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)依赖性途径抑制肿瘤的发生和发展^[8],其抗肿瘤作用机制比较复杂,涉及诸多方面,如阻滞细胞周期,抑制细胞增殖,

诱导凋亡,抑制增殖细胞信号的传导等^[3,9-13],选择性COX-2抑制剂在机体内部的抗肿瘤疗效报道较少。我们在成功建立了原位肝癌动物模型后,经口给予裸鼠塞来昔布治疗,旨在观察选择性COX-2抑制剂在机体内部的抗肿瘤效果。

MMPs是一组锌离子依赖性内肽酶,与细胞外基质成分的降解有关^[14-17]。MMP-2及其抑制剂(TIMP-2)是评价肝癌细胞转移能力的良好指标之一, MMP-2通过水解细胞外基质促进肿瘤细胞的侵袭和转移,而TIMP-2能特异地抑制MMP-2的酶原激活和酶活性,阻止肿瘤细胞的侵袭。实验研究显示,三种肝癌细胞都表达MMP-2和TIMP-2,但不同的细胞系表达MMP/TIMP的能力有所不同。机体内选择性COX-2抑制剂塞来昔布能够抑制肝癌细胞内MMP-2表达,又增加TIMP-2的表达,从而使TIMP-2/MMP-2比例增加,导致肿瘤细胞降解细胞外基质的作用下降,达到抑制肿瘤细胞的转移的作用。这个结果与我们以往的研究结果是一致的^[18,19]。还有研究显示,在肿瘤细胞内, MMPs表达的调节要受到细胞增殖信号途径的影响^[20,21],选择性COX-2抑制剂能够抑制细胞增殖信号途径中一些蛋白酶的激活,导致下游多种与细胞增殖相关的蛋白酶的基因转录受到抑制,因此,选择性COX-2抑制剂对MMP-2的抑制作用还可能与抑制细胞增殖信号途径有关。

ICAM-1有广泛的组织分布,生理条件下低量表达,却可以受到多种因素的诱导。ICAM-1参与肿瘤的发展过程, ICAM-1与肿瘤的发生、转移以及预后关系十分密切^[22,23]。ICAM-1不仅促进血管生成,还可以结合在血液中的淋巴细胞及自然杀伤细胞表面,起到封闭作用,使这些细胞识别癌细胞的能力下降。肝细胞中的ICAM-1主要表达在胞膜,肝癌细胞中更多出现于胞质,并分泌进入血液。有研究显示,可以通过血中ICAM-1的浓度变化,预测病毒性肝炎患者的癌变倾向,以及评估恶性肿瘤的治疗效果^[24,25],所以ICAM-1可以作为一项判断肿瘤疗效和预后

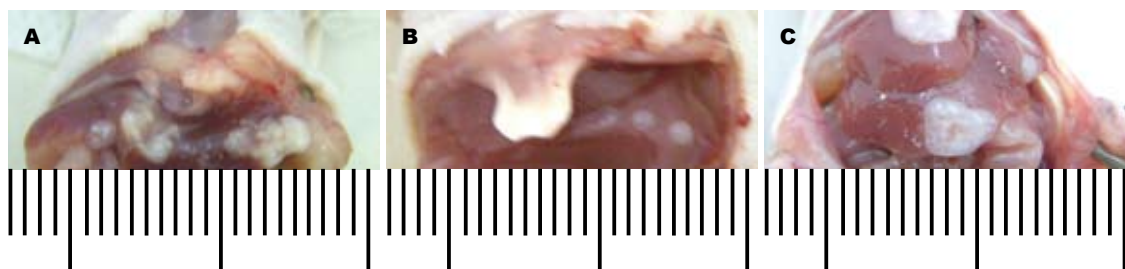


图 1 接种SMMC-7721细胞的裸鼠肝脏表面的肿瘤结节. A: 阴性对照组; B: 实验组; C: 阳性对照组.

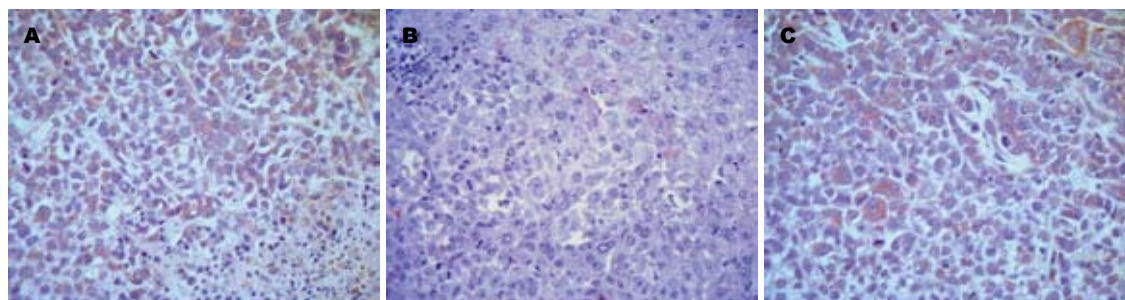


图 2 原位移植BEL-7402肝癌细胞株后裸鼠肝脏肿瘤中的ICAM-1的表达. A: 阴性对照组肝癌组织中ICAM-1的表达; B: 实验组肝癌组织中ICAM-1的表达; C: 阳性对照组肝癌组织中ICAM-1的表达.

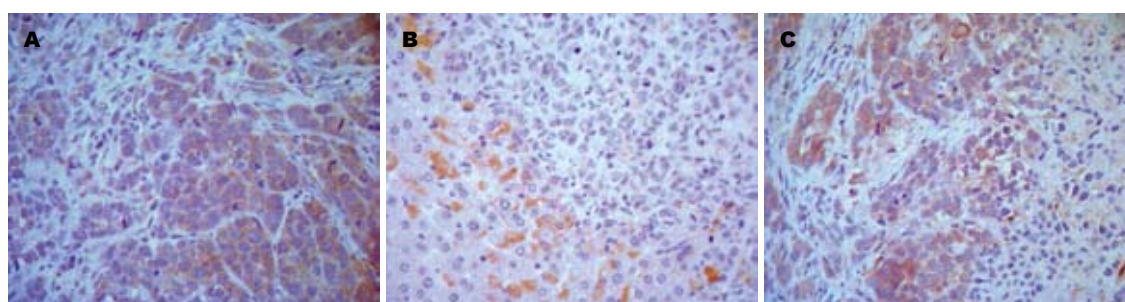


图 3 原位移植了SMMC-7721肝癌细胞株后裸鼠肝脏肿瘤中的ICAM-1的表达. A: 阴性对照组肝癌组织中ICAM-1的表达; B: 实验组肝癌组织中ICAM-1的表达; C: 阳性对照组肝癌组织中ICAM-1的表达.

的观察指标. 实验中发现, 塞来昔布使BEL-7402和SMMC-7721肝癌细胞中的ICAM-1表达明显下降, 说明选择性COX-2抑制剂有一定的辅助机体清除肿瘤细胞的作用, 即可能促进机体免疫系统对肿瘤细胞的识别, 改善肿瘤的预后. ICAM-1基因接受多种转录因子的调节, 如核转录因子- κ B(nuclear factor-kappaB, NF- κ B)、活化剂蛋白-1(activator protein-1, AP-1)、信号转导活化转录因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)等, NF- κ B进入细胞核后, 与ICAM-1启动子的 κ B位点结合, 引发ICAM-1基因转录. 选择性COX-2抑制剂能够抑制NF- κ B的活化, 从而抑制其向细胞核内迁移, 因此, 选择性COX-2抑制剂抑制ICAM-1的表达, 还可能与肿瘤细胞内转录因子的激活受到抑制有关^[26].

由于实验观察时间较短, 裸鼠肺部解剖和HE

染色未见到转移灶, 因此, 选择性COX-2抑制剂体内的长期抗肿瘤效果, 还需要延长裸鼠的饲养时间、观察时间和增加实验例数. 选择性COX-2抑制剂的临床安全性目前仍存在争议, 主要是增加心血管意外的发生^[27], 也有出现重要脏器功能衰竭的报道^[28]. 另有一些研究认为, 选择性COX-2抑制剂的使用是安全的, 尤其是在癌症镇痛方面, 并仍在继续^[29]. 总之, 选择性COX-2抑制剂与肿瘤转移及预后之间的关系还有待进一步研究^[30].

4 参考文献

- Xie H, Gao L, Chai N, Song J, Wang J, Song Z, Chen C, Pan Y, Zhao L, Sun S, Wu K, Feitelson MA, Liu J, Fan D. Potent cell growth inhibitory effects in hepatitis B virus X protein positive hepatocellular carcinoma cells by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Mol Carcinog* 2009; 48: 56-65
- Tuynman JB, Vermeulen L, Boon EM, Kemper K, Zwinderman AH, Peppelenbosch MP, Richel DJ.

■应用要点

虽然塞来昔布在裸鼠体内表现出了一定的抗肝癌疗效, 但药物对机体的安全性尚不肯定, 因此还需要深入研究选择性COX-2抑制剂的药理作用. 临床应用选择性COX-2抑制剂治疗肿瘤应当有选择性.

■同行评价

本文选题新颖,设计合理,具有一定的理论意义。

- Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits c-Met kinase activity and Wnt activity in colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 1213-1220
- 3 Baek JY, Hur W, Wang JS, Bae SH, Yoon SK. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1175-1181
 - 4 Li S, Tong Q, Zhang W, Wang Q, Chen Z, Wu Q. Mechanism of growth inhibitory effects of cyclooxygenase-2 inhibitor-NS398 on cancer cells. *Cancer Invest* 2008; 26: 333-337
 - 5 Cusimano A, Foderà D, D'Alessandro N, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G, Cervello M. Potentiation of the antitumor effects of both selective cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 inhibitors in human hepatic cancer cells by inhibition of the MEK/ERK pathway. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1461-1468
 - 6 Breinig M, Schirmacher P, Kern MA. Cyclooxygenase-2 (COX-2)--a therapeutic target in liver cancer? *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3305-3315
 - 7 de Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Niehoff AG, van Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JW, Lafeber FJ, Mastbergen SC. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 482-488
 - 8 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1946-1952
 - 9 Nagahara T, Okano J, Murawaki Y. Mechanisms of anti-proliferative effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on human liver cancer cells. *Oncol Rep* 2007; 18: 1281-1290
 - 10 Li J, Chen X, Dong X, Xu Z, Jiang H, Sun X. Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1814-1820
 - 11 Yamanaka Y, Shiraki K, Inoue T, Miyashita K, Fuke H, Yamaguchi Y, Yamamoto N, Ito K, Sugimoto K, Nakano T. COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Mol Med* 2006; 18: 41-47
 - 12 Liu NB, Peng T, Pan C, Yao YY, Shen B, Leng J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6281-6287
 - 13 Park JW, Park JE, Lee JA, Lee CW, Kim CM. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is directly involved but not decisive in proliferation of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 184-192
 - 14 Leung E, McArthur D, Morris A, Williams N. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents migration of colorectal cancer cells to extracellular matrix by down-regulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 342-347
 - 15 Ishizaki T, Katsumata K, Tsuchida A, Wada T, Mori Y, Hisada M, Kawakita H, Aoki T. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits liver metastasis of colorectal cancer cells via the suppression of MMP-9 activity. *Int J Mol Med* 2006; 17: 357-362
 - 16 Kurihara Y, Hatori M, Ando Y, Ito D, Toyoshima T, Tanaka M, Shintani S. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 425-432
 - 17 Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis* 2009; 30: 300-307
 - 18 殷积彬, 刘铁夫, 刘伟, 赵瑞波. NS-398影响基质金属蛋白酶-2及其抑制剂的表达. *中华消化杂志* 2006; 26: 262-263
 - 19 殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川. NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2301-2305
 - 20 Lee KW, Kim MS, Kang NJ, Kim DH, Surh YJ, Lee HJ, Moon A. H-Ras selectively up-regulates MMP-9 and COX-2 through activation of ERK1/2 and NF-kappaB: an implication for invasive phenotype in rat liver epithelial cells. *Int J Cancer* 2006; 119: 1767-1775
 - 21 Abiru S, Nakao K, Ichikawa T, Migita K, Shigeno M, Sakamoto M, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Eguchi K. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 2002; 35: 1117-1124
 - 22 Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Brucato L, Benetti E, Collino M, Fantozzi R. Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in a colon cancer cell line (HT29). *Br J Pharmacol* 2008; 153: 870-878
 - 23 Dianzani C, Brucato L, Gallicchio M, Rosa AC, Collino M, Fantozzi R. Celecoxib modulates adhesion of HT29 colon cancer cells to vascular endothelial cells by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1153-1161
 - 24 Hayes SH, Seigel GM. Immunoreactivity of ICAM-1 in human tumors, metastases and normal tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 553-560
 - 25 Helaly GF, Abou Shamaa LA. Influence of hepatitis C virus infection on circulating levels of sICAM-1 and VEGF in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma (HCC) and their role in enhancing detection of HCC. *Egypt J Immunol* 2006; 13: 27-38
 - 26 Yasuda T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF-kappaB via ICAM-1. *Inflamm Res* 2007; 56: 246-253
 - 27 Rao PN, Grover RK. Apricoxib, a COX-2 inhibitor for the potential treatment of pain and cancer. *IDrugs* 2009; 12: 711-722
 - 28 El Hajj II, Malik SM, Alwakeel HR, Shaikh OS, Sasatomi E, Kandil HM. Celecoxib-induced cholestatic liver failure requiring orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3937-3939
 - 29 Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Serpe R, Antoni G, Massa E, Dessi M, Panzone F. Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. *J Mol Med* 2010; 88: 85-92
 - 30 Cui W, Hu SX, Tang ZY, Hu KQ. In-vivo effects and mechanisms of celecoxib-reduced growth of cyclooxygenase-2 (COX-2)-expressing versus COX-2-deleted human HCC xenografts in nude mice. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 891-897

高糖对体外培养的Cajal间质细胞P2X₇嘌呤能受体表达的影响

高显奎, 余跃, 杨琰, 陈军, 王巧民

高显奎, 余跃, 杨琰, 陈军, 王巧民, 安徽医科大学附属省立医院消化内科 安徽省合肥市 230001
高显奎, 安徽医科大学在读硕士, 研究方向为胃肠疾病基础与临床. 安徽省自然科学基金资助项目, No. 070413142
作者贡献分布: 此课题由余跃、高显奎及王巧民设计; 研究过程由高显奎、杨琰及陈军完成; 研究所用试剂及分析工具由余跃与高显奎提供; 数据分析由高显奎与余跃完成; 本论文写作由高显奎与余跃完成.
通讯作者: 余跃, 教授, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属省立医院消化内科.
yuyuemd@yahoo.com.cn
电话: 0551-2283380
收稿日期: 2010-01-28 修回日期: 2010-04-07
接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-04-28

High concentration of glucose enhances the expression of P2X₇ purine receptor in interstitial cells of Cajal *in vitro*

Xian-Kui Gao, Yue Yu, Yan Yang, Jun Chen, Qiao-Min Wang

Xian-Kui Gao, Yue Yu, Yan Yang, Jun Chen, Qiao-Min Wang, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 070413142
Correspondence to: Professor Yue Yu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. yuyuemd@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-28 Revised: 2010-04-07
Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of high concentration of glucose on the expression of P2X₇ purine receptor in the interstitial cells of Cajal (ICC) *in vitro* and to explore the mechanisms underlying gastrointestinal dysmotility in diabetic mellitus.

METHODS: ICC were isolated from the intestine of newborn mice by enzymatic dissociation and centrifugation and cultured in an incubator containing 50 mL/L CO₂. Cultured ICC were identified by immunofluorescence staining us-

ing antibodies directed against c-Kit receptor and P2X₇ receptor. ICC were then divided into two groups: control group and experimental group, which were treated with normal and high concentrations of glucose, respectively. After treatment, cell morphology was observed under an inverted light microscope. The expression of P2X₇ receptor and c-Kit receptor mRNAs in ICC was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Immunofluorescence staining demonstrated that both P2X₇ receptor and c-Kit receptor were positive on ICC cells. After treatment with high concentration of glucose, ICC became bigger, and cell processes became shorter. RT-PCR analysis proved the expression of P2X₇ receptor in ICC. The expression level of c-Kit receptor mRNA was weaker and that of P2X₇ receptor mRNA was stronger in the experimental group than in the control group.

CONCLUSION: P2X₇ receptor is expressed in ICC. Hyperglycemia may alter cell morphology, decrease the expression of c-Kit receptor, enhance the expression of P2X₇ receptor in ICC, and thereby play a role in the pathogenesis of gastrointestinal dysmotility in diabetic mellitus.

Key Words: High glucose; Interstitial cells of Cajal; P2X₇ receptor

Gao XK, Yu Y, Yang Y, Chen J, Wang QM. High concentration of glucose enhances the expression of P2X₇ purine receptor in interstitial cells of Cajal *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1211-1216

摘要

目的: 观察P2X₇嘌呤能受体在体外培养的Cajal间质细胞(ICC)的表达及高糖的影响, 探讨P2X₇嘌呤能受体在糖尿病胃肠功能紊乱的细胞机制。

方法: 以小鼠小肠组织为来源, 联合使用机械分离法和酶解法分离ICC, 培养在50 mL/L

背景资料

胃肠动力障碍是糖尿病的一个常见并发症, 其发生机制尚不清楚, 近年来ICC的研究取得了很大的进展, 已经证实其与糖尿病胃肠动力障碍的关系密切. P2X₇是一个结构和功能独特的嘌呤受体, 在多种生理功能中发挥着重要的作用。

同行评议者

陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

近年来, ICC 已经成为研究糖尿病胃肠动力障碍发生机制的一个新的突破口, 而 P2X₇ 受体也成为相关研究的热点。

CO₂ 温箱里。同时应用 ICC 特异的 c-Kit 抗体和 P2X₇ 受体抗体进行免疫荧光染色, 在激光共聚焦显微镜下进行鉴定, 以确定 P2X₇ 受体是否表达于 ICC。实验分组: 正常对照组(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L), 高糖组(葡萄糖浓度为 33 mmol/L)。通过倒置显微镜观察细胞形态, RT-PCR 对 P2X₇ 和 c-Kit 受体的表达进行比较。

结果: 激光共聚焦显微镜下 P2X₇ 受体在 c-Kit 抗体阳性的细胞上的免疫荧光染色是阳性的; 与正常组比较, 加入葡萄糖后的 ICC 细胞变大, 突起变短, 与周围细胞的网络连接减少; RT-PCR 结果显示 P2X₇ 受体表达于 ICC, 加入高糖后的 ICC 的 c-Kit 受体表达减弱, 而 P2X₇ 受体的表达是增强的。

结论: P2X₇ 受体表达于体外培养的 ICC 上, 高糖使 ICC 的形态发生了改变、减弱了 c-Kit 的表达、加强了 P2X₇ 受体的表达。这可能在糖尿病胃肠功能紊乱的发生中发挥一定的作用。

关键词: 高糖; Cajal 间质细胞; P2X₇

高显奎, 余跃, 杨琰, 陈军, 王巧民. 高糖对体外培养的 Cajal 间质细胞 P2X₇ 嘌呤受体表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1211-1216

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1211.asp>

0 引言

胃肠动力障碍是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的一个常见并发症, 资料显示 50%-76% DM 患者有胃排空障碍^[1]。很多研究证实 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)与其关系密切^[2,3]。嘌呤受体是非肾上腺能非胆碱能受体, 他广泛地分布于胃肠道, 越来越多的研究证明嘌呤受体在胃肠道平滑肌的收缩和舒张中发挥着重要作用^[4-6]。其中 P2X₇ 受体最近备受人们关注。一般认为 DM 胃动力障碍与 DM 自主神经病变和胃肠激素失衡有关, 而 DM 的代谢紊乱, 特别是糖代谢紊乱可能是产生本症的基础^[7]。本研究首先证实了 P2X₇ 受体表达于小鼠小肠 ICC, 然后观察高糖对 ICC 上 P2X₇ 受体表达的影响, 进而探讨 DM 胃肠动力紊乱的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c 小鼠, 9-14 d, 雌雄不限, 由安徽医科大学实验动物中心提供; Ca²⁺-free-Hanks' 液的成分(mmol/L): NaCl 125, KCl 5.36, NaHCO₃ 15.5, Na₂HPO₄ 0.336, KH₂PO₄ 0.44, 葡萄糖 10, 蔗糖 2.9, 乙磺酸 11, 用 NaOH 调节 pH 至

7.2; Krebs-Ringer bicarbonate 液(KRB 液)的成分(mmol/L): NaCl 118.5, KCl 4.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 23.8, KH₂PO₄ 1.2, dextrose 11.0, CaCl₂ 2.4, 37 °C ± 0.5 °C 通 950 mL/L O₂-50 mL/L CO₂ 的气体其 pH 值为 7.4; SCF(Perotech 公司)、胶原酶 II (Solarbio 公司)、胰蛋白酶抑制剂(Sigma 公司)、M199(Gibco 公司)、兔 P2X₇(Santa Cruz 公司)、山羊 c-Kit(Santa Cruz 公司)、Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(Sigma 公司)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗山羊 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)、TRIzol(Faraday Ave carisbad), 逆转录试剂盒(TaKaRa), 胎牛血清蛋白(Sigma 公司)、洁净工作台(上海博讯实业有限公司), 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo life science 公司), Z200A 型离心机(德国 Hermle 公司), SP5 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)、CK300 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离和培养: 小鼠禁食不禁水 24 h, 无菌条件下取出小肠组织, 放入盛有 KRB 液(含有青霉素 1 IU/mL、链霉素 100 mg/L)的无菌平皿里, 在解剖显微镜下钝性分离出小肠肌条, 然后将分离出的肌条在无 Ca²⁺ 的 Hanks' 液(含有青霉素 1 IU/mL、链霉素 100 mg/L)中冲洗约 30 min, 剪碎至 1-2 mm³ 小块, 加入酶解液(胶原酶 II 1.2 g/L、ATP 0.25 g/L、胎牛血清 100 mL/L、胰蛋白酶抑制剂 2 g/L)消化 20-25 min, 然后去除上清液, 加入上述无 Ca²⁺ 的 Hanks' 液冲洗 3-5 次, 反复吹打 3-5 min。用 M199 培养基(10% 小牛血清、SCF 5 μg/L、青霉素 1 IU/mL、链霉素 100 mg/L、M199)将细胞接种至预先放置包被鼠尾胶原蛋白的盖薄片六孔培养板或者直接在皿底包被鼠尾胶原蛋白的六孔培养板然后放入 50 mL/L CO₂ 培养箱内, 37 °C 条件下培养。

1.2.2 细胞分组: 细胞培养 24 h 后换不含有双抗的 M199 培养基, 继续培养 3 d 后, 分为两组: 正常对照组(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L); 高糖组(葡萄糖浓度为 33 mmol/L)培养 48 h 后待用。

1.2.3 细胞观察: 用倒置显微镜观察各组细胞情况, 每天 1 次, 每次最好不超过 30 min, 并摄像。

1.2.4 免疫荧光实验: 正常对照组细胞稳定培养 6 d 后, 进行荧光检测。步骤: 选择贴壁良好的盖薄片, 用吸管吸掉培养基, 0.01 mol/mL 的 PBS 冲洗 3 × 5 min, 丙酮在室温下固定 10 min, 0.01 mol/mL 的 PBS 冲洗 3 × 5 min, 加入 10% 的小牛血清 37 °C

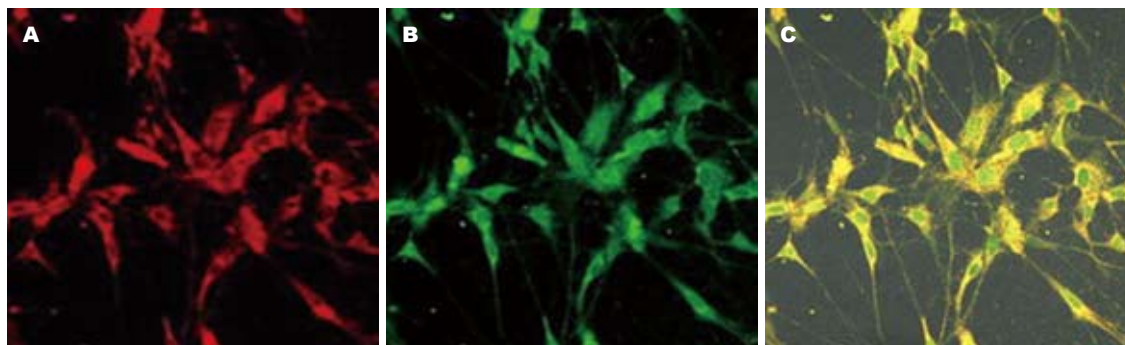


图 1 P2X₇受体在ICC上的表达(免疫荧光法). A: P2X₇阳性; B: c-Kit阳性; C: A与B的复合图(细胞培养6 d后).

■ 相关报道

嘌呤受体广泛分布于胃肠道, 在胃肠道的感觉、运动功能中发挥着重要的作用, 与胃肠道的许多疾病密切相关. P2X₇受体是其中一个较为特殊的受体, 具有独特的结构和功能, 已成为研究热点.

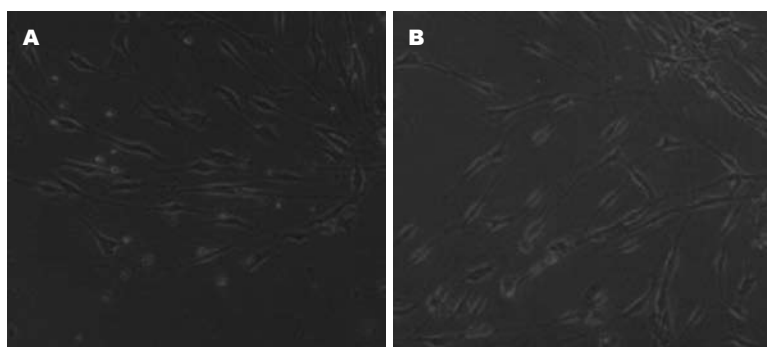


图 2 高糖对ICC的形态的影响. A: 高糖组ICC; B: 对照组ICC(细胞培养6 d后).

下封闭35 min, 0.01 mol/mL的PBS冲洗3×5 min, 加山羊c-Kit(1:150)和兔P2X₇受体(1:180)混合物, 4℃过夜, 0.01 mol/mL的PBS冲洗3×5 min, 加入兔抗山羊IgG(1:35)和山羊抗兔IgG(1:150), 37℃下作用100 min, 0.01 mol/mL的PBS冲洗3×5 min, 50%的甘油封片. 激光共聚焦显微镜下观察并摄片.

1.2.5 细胞内总RNA的提取: 在去除上清液的培养皿中加入1 mL TRIzol混匀, 移出细胞裂解物于EP管中, 加入0.2 mL氯仿, 室温孵育3 min, 4℃ 12 000 r/min离心15 min, 吸取上清至新管加入等体积的异丙醇, 在-20℃下放置30 min, 4℃ 12 000 r/min离心10 min, 在管底部可见微量的RNA沉淀, 弃上清, 加入750 mL/L的乙醇1 mL, 振荡7 500 r/min 4℃下离心10 min, 弃上清室温干燥5-10 min, 分光光度计测定260 nm、280 nm的吸光度(A)值. 求出A_{260/280}比值.

1.2.6 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR): 取9 μL RNA为模板, 加入MgCl₂ 2 μL、10×RT Buffer 1 μL、dNTP 1 μL、Rnase Inhibitor 0.25 μL、AMV Reverse Transcriptase 0.5 μL、Random 9 mers 0.5 μL、RNase free H₂O 0.5 μL混匀后30℃ 10 min, 42℃ 60 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min逆转录合成cDNA, 再以他为模板进行聚合酶链反应, 反应体系如下: 5×Buffer 2.5 μL、聚合酶Ex Tap HS 0.125 μL、H₂O 3.875 μL、cDNA 5 μL、

上游表达引物0.5 μL、下游表达引物0.5 μL. P2X₇基因引物的反应条件: 94℃ 30 s(94℃ 30 s, 55.5℃ 30 s, 72℃ 30 s)×35循环, 72℃ 5 min. c-Kit基因引物的反应条件: 94℃ 30 s(94℃ 30 s, 57.5℃ 30 s, 72℃ 30 s)×35循环, 72℃ 5 min. 取出12 μL聚合酶链反应产物以1.5%的琼脂凝胶进行电泳分析. RT-PCR引物和内参由上海生工生物技术有限公司合成, c-Kit基因上游引物为5'-CGCCTGCCGAAATGTATGACG-3', 下游引物为5'-GGTCTCTGGGTTGGGGTTGC-3', P2X₇基因上游引物为5'-CCAAGCCGACGTTG AAGTAT-3', 下游引物为5'-AGAGCTTGAGG TGGTGATG-3'. 分析内参3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列上游引物为5'-GTCTTCACC ACCATGGAGA-3', 下游引物为5'-AAGCAGTT GGTGGTGCAG-3'.

2 结果

2.1 P2X₇受体在ICC上的表达 图1A说明P2X₇受体在该细胞上免疫反应是阳性的, c-Kit是ICC的特异性标记, 所以图1B说明该细胞就是ICC, 图1C则说明P2X₇与c-Kit共表达于该细胞, 也就意味着P2X₇受体在ICC上免疫反应是阳性的.

2.2 高糖对ICC的形态的影响 与正常组比较, 加入葡萄糖后的ICC细胞变圆, 突起变短, 与周围细胞的网络连接减少(图2).

■创新盘点

P2X₇受体存在于多种细胞组织中,但关于其是否存在于ICC国内外鲜有报道,本研究证实他表达于体外培养的ICC,且高糖使ICC的c-Kit表达减弱,P2X₇表达增强,从而为研究糖尿病胃肠动力障碍提供理论依据。

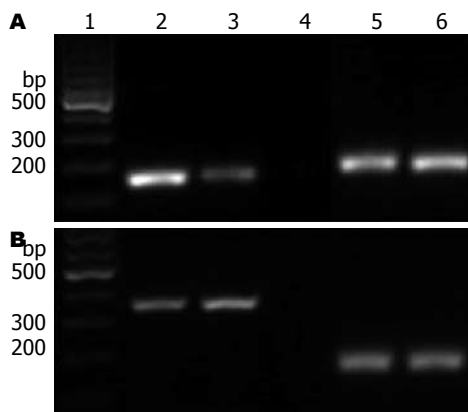


图3 c-Kit及P2X₇基因表达图。A: c-Kit; B: P2X₇; 1: Marker; 2: 对照组; 3: 高糖组; 4: 标本+水; 5: 对照组GAPDH; 6: 高糖组GAPDH。

2.3 P2X₇受体在ICC上的表达及高糖对ICC上c-Kit受体和P2X₇受体的表达的影响 分别比较图3六个条带可以得出: P2X₇表达于ICC, 高糖使c-Kit在ICC的表达减弱, 同时使P2X₇的表达增强(图3)。

3 讨论

ICC是胃肠运动的起搏细胞, 是其基本电节律的起搏器, 也参与其传导, 并对神经肌肉传导起重要调节作用^[8,9], 他以网络状分布于胃肠道, 在胃肠道运动中发挥着关键作用。ICC的体外培养一直是个难题, 我们成功建立了一套小鼠胃肠ICC的分离培养方法, 并提出实验过程中应当注意选择适当天龄的小鼠、尽量减小机械化学损伤、避免污染等问题^[10-15]。

本实验观察到加入高糖后的ICC细胞变大, 突起变短, 与周围细胞的网络连接减少, 这与国内文献报道结果是一致的^[16]。有研究表明在DM胃肠动力障碍患者的ICC数量减少、形态和网状结构出现改变^[2,3,17]。这为高糖改变细胞功能提供了重要的形态学依据。另外RT-PCR研究也发现高糖使c-Kit在ICC的表达减弱, 进一步从量的变化表明高糖影响了ICC的功能。

嘌呤受体分为P1和P2, 其中前者以腺苷为配体, 后者则以ATP/ADP为配体。迄今为止, 已有P1受体的4种亚型(A, A₂, A₂, A₃)、P2X受体的7种亚型(P2X₁、P2X₂、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆和P2X₇)、P2Y受体的8种亚型(P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆、P2Y₁₁、P2Y₁₂、P2Y₁₃和P2Y₁₄)被克隆^[18]。P2X₇受体是具有595个氨基酸(AA)的蛋白质, 有着独特的C-末端(239AA), 比其他嘌呤受体长的多, 而没有更长的跨膜疏水

区, 与其他已知蛋白质也没有同源性, 这可能是其具有独特功能的分子基础^[19]。他广泛地表达于造血系统细胞如多能造血干细胞、肥大细胞、淋巴细胞等。也表达与多种正常的组织如心、脑、脾血管平滑肌等和一些肿瘤如神经母细胞瘤细胞等, 另外, 近几年已分别从大鼠神经细胞、小鼠神经胶质细胞和人单核细胞克隆出来鼠或人P2X₇受体, 但是否表达于ICC, 国内外鲜有报道。c-Kit是ICC细胞的一个特异性受体, 在胃肠道95%以上的c-Kit阳性细胞是ICC细胞^[20], 我们用c-Kit抗体和P2X₇受体抗体免疫荧光双标方法和RT-PCR的方法都证实了P2X₇受体表达于体外培养的小肠ICC上。嘌呤能受体在胃肠道运动中有着重要的功能, 国内黄旭等认为P2X受体激动剂通过P2X受体抑制豚鼠胃窦环形肌自发性收缩或者对他具有舒张作用, 其作用机制不依赖内在神经, 也不依赖细胞膜离子通道以及膜电位改变^[21]。在大鼠, ATP可以通过P2Y受体介导远端胃的收缩, 通过P2X受体介导其舒张^[22]。P2X受体能调节小鼠胃的收缩或舒张^[4], P2X受体激动剂可以通过平滑肌上的P2X受体介导小鼠和犬类回肠平滑肌的收缩^[5,23]。P2Y₁和P2Y₂受体可以调节小鼠回肠平滑肌的舒张, 另外回肠平滑肌的舒张还受一种不确定的对 α 、 β -MeATP敏感的P2Y受体调节^[5]。在大鼠, ATP可以通过P2Y受体引起远端结肠的舒张^[6]。P2X₂受体可以调节小鼠结肠平滑肌的收缩^[5]。总之, 嘌呤受体在不同物种、不同胃肠道部位所介导的平滑肌的反应不同, 或者兴奋或者抑制。

作为胃肠道起搏细胞的ICC, 关于其起搏电流的机制尚存在争议, 如以加拿大学者Huizinga为代表的学者们认为ICC起搏电流的产生与钙敏感氯电流有关^[24], 而以Sanders为代表的美国学者们认为ICC起搏电流与非选择阳离子电流有关^[25]。P2X受体是配体门控离子通道, 他的激活可以打开非选择性离子通道^[19,26], 作为P2X的一员, 与其他受体不同的是, P2X₇具有双功能, 他既是离子通道, 又允许小分子有机离子通过^[26], 而且具有非选择性的特性, 对一价、二价阴阳离子均可通过^[27]。近年来有研究表明P2X₇受体存在于神经元上且发挥着一定的功能^[28-33], 另外有关药理学研究证明他可以影响神经递质释放和神经损伤, 调节突触后联系^[34]。ICC虽是一种特殊的间质细胞, 形态上同神经细胞很相似, 胞体有锥形的、三角形的、多边形的, 有像神经突触一样的突起, 突起之间又相互联系呈网状,

在功能上也类似于神经细胞, 如他是胃肠运动基本电节律的起搏器, 也参与其传导, 并对神经肌肉传导起重要调节作用. 我们已经证实P2X₇在ICC上有表达, 那么他有可能参与了ICC功能的调节.

另外本研究RT-PCR结果提示高糖增加了P2X₇受体的表达. 有研究观察到, 在链脲菌素所致DM大鼠胃上给予透壁性神经刺激时, 平滑肌的电记录显示其抑制性神经肌肉接头电位的振幅减小, 且不产生兴奋性接头电位. 由ATP引起的超极化在链脲菌素所致DM大鼠和非控制的盲肠环行肌组是相似的, 只是在DM组织上抑制性接头点位的超极化频率相对慢些. 虽然来自胃底的ATP引起的胃底纵行肌舒张在DM组和正常组之间并没有明显的不同, 但是刺激引起的ATP释放增加了3倍. 在胃底, 对ATP受体使用 α , β 亚甲基-ATP酶进行脱敏, 可以使得他对ATP和电刺激引起的舒张反应减弱, 这说明ATP在大鼠胃底的NANC神经传递中发挥一定的作用, 而这一减弱现象在DM鼠上更为明显. 这些资料表明在DM大鼠上嘌呤受体元件可能是增加的^[35]. 这与我们的结果也是相似的.

总之, 高糖损伤了ICC细胞形态与功能, 同时使P2X₇受体的表达增强, 这可能在DM胃肠动力障碍的发生发挥了一定的作用.

4 参考文献

- 1 Camilleri M. Advances in diabetic gastroparesis. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; 2: 47-56
- 2 Yamamoto T, Watabe K, Nakahara M, Ogiyama H, Kiyohara T, Tsutsui S, Tamura S, Shinomura Y, Hayashi N. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 660-667
- 3 Miller SM, Narasimhan RA, Schmalz PF, Soffer EE, Walsh RM, Krishnamurthi V, Pasricha PJ, Szurszewski JH, Farrugia G. Distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in normal and diabetic human appendix. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 349-357
- 4 Mulè F, Naccari D, Serio R. Evidence for the presence of P2y and P2x receptors with different functions in mouse stomach. *Eur J Pharmacol* 2005; 513: 135-140
- 5 Giaroni C, Knight GE, Ruan HZ, Glass R, Bardini M, Lecchini S, Frigo G, Burnstock G. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1313-1323
- 6 Christofi FL, Wunderlich J, Yu JG, Wang YZ, Xue J, Guzman J, Javed N, Cooke H. Mechanically evoked reflex electrogenic chloride secretion in rat distal colon is triggered by endogenous nucleotides acting at P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J Comp Neurol* 2004; 469: 16-36
- 7 Petrakis IE, Vrachassotakis N, Sciacca V, Vassilakis SI, Chalkiadakis G. Hyperglycaemia attenuates erythromycin-induced acceleration of solid-phase gastric emptying in idiopathic and diabetic gastroparesis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 396-403
- 8 Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, Mine T, Fujino MA, Ohno S. The interstitial cells of Cajal and a gastroenteric pacemaker system. *Arch Histol Cytol* 2002; 65: 1-26
- 9 Hanani M, Freund HR. Interstitial cells of Cajal-their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand* 2000; 170: 177-190
- 10 Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, Huizinga JD. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1999; 277: G409-G423
- 11 Mikkelsen HB, Malysz J, Huizinga JD, Thuneberg L. Action potential generation, Kit receptor immunohistochemistry and morphology of steel-Dickie (Sl/Sld) mutant mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 11-26
- 12 Ordög T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 257-269
- 13 Ward SM, Ordög T, Bayguinov JR, Horowitz B, Epperson A, Shen L, Westphal H, Sanders KM. Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* 1999; 117: 584-594
- 14 Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. *J Neurosci Res* 2000; 59: 384-401
- 15 高显奎, 余跃, 李京培, 王巧民. 胃Cajal间质细胞的分离和培养. *安徽医科大学学报* 2009; 44: 522-524
- 16 侯艳, 范玲玲, 杜军, 林琳, 戈应滨. 高糖对体外培养的Cajal间质细胞nNOS、HO-2表达的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2007; 27: 1102-1105
- 17 Lin L, Xu LM, Zhang W, Ge YB, Tang YR, Zhang HJ, Li XL, Chen JD. Roles of stem cell factor on the depletion of interstitial cells of Cajal in the colon of diabetic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G241-G247
- 18 Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 793-803
- 19 Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996; 272: 735-738
- 20 Ohshiro K, Yamataka A, Kobayashi H, Hirai S, Miyahara K, Sueyoshi N, Suda K, Miyano T. Idiopathic gastric perforation in neonates and abnormal distribution of intestinal pacemaker cells. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 673-676
- 21 黄旭, 张扬, 高玲, 赵鹏, 韩燕飞, 许文燮. P2X受体对豚鼠胃窦环行肌自发性收缩运动的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1185-1190
- 22 Otsuguro K, Ito S, Ohta T, Nakazato Y. Influence of purines and pyrimidines on circular muscle of the rat proximal stomach. *Eur J Pharmacol* 1996; 317: 97-105
- 23 Lee HK, Ro S, Keef KD, Kim YH, Kim HW, Horowitz B, Sanders KM. Differential expression of P2X-purinoceptor subtypes in circular and longitudinal muscle of canine colon. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 575-584
- 24 Zhu Y, Mucci A, Huizinga JD. Inwardly rectifying chloride channel activity in intestinal pacemaker

■应用要点

本研究可能为探讨糖尿病胃肠动力障碍发生机制提供新的理论依据, ICC上表达的P2X₇受体成为其一个新的治疗靶点.

■同行评价

本研究选题新颖,设计合理,结果可靠,具有较好的参考价值。

- cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G809-G821
- 25 Koh SD, Jun JY, Kim TW, Sanders KM. A Ca(2+)-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J Physiol* 2002; 540: 803-814
- 26 Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 5482-5486
- 27 Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265: C577-C606
- 28 Brändle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 62: 106-109
- 29 Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 2001; 21: 7143-7152
- 30 Ishii K, Kaneda M, Li H, Rockland KS, Hashikawa T. Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina. *J Comp Neurol* 2003; 459: 267-277
- 31 Moores TS, Hasdemir B, Vega-Riveroll L, Deuchars J, Parson SH. Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction. *Brain Res* 2005; 1034: 40-50
- 32 Sperlág B, Köfalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Vizi ES. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem* 2002; 81: 1196-1211
- 33 Deng Z, Fyffe RE. Expression of P2X7 receptor immunoreactivity in distinct subsets of synaptic terminals in the ventral horn of rat lumbar spinal cord. *Brain Res* 2004; 1020: 53-61
- 34 Anderson CM, Nedergaard M. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci* 2006; 29: 257-262
- 35 Belai A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1991; 194: 225-234

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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 2009-03-26)

食管鳞癌clusterin表达及其临床意义

宋振梅, 孙玉琳, 毛友生, 刘芳, 周兰萍, 赵晓航

宋振梅, 孙玉琳, 刘芳, 周兰萍, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
宋振梅, 中日友好医院消化内科 北京市 100029
毛友生, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院胸部外科 北京市 100021
赵晓航, 中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心 北京市 100037
宋振梅, 医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病研究。
国家高技术发展计划“863”基金资助项目, No. 2008DFA31130, No. 2006AA02A403
国家自然科学基金资助项目, No. 30721001, No. 30772507
作者贡献分布: 主要实验操作由宋振梅、刘芳及周兰萍完成; 数据分析和论文起草由孙玉琳完成; 病例采集由毛友生完成; 赵晓航负责实验设计、论文修改和审阅。
通讯作者: 赵晓航, 研究员, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室, zhaoxh@cicams.ac.cn
电话: 010-67709015 传真: 010-87778360
收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-03-18
接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-28

Clinical significance of clusterin expression in esophageal squamous cell carcinoma

Zhen-Mei Song, Yu-Lin Sun, You-Sheng Mao, Fang Liu, Lan-Ping Zhou, Xiao-Hang Zhao

Zhen-Mei Song, Yu-Lin Sun, Fang Liu, Lan-Ping Zhou, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Zhen-Mei Song, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

You-Sheng Mao, Department of Thoracic Surgery, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Xiao-Hang Zhao, Center for Basic Medical Sciences, Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100037, China
Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863), Nos. 2008DFA31130 and 2006AA02A403; and the National Natural Science Foundation of China, Nos. 30721001 and 30772507

Correspondence to: Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. zhaoxh@cicams.ac.cn
Received: 2010-01-11 Revised: 2010-03-18
Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of clusterin

mRNA in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), measure preoperative and postoperative serum clusterin protein levels in ESCC patients, and evaluate their correlations with clinicopathological parameters in ESCC.

METHODS: The expression of full-length clusterin mRNA in ESCC tissue was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum clusterin level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The expression of clusterin mRNA was significantly down-regulated in ESCC tissue compared with matched tumor-adjacent non-cancerous tissue. The median level of serum clusterin in postoperative ESCC patients was significantly higher than that in preoperative patients (25.71 mg/L vs 3.23 mg/L, $P < 0.0001$). The level of serum clusterin is correlated with tumor size, but not with age, gender, tumor differentiation, tumor grade, lymph node metastasis and biochemical parameters.

CONCLUSION: The expression of clusterin mRNA is down-regulated in ESCC. Serum clusterin level decreases in ESCC patients. Clusterin might be a potential tumor suppressor gene in ESCC. Dynamic measurement of serum clusterin level might aid to evaluate the progression of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Clusterin; Two-dimensional eletrophoresis

Song ZM, Sun YL, Mao YS, Liu F, Zhou LP, Zhao XH. Clinical significance of clusterin expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1217-1221

摘要

目的: 探讨食管鳞癌组织clusterin表达和单纯手术治疗前后外周血clusterin含量变化与食管鳞癌临床参数的相关性。

方法: RT-PCR分析5对食管鳞癌及其远端切缘食管上皮中clusterin基因mRNA表达水平;

■背景资料

近年来发现, clusterin除了分泌型以外, 还具有几种其他的表达形式, 涉及多种病理生理过程并参与多种疾病的演进。作者前期工作也发现, 食管鳞状细胞癌患者血清clusterin水平与健康对照相比明显降低, 而经手术切除原发肿瘤病灶后, 其表达水平明显回升。

■同行评议者

苒新明, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科

■ 研发前沿

Clusterin具有多种不同的剪切异构体,在多种肿瘤中存在异常表达。目前发现,食管鳞状细胞癌患者血清clusterin水平明显降低,但在术前和术后的表达差异以及与临床参数的相关性尚无深入研究。

ELISA分析41例单纯手术治疗食管鳞癌患者治疗前后的血清clusterin蛋白表达水平及其与临床特征的相关性。

结果:与正常食管上皮相比食管鳞癌组织中clusterin基因表达显著下降或缺失。食管鳞癌患者术前血清中clusterin含量明显低于术后血清含量(3.23 mg/L vs 25.71 mg/L, $P < 0.0001$)。食管鳞癌患者术前血清clusterin含量与肿瘤大小相关($P < 0.01$),而与年龄、性别、分化程度、肿瘤分期、淋巴结转移,以及总蛋白、白蛋白、血糖、血脂和总胆红素浓度无关($r = -0.1334, -0.1602, 0.2413, 0.0389, -0.2882$, 均 $P > 0.05$)。

结论:Clusterin基因在食管鳞癌组织中表达明显下调或缺失,血清clusterin含量明显降低,提示在食管鳞状细胞癌中clusterin基因可能具有潜在的抑癌基因作用,动态检测外周血clusterin含量有助于判断食管癌进展。

关键词:食管鳞状细胞癌; Clusterin; 双向电泳

宋振梅, 孙玉琳, 毛友生, 刘芳, 周兰萍, 赵晓航. 食管鳞癌 clusterin 表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1217-1221
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1217.asp>

0 引言

分离和鉴定新的肿瘤相关标志分子,尤其是血清中的标志分子一直是基础和临床医学的研究热点。我们在前期工作中,通过双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术发现食管鳞状细胞癌患者血清clusterin水平与健康对照相比明显降低,而经手术切除原发肿瘤病灶后,其表达水平明显回升^[1,2]。clusterin,又称为载脂蛋白J(apolipoprotein J, ApoJ)、硫酸化糖蛋白2(sulfated glycoprotein 2, SGP-2)、补体相关蛋白SP-40(complement-associated protein SP-40, SP-40)等^[3], Blaschuk等于1983年首次将其从山羊睾丸网液中分离,因其可引起培养的睾丸支持细胞和红细胞的聚集,故命名为clusterin^[4]。血清/血浆中的clusterin是一种中高丰度的75-80 kDa异二聚体糖蛋白,正常成年人的平均浓度约为100 mg/L^[5]。近年来发现,除了分泌型以外,正常和转化细胞中clusterin还具有几种其他的表达形式,涉及多种病理生理过程并参与多种疾病的演进^[6]。clusterin在肿瘤发生发展过程中的作用及变化特点也是国内外近年来关注的热

点。本研究采用RT-PCR方法评价了食管鳞癌配对组织中clusterin mRNA的表达变化,同时采用ELISA方法分析了41例患者手术治疗前后配对血清样本中clusterin的表达变化,并进一步分析了术前clusterin水平与各种临床参数的相关性,对深入理解和评价clusterin在食管鳞癌中的表达变化及其机制具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 RNeasy mini kit购自美国QIAGEN公司; Superscript First Chain反转录kit购自美国invitrogen公司。人clusterin ELISA试剂盒购自美国LIFEKEY生物医学技术公司。食管鳞状细胞癌/癌旁远端配对组织和术前、术后7-10 d的配对血清样本取自中国医学科学院肿瘤医院胸外科单纯手术治疗患者,并经病理证实。组织标本一经分离,迅速去除坏死及结缔组织,经预冷的生理盐水多次清洗后液氮速冻,转入-80 °C冰箱保存。血清取材后迅速离心,冰上分离血清,干冰上分装后转入-80 °C冰箱保存备用。患者平均年龄58.2(39-79)岁,其中男25例,女16例。病例取材得到患者本人知情同意,患者术前未接受输血和化疗。

1.2 方法

1.2.1 半定量RT-PCR:食管癌组织及其配对正常食管上皮总RNA的提取按照QIAGEN试剂盒说明书进行。经1.2%变性甲醛凝胶RNA电泳,观察RNA质量。以所提RNA为模板逆转录获得cDNA第一条链。clusterin及内参GAPDH引物参照GenBank基因序列设计。clusterin基因上游引物5'-CCG GAT CCT TAT GAT GAA GAC TCT GCT GCT G-3',下游引物5'-GCC TCG AGT CAC TCC TCC CGG TGC TTT TTG-3'以及GAPDH上游引物5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'由上海博亚生物技术有限公司合成,扩增产物大小分别为1 365 bp和452 bp。PCR反应在GeneAmp PCR system 9600基因扩增仪(美国Applied Biosystems公司)上进行。反应体系25 μL,反应条件为95 °C预变性5 min; 95 °C变性40 s, 62 °C退火40 s, 72 °C延伸90 s, 35个循环; 72 °C延伸8 min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.2 ELISA法分析clusterin血清含量:血清样品及标准品分别稀释后各10 μL加至反应孔,室温孵育1 h后每孔加入100 μL酶结合物轻混30 s。室

■ 创新盘点

本研究发现clusterin全长转录本在食管癌中表达下调,同时术前患者血清clusterin水平明显低于健康人,而手术后的表达量较术前显著增加,因此推测其在食管癌中可能是一种潜在的抑癌基因。

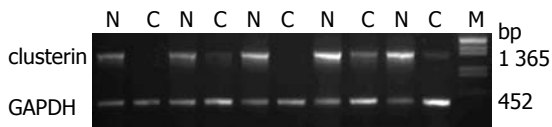


图1 食管鳞癌及配对组织中clusterin的表达. N: 正常食管上皮; C: 食管鳞癌组织; M: Marker.

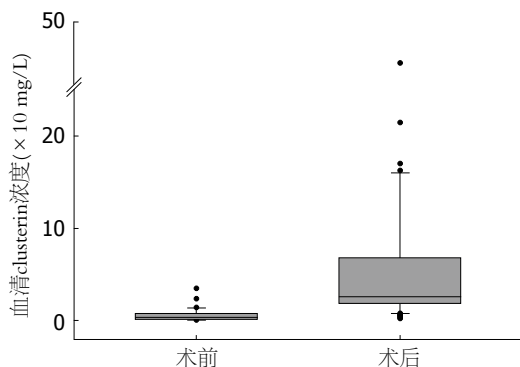


图2 食管癌术前术后配对血清clusterin浓度分布箱式图. 纵坐标分别代表术前和术后两组配对样本中血清clusterin的分布情况. 每个箱子中间的线代表中位数, 上下边界分别代表第75和25百分位数, 箱子上下短线分别代表最大和最小值, 圆点代表异常值.

温孵育45 min, 反复洗涤5次; 加入100 μL TMB显色液轻混10 s; 室温孵育20 min后每孔加入100 μL终止液轻混30 s; 确定颜色由蓝变黄后30 min内, 酶标仪(Bio-rad公司)上读取A_{450nm}. 根据试剂盒标准品的浓度和A值绘制标准曲线. 根据样品A值, 计算血清样品中clusterin浓度并进行统计学分析. 每个样本重复3次, 取平均值作为该样本的血清clusterin浓度.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计分析软件进行数据的整理与分析, 计数资料根据适用情况选择Student's *t*检验, Mann-Whitney或Wilcoxon符号秩和检验, 计量资料采用Fisher's精确概率法或配对χ²检验, 两组样本的相关性分析使用Spearman等级相关检验. 其中, 血清clusterin浓度与年龄的相关性使用Spearman等级相关检验, 与性别的关系使用Mann-Whitney秩和检验. *P*<0.05为具有统计学差异.

2 结果

2.1 食管鳞癌及配对正常食管上皮clusterin基因的表达 提取5对配对食管癌组织的总RNA, 经变性甲醛凝胶电泳分析提示RNA无降解, 质量可靠. 半定量RT-PCR结果表明5对食管鳞癌组织中均存在clusterin基因表达降低或缺失(图1).

2.2 食管癌患者手术前后血清clusterin水平的比较分析 食管鳞癌患者术前血清clusterin浓度

表1 食管癌不同临床参数与血清clusterin含量的关系

	<i>n</i>	clusterin中位浓度(mg/L)	范围(mg/L)	<i>P</i> 值
年龄(岁)				
≤60	23	3.23	0.22-23.50	0.9476
>60	18	3.14	0.30-34.70	
性别				
男	25	3.23	0.30-14.38	0.9680
女	16	3.10	0.22-34.70	
肿瘤直径(cm)				
<5.0	17	2.54	0.22-23.50	0.0290
≥5.0	24	3.91	0.71-34.70	
浸润深度				
T ₁	7	4.05	0.22-23.50	0.9310
T ₂₋₄	34	3.14	0.30-34.70	
淋巴结转移				
有	29	3.24	0.71-34.70	0.2577
无	12	1.87	0.22-23.50	
分化程度				
高	18	2.02	0.30-34.70	0.1120
中低	23	3.58	0.22-23.50	

中位值为3.23 mg/L(浓度范围0.22-34.70 mg/L); 术后血清浓度中位值为25.71 mg/L(浓度范围1.81-490.15 mg/L), 经过Wilcoxon符号秩和检验, 差异具有极显著性(*P*<0.0001), 表明食管鳞癌患者术前血清clusterin浓度明显降低, 术后1 wk伴有明显回升(图2). 而且, 无论是术前还是术后, 血清clusterin浓度均与年龄和性别无关(*P*>0.05).

2.3 术前血清clusterin含量与主要临床参数的相关性分析 食管癌患者术前血清clusterin含量与肿瘤大小相关(*P*<0.05), 而与患者性别、年龄、肿瘤浸润深度与分化程度, 以及是否伴有淋巴结转移等因素无关(*P*>0.05, 表1).

2.4 不同因素对食管癌患者术前血清clusterin浓度的影响 经Spearman等级相关检验结果显示血清clusterin水平与血清总蛋白、白蛋白、血糖、血脂和胆红素水平均无明显相关(*P*>0.05, 表2).

3 讨论

人类clusterin基因定位于8p21-p12, 与脂蛋白脂酶基因座邻近^[7], 研究表明多种类型的肿瘤, 包括肝癌、食管癌、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和白血病等在该区域往往发生高频率的染色体缺失, 因此推测该区可能存在一个或多个抑癌基因^[8]. 根据Ensembl基因组数据库和文献的记录, 目前至少发现了3种clusterin的剪切异构体, 编码细胞内前体

应用要点

Clusterin全长转录本和血清蛋白水平在食管鳞状细胞癌患者中均明显降低, 提示他可能是一种抑癌基因, 同时其血清水平可用于食管癌患者的诊断和治疗效果监测.

■名词解释

1 成熟分泌型 clusterin: 简称 sCLU, 是相对分子质量约 75-80 kDa 异二聚体血清/血浆糖蛋白, 由通过二硫键连接的 α 和 β 链组成。

2 细胞内前体 clusterin: 简称 psCLU, 定位于细胞质, 是相对分子质量约 60 kDa 的单链分子, 不具有信号肽。

3 细胞核型 clusterin (nCLU): 是定位于细胞核内的相对分子质量约 50 kDa 的截短型蛋白形式。

表 2 术前血清 clusterin 水平与总蛋白、白蛋白、血糖、血脂和总胆红素浓度间的相关分析

血清生化指标	r值	P值
总蛋白	-0.1334	0.4285
白蛋白	-0.1602	0.3411
血糖	0.2413	0.1435
血脂	0.0389	0.8178
总胆红素	-0.2582	0.1220

clusterin(简称psCLU)、成熟分泌型clusterin(简称sCLU)和细胞核型clusterin(nCLU)等多种蛋白形式^[9,10]。Clusterin基因在不同物种间具有高度的同源性,在人体体液和组织细胞中广泛表达,参与多种重要生理功能,包括组织分化和重塑、膜再生、脂类转运、细胞-细胞及细胞-细胞外基质相互作用、炎症、细胞运动、分子伴侣、细胞氧化应激、细胞增殖、细胞死亡等^[11-15]。由于其复杂的转录和翻译形式以及亚细胞定位依赖性的多种功能,clusterin被称为“迷样”基因。近年来认为,clusterin也是一种凋亡相关蛋白,sCLU和nCLU分别促进细胞存活及凋亡过程,他们的表达变化决定了细胞命运^[10]。因此,clusterin表达水平与肿瘤的关系也受到广泛关注。目前发现,clusterin在食管鳞状细胞癌、睾丸精原细胞癌、前列腺癌中表达下调,在胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌等肿瘤中表达上调^[2,10,16-21]。

在杂合或纯合缺失clusterin的神经母细胞瘤小鼠模型中,抑制miR-17-92的表达,结果发现携带0个或1个clusterin等位基因的小鼠比起具有2个等位基因的小鼠更容易发展为肿瘤并发生肝脏及骨髓转移,提示clusterin是一种单倍不足的肿瘤抑制基因^[22]。还有学者研究发现clusterin衍生蛋白抑制多种肿瘤细胞系的增殖,并显著增强肿瘤异种移植模型中抗细胞增殖药物活性^[23]。而且,膀胱癌、卵巢癌、食管癌、宫颈癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤中的研究结果还提示组织中psCLU和sCLU表达水平同肿瘤分化程度、病理分级、患者的不良预后和化疗敏感性有关^[20,21,24-30]。最近的研究结果还发现,sCLU是TGF- β 诱导的肿瘤细胞上皮间叶转换(epithelial-to-mesenchymal transition)中重要的细胞外中介者,体内实验显示,使用其中和抗体治疗后,明显降低了裸鼠乳腺癌移植瘤模型的肺转移发生率,提示其在肿瘤转移中具有重要作用,有望发展为新的抗肿瘤转移药靶^[31]。但是,血清clusterin

浓度在食管癌患者手术治疗前后的变化趋势目前还无深入研究。我们运用半定量RT-PCR分析了5对配对食管鳞癌及正常食管上皮中clusterin基因的表达情况,结果显示clusterin在食管鳞癌组织表达降低或缺失。虽然前面已经提到,clusterin基因转录本具有多种剪切异构体,但本研究中使用的引物扩增的是clusterin全长转录本。由于他在食管癌中表达下调,推测clusterin基因缺失促进了食管肿瘤细胞的癌变和进展。

此外,本研究初步测定了食管鳞癌患者手术治疗前后的血清clusterin水平,发现术前血清clusterin水平明显低于文献报道的健康人正常血清clusterin水平,而手术后的表达量较术前显著增加,结合临床资料分析,clusterin水平与肿瘤大小相关。由于clusterin基因所在染色体区段在食管癌中通常发生缺失,而且在乳腺癌中的研究也表明DNA甲基化是调控clusterin表达的重要表观遗传方式^[32],故而食管癌组织中全长转录本及患者血清中成熟分泌型蛋白的表达下调均提示clusterin在食管癌中可能是一种潜在的抑癌基因。但是,也应充分认识到上述结果仍有待于进一步扩大样本以确定合适的血清clusterin检测阈值,并使结果更趋精确。而且,导致clusterin基因在食管癌中表达下调,以及手术切除肿瘤原发病灶后血清clusterin含量有所回升的机制仍需进一步探索。

4 参考文献

- Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 650-654
- He HZ, Song ZM, Wang K, Teng LH, Liu F, Mao YS, Lu N, Zhang SZ, Wu M, Zhao XH. Alterations in expression, proteolysis and intracellular localizations of clusterin in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1387-1391
- Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1430-1448
- Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 258: 7714-7720
- Bettuzzi S, Rizzi F. Chapter 5: Nuclear CLU (nCLU) and the fate of the cell. *Adv Cancer Res* 2009; 104: 59-88
- Balantinou E, Trougakos IP, Chondrogianni N, Margaritis LH, Gonos ES. Transcriptional and posttranslational regulation of clusterin by the two main cellular proteolytic pathways. *Free Radic Biol*

- Med* 2009; 46: 1267-1274
- 7 Leskov KS, Klokov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 11590-11600
 - 8 Xiao WH, Liu WW. [Analysis of methylation and loss of heterozygosity of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma and its clinical significance] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 227-230
 - 9 Rizzi F, Coletta M, Bettuzzi S. Chapter 2: Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins. *Adv Cancer Res* 2009; 104: 9-23
 - 10 Pucci S, Bonanno E, Sesti F, Mazzarelli P, Mauriello A, Ricci F, Zoccai GB, Rulli F, Galatà G, Spagnoli LG. Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2807-2815
 - 11 Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13: 12-19
 - 12 Trougakos IP, Lourda M, Agiostratidou G, Kletsas D, Gonos ES. Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 436-449
 - 13 Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res* 2006; 40: 1324-1334
 - 14 Shin YJ, Kim JH, Seo JM, Lee SM, Hyon JY, Yu YS, Wee WR. Protective effect of clusterin on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2009; 15: 2789-2795
 - 15 Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 427-431
 - 16 Behrens P, Jeske W, Wernert N, Wellmann A. Downregulation of clusterin expression in testicular germ cell tumours. *Pathobiology* 2001; 69: 19-23
 - 17 Scaltriti M, Brausi M, Amorosi A, Caporali A, D'Arca D, Astancolle S, Corti A, Bettuzzi S. Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 23-30
 - 18 Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 393-399
 - 19 Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2002; 25: 234-238
 - 20 Yang GF, Li XM, Xie D. Overexpression of clusterin in ovarian cancer is correlated with impaired survival. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 1342-1346
 - 21 Miyake H, Gleave M, Kamidono S, Hara I. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 2002; 59: 150-154
 - 22 Chayka O, Corvetta D, Dews M, Caccamo AE, Piotrowska I, Santilli G, Gibson S, Sebire NJ, Himoudi N, Hogarty MD, Anderson J, Bettuzzi S, Thomas-Tikhonenko A, Sala A. Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 663-677
 - 23 Kliger Y, Levy O, Oren A, Ashkenazy H, Tiran Z, Novik A, Rosenberg A, Amir A, Wool A, Toporik A, Schreiber E, Eshel D, Levine Z, Cohen Y, Nold-Petry C, Dinarello CA, Borukhov I. Peptides modulating conformational changes in secreted chaperones: from in silico design to preclinical proof of concept. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13797-13801
 - 24 Chen Y, Lim BK, Hashim OH. Different altered stage correlative expression of high abundance acute-phase proteins in sera of patients with epithelial ovarian carcinoma. *J Hematol Oncol* 2009; 2: 37
 - 25 He LR, Liu MZ, Li BK, Rao HL, Liao YJ, Zhang LJ, Guan XY, Zeng YX, Xie D. Clusterin as a predictor for chemoradiotherapy sensitivity and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 2354-2360
 - 26 Watari H, Kanuma T, Ohta Y, Hassan MK, Mitamura T, Hosaka M, Minegishi T, Sakuragi N. Clusterin Expression Inversely Correlates with Chemosensitivity and Predicts Poor Survival in Patients with Locally Advanced Cervical Cancer Treated with Cisplatin-Based Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Hysterectomy. *Pathol Oncol Res* 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]
 - 27 Yom CK, Woo HY, Min SY, Kang SY, Kim HS. Clusterin overexpression and relapse-free survival in breast cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3909-3912
 - 28 Miyake H, Muramaki M, Furukawa J, Kurahashi T, Fujisawa M. Serum level of clusterin and its density in men with prostate cancer as novel biomarkers reflecting disease extension. *Urology* 2010; 75: 454-459
 - 29 Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: R1-R17
 - 30 Panico F, Rizzi F, Fabbri LM, Bettuzzi S, Luppi F. Clusterin (CLU) and lung cancer. *Adv Cancer Res* 2009; 105: 63-76
 - 31 Lenferink AE, Cantin C, Nantel A, Wang E, Durocher Y, Banville M, Paul-Roc B, Marcil A, Wilson MR, O'Connor-McCourt MD. Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies. *Oncogene* 2010; 29: 831-844
 - 32 Serrano A, Redondo M, Tellez T, Castro-Vega I, Roldan MJ, Mendez R, Rueda A, Jimenez E. Regulation of clusterin expression in human cancer via DNA methylation. *Tumour Biol* 2009; 30: 286-291

■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 方法先进, 数据处理可靠, 结论可信, 有一定创新性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Wnt-5a基因在胃癌中的表达及意义

刘晓红, 曹智新, 耿明, 曹永成, 王义, 辛萱, 王翠翠, 毕利泉

■背景资料

Wnt途径的组成框架和活化机制已有相对完整的解释, 人们认识到Wnt途径并不是以前设想的线性通路, 而是一条多环节、多作用位点的开放式途径, 该途径中多种蛋白的作用机制远未明确, 比如Wnt-5a, 对其研究尚处于起步阶段。本文对胃癌组织中Wnt-5a基因转录和翻译水平的变化进行检测和分析。目前相关研究鲜见报道。

刘晓红, 曹智新, 耿明, 曹永成, 王义, 辛萱, 王翠翠, 毕利泉, 中国人民解放军济南军区总医院病理科 山东省济南市250031

刘智红, 2005年中国人民解放军第二军医大学博士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的病理研究。

山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2009CM041

作者贡献分布: 刘晓红与曹智新对本文所作贡献均等; 此课题由刘晓红、曹智新及耿明设计; 研究过程由曹智新、曹永成、王义、辛萱、王翠翠及毕利泉操作完成; 数据分析由刘晓红与曹智新完成; 本论文由刘晓红、曹智新及耿明完成。

通讯作者: 耿明, 250031, 山东省济南市师范路25号, 中国人民解放军济南军区总医院病理科. gm2227@sina.com

电话: 0531-51666857 传真: 0531-51666284

收稿日期: 2010-01-14 修回日期: 2010-04-01

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-04-28

Significance of Wnt-5a expression in gastric carcinoma

Xiao-Hong Liu, Zhi-Xin Cao, Ming Geng, Yong-Cheng Cao, Yi Wang, Xuan Xin, Cui-Cui Wang, Li-Quan Bi

Xiao-Hong Liu, Zhi-Xin Cao, Ming Geng, Yong-Cheng Cao, Yi Wang, Xuan Xin, Li-Quan Bi, Department of Pathology, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, Shandong Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2009CM041

Correspondence to: Ming Geng, Department of Pathology, General Hospital of Jinan Military Command, 25 Shifan Road, Jinan 250031, Shandong Province, China. gm2227@sina.com

Received: 2010-01-14 Revised: 2010-04-01

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To detect Wnt-5a expression in gastric carcinoma (GC) and explore its role in the development and progression of GC.

METHODS: The expression of Wnt-5a mRNA in 10 fresh GC and matched tumor-adjacent tissue samples was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of Wnt-5a and β -catenin proteins in 84 GC and matched tumor-adjacent tissue samples as well as 20 normal gastric mucosa tissue samples was examined by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method.

RESULTS: Real time RT-PCR analysis showed

that the relative level of Wnt-5a mRNA was significantly higher in GC than in tumor-adjacent tissue (5.919 ± 1.869 vs 1.281 ± 0.744 , $P < 0.05$). The positive rate of Wnt-5a protein expression was also significantly higher in GC than in tumor-adjacent tissue (40.54% vs 14.29% , $P < 0.05$). Wnt-5a expression was significantly associated with advanced TNM stage and lymph node metastasis (both $P < 0.01$). The rate of aberrant β -catenin expression was significantly higher in GC than in tumor-adjacent tissue (70.23% vs 38.10% , $P < 0.01$). Aberrant β -catenin expression was associated with advanced tumor stage and lymph node metastasis (both $P < 0.05$). The expression of Wnt-5a was correlated with that of β -catenin ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Wnt-5a may exert oncogenic functions in GC. Wnt-5a may be activated in the early stage of gastric tumorigenesis and be related to the poor prognosis of GC. Wnt-5a and β -catenin might play an important role in the development of GC via different signal pathways.

Key Words: Gastric carcinoma; Wnt-5a; β -catenin; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Liu XH, Cao ZX, Geng M, Cao YC, Wang Y, Xin X, Wang CC, Bi LQ. Significance of Wnt-5a expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1222-1226

摘要

目的: 探讨Wnt-5a基因在胃癌发生发展过程中的表达及意义。

方法: 采用实时定量RT-PCR方法对10例胃癌和癌旁组织Wnt-5a mRNA进行检测; 免疫组织化学SP法检测84例胃癌、癌旁组织及20例正常胃黏膜Wnt-5a和 β -catenin蛋白的表达。

结果: 胃癌和癌旁组织中Wnt-5a mRNA表达的相对含量分别为 5.919 ± 1.869 和 1.281 ± 0.744 ($P < 0.05$); Wnt-5a蛋白在胃癌和癌旁组织的表达阳性率分别为 40.54% (34/84)和 14.29% (12/84), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),

■同行评议者

王娅兰, 教授, 重庆医科大学基础医学院病理教研室

肿瘤中Wnt-5a上调表达相关于高的TNM分期和淋巴结转移($P<0.01$). β -catenin在胃癌及癌旁组织中异常表达率分别为70.23%(59/84)、38.1%(32/84), 两者差异表达具有统计学意义($P<0.01$), 癌组织中 β -catenin的异常表达相关于肿瘤的TNM分期和淋巴结转移($P<0.05$). 胃癌中Wnt-5a和 β -catenin蛋白表达呈负相关关系($P<0.05$).

结论: Wnt-5a在胃癌中可能发挥癌基因样作用, 其异常活化可能部分参与了胃癌发生的始动过程, 并可能相关于肿瘤差的预后. Wnt-5a与 β -catenin在胃癌发生过程可能经由不同的信号途径在胃癌进展中发挥作用.

关键词: 胃癌; Wnt-5a; β -catenin; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫组织化学

刘晓红, 曹智新, 耿明, 曹永成, 王义, 辛莹, 王翠翠, 毕利泉. Wnt-5a基因在胃癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1222-1226
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1222.asp>

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率居各类肿瘤之首. Wnt途径是一种对控制胚胎发育起重要作用的信号传导通路, 其不恰当地活化参与人类多种肿瘤的发生. 两者间的相关性研究是当今的热点领域^[1]. 本研究采用实时定量RT-PCR及免疫组织化学方法检测胃癌中Wnt-5a基因的表达, 初步探讨Wnt-5a在胃癌发生发展过程中的作用及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国人民解放军济南军区总医院2008-08-12手术切除的胃癌新鲜标本及正常切缘(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm)10例, -70 °C低温冰箱保存. 同时收集2008-02-12胃癌石蜡样本及癌旁组织(距肿瘤边缘0.5-1 cm)84例, 20例镜下观察为正常胃黏膜的手术切缘(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm)作为正常对照. 其中男72例, 女12例, 平均年龄61.8岁 ± 10.2 岁; 根据2006年WHO关于胃癌组织病理学分型, 管状腺癌48例, 乳头状腺癌13例, 黏液腺癌7例, 印戒细胞癌16例.

1.2 方法

1.2.1 实时定量RT-PCR: (1)总RNA提取: 采用TRIzol总RNA提取液(美国Invitrogen公司), 取50 mg组织提取总RNA, 具体步骤按操作说明. 取样本提取的总RNA, 用紫外吸收测定

法和变性琼脂糖凝胶电泳测定其浓度和纯度. (2)cDNA的合成: 以mRNA为模板, 采用Promega公司ImProm-II™ Reverse Transcription System试剂盒进行反转录合成cDNA, 用于以下的PCR扩增模板. (3)扩增Wnt-5a基因: Wnt-5a的引物序列为5'-accacatgcagtagcatcggag-3'和5'-gaggtgttatccacagtgctg-3'(上海博彩生物科技有限公司合成), GAPDH的引物序列为5'-ggacctgacctgcccctag-3'和5'-tagcccaggatgccccttgag-3'. PCR反应条件为94 °C, 5 min; 45个PCR循环(94 °C, 15 s; 60 °C, 5 s; 72 °C, 15 s; 81 °C收集荧光5 s). 为了建立PCR产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从72 °C缓慢加热到99 °C(每5 s升高1 °C). 其中Wnt-5a基因的扩增片段为106 bp, GAPDH基因的扩增片段为203 bp.

1.2.2 免疫组织化学: Wnt-5a, 兔抗人多克隆抗体(Lifespan公司, LS-C47384); β -catenin及SP-9000免疫组织化学检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司. 标本经100 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片厚4 μ m, 脱蜡水化, 乙二胺四乙酸缓冲液微波加热抗原修复, SP法免疫组织化学染色, 二氨基苯胺显色, 苏木精对比染色, 脱水透明, 中性树胶封固. PBS做空白对照.

1.2.3 结果判定: 各样品的目的基因和管家基因分别进行实时定量RT-PCR反应, Ct值直接由机器生成. 目的基因扩增产物的相对含量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算. Wnt-5a在细胞质出现棕黄色颗粒为阳性; 对样本进行阳性细胞百分比和染色强度综合评分, 10个随机高倍视野阳性细胞平均百分数 $<1\%$ 为0分, $1\%-10\%$ 为1分, $11\%-50\%$ 为2分, $>50\%$ 为3分; 染色强度计分: 未着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 两者之积为阴性表达, 1-4分为弱-中表达, >4 分为高表达. β -catenin蛋白阳性信号主要定位于正常细胞的胞膜, 呈完整清晰的棕黄色线性表达, 胞质和胞核染色多为阴性, 其异常表达为: 细胞膜染色强度减弱或表达中断/消失、胞质和(或)胞核被染成棕黄色^[2].

统计学处理 应用SPSS 16.0统计软件, mRNA相对含量的计量资料以mean \pm SD表示, 采用 t 检验; 蛋白阳性率的比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 实时定量RT-PCR结果 抽提各组织总RNA的 A_{260}/A_{280} 的比值为1.8-2.1, 变性琼脂糖凝胶电泳显示清晰的28S和18S条带, 前后者亮度比值 ≥ 2 ,

■ 研发前沿

Wnt途径是一种对控制胚胎发育起重要作用的信号传导通路, 其不恰当地活化参与人类多种肿瘤的发生. 两者间的相关性研究是当今的热点领域.

■相关报道

Huang等研究发现Wnt-5a的过表达可导致肺非小细胞肺癌的侵袭性增加,COX回归分析显示Wnt-5a的表达与该肿瘤差的预后相关.

表 1 Wnt-5a蛋白表达与胃癌临床病理参数间的关系

病理因素	n	Wnt-5a		P值
		+	-	
组织学分型				
管状腺癌	48	21	27	0.026 ^a
乳头状腺癌	13	6	7	0.032 ^a
印戒细胞癌	16	7	9	0.036 ^a
黏液腺癌	7	0	7	0.156 ^c
肿瘤分化				
高中分化	33	11	22	0.280
低分化	51	23	28	
淋巴结转移				
无	30	6	24	0.004
有	54	28	26	
TNM分期				
I、II期	38	8	30	0.001
III、IV期	46	26	20	

^a与黏液腺癌比较; ^c4种组织学分型组间比较.

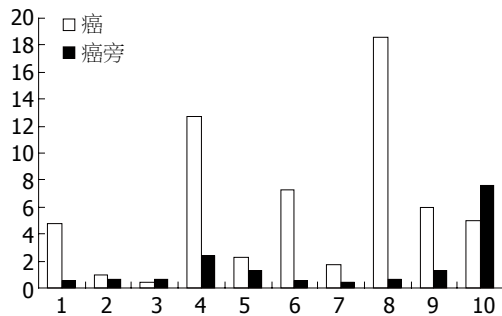


图 1 10例胃癌和癌旁组织中Wnt-5a mRNA水平的比较.

证实提取的总RNA具有良好的完整性和均一性.Wnt-5a PCR扩增产物为单一特异性扩增条带,约106 bp大小,与预期大小一致.实时定量RT-PCR仪检测显示,各样本CT值呈正态分布,本实验计算所得的10对扩增效率曲线呈线性关系($r = 1.00$).胃癌和癌旁组织中的Wnt-5a基因相对含量分别为 5.919 ± 1.869 和 1.281 ± 0.744 ,差异具有统计学意义($t = 2.033, P = 0.038$),对比癌旁组织,6例出现明显上调表达(上调大于2倍,图1).

2.2 免疫组织化学结果

2.2.1 Wnt-5a的表达与胃癌临床病理因素之间的关系: Wnt-5a蛋白在正常胃小凹表层及贲门腺、幽门腺呈阴性表达,阳性信号定位于肿瘤细胞的胞质.正常胃底、体腺固有层底部的个别腺体细胞出现Wnt-5a阳性(图2A),有研究显示其可能为主细胞^[3].Wnt-5a在胃癌(图2B)和癌旁组织中的阳性表达率分别为40.54%(34/84)和

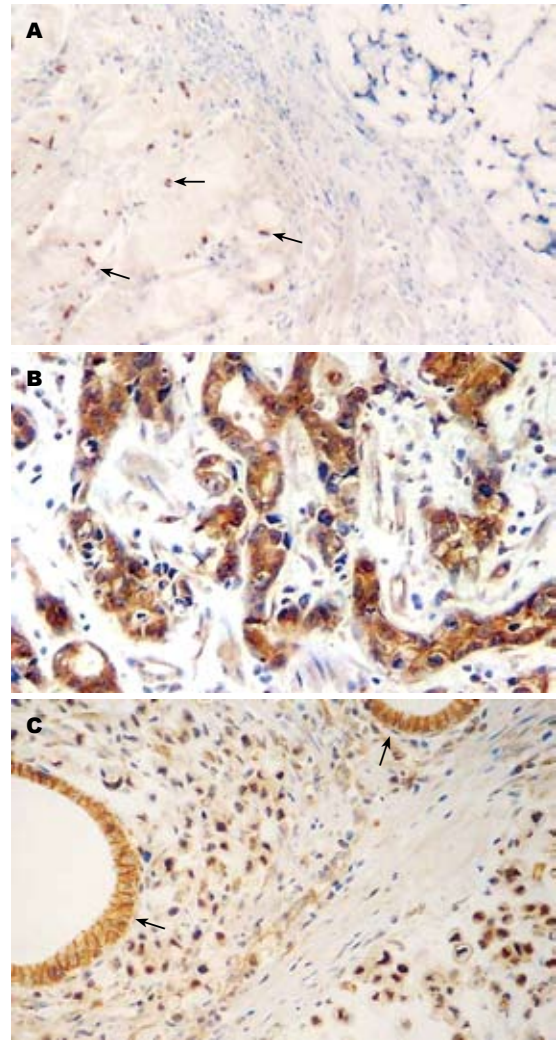


图 2 Wnt-5a在各腺癌组织中的蛋白表达(SP法). A: 胃黏液腺癌($\times 200$), Wnt-5a阴性表达,正常胃底腺Wnt-5a散在单个细胞细胞质阳性表达(箭头所指); B: 胃管状腺癌($\times 100$),腺体Wnt-5a蛋白胞质阳性表达; C: 胃黏液腺癌($\times 400$),正常胃腺体 β -catenin细胞膜阳性表达(箭头所指),周围肿瘤细胞胞质及细胞核异常阳性表达.

14.29%(12/84),差异具有统计学意义($P < 0.01$).Wnt-5a在7例黏液腺癌中均为阴性表达(图2A),与管状腺癌、乳头状腺癌及印戒细胞癌比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);胃癌组织中Wnt-5a高表达与临床病理参数的分析见表1.10例胃癌组织中Wnt-5a的mRNA和蛋白表达间具有一致性($P < 0.01$).

2.2.2 β -catenin结果与胃癌临床病理因素之间的关系: β -catenin在正常胃黏膜上皮呈细胞膜线性表达(图2C),而其出现异常的细胞质或核的表达在胃癌和癌旁组织分别为70.23%(59/84)和38.1%(32/84),差异具有统计学意义($P < 0.01$),癌组织中 β -catenin的核阳性率为19.0%(16/84).不同于Wnt-5a,6/7例黏液腺癌组织 β -catenin阳性表达,其中1例伴有核阳性表达(图2C).肿瘤中

该蛋白的异常表达相关于TNM分期和淋巴结转移($P < 0.05$), 但与肿瘤分化程度及类型无关($P > 0.05$). 肿瘤中Wnt-5a和 β -catenin免疫组织化学表达上呈负相关关系($r = -0.367, P < 0.05$), 尤其体现在黏液腺癌.

3 讨论

Wnt途径的组成框架和活化机制已有相对完整的解释, 人们认识到Wnt途径并不是以前设想的线性通路, 而是一条多环节、多作用位点的开放式途径, 该途径中多种蛋白的作用机制远未明确, 比如Wnt-5a, 对其研究尚处于起步阶段^[1,3-8]. 本文对胃癌组织中Wnt-5a基因转录和翻译水平的变化进行检测和分析. 目前相关研究鲜见报道.

本研究实时定量RT-PCR检测结果显示, 胃癌组织中Wnt-5a基因的mRNA水平显著高于癌旁组织($P = 0.038$), 提示胃癌中该基因在转录水平上调表达. 本研究结果相似于对人体其他部位原发肿瘤中Wnt-5a基因mRNA检测的报道, 如对比于正常或癌旁组织, 良性和浸润性乳腺肿瘤、甲状腺癌、肺癌、前列腺癌和胃癌等Wnt-5a基因mRNA均呈上调表达, 但也有相反的报道, 如在子宫内膜癌中, Wnt-5a基因mRNA呈下调表达^[9-15].

本研究在mRNA水平证实了胃癌中Wnt-5a的高表达, 免疫组织化学染色结果呈现了一致的变化, 胃癌组织中Wnt-5a蛋白明显上调表达, 并相关于淋巴结转移及高的肿瘤TNM分期, 同时癌旁组织也显示一定程度的蛋白高表达. 上述研究结果提示, 胃癌中Wnt-5a基因在转录水平即发生了异常变化, 并进一步导致翻译水平蛋白的高表达, 显示了Wnt-5a蛋白从正常胃黏膜→癌旁组织→胃癌的递增表达趋势, 提示胃癌发生的早期已有Wnt-5a信号通道活化, 表明其可能参与胃癌发生的始动过程. 我们推测Wnt-5a在胃癌的发生发展过程中起到了癌基因样作用, 并相关于胃癌转移和差的预后. 相似的结果亦见于对一些恶性肿瘤的研究^[12,14,16-18], Huang等^[12]研究发现Wnt-5a的过表达可导致肺非小细胞肺癌的侵袭性增加, COX回归分析显示Wnt-5a的表达与该肿瘤差的预后相关. McDonald等^[14]对包含痣、恶黑和转移性恶黑组织的免疫组织化学检测显示, Wnt-5a蛋白表达增加直接相关于高的肿瘤分级, 但负相关于患者的生存. 对不同肿瘤的研究显示

Wnt-5a蛋白具有截然相反的作用^[10,11,19-22], 如Kremenevskaja等^[10]对甲状腺癌和Jönsson等^[11]对乳腺癌进行的相关研究, 后者的研究表明, Wnt-5a表达丢失可能是一个独立于淋巴结状态和肿瘤大小的, 有用的预测复发的标志物, Wnt-5a的丢失增加乳腺浸润性导管癌的早期复发和死亡的风险, 他们提出, Wnt-5a蛋白在乳腺发挥肿瘤抑制作用. 目前认为不同肿瘤中Wnt-5a的作用机制可能存在差异^[23-30].

β -catenin是wnt信号途径中的重要效应分子, 也是一种研究较为成熟的原癌基因^[31-35], 本研究免疫组织化学染色结果证实其在胃癌呈明显的异常表达, 包括从细胞膜至细胞质及细胞核的异位表达, 后者常相关于 β -catenin外显子3的突变. 我们的结果支持 β -catenin作为原癌基因的异位表达导致经典Wnt信号活化参与肿瘤发生的理论^[31-35]. 有意思的是, 本实验数据显示, Wnt-5a与 β -catenin在胃癌组织中不同时相的表达, 即Wnt-5a阳性表达的肿瘤 β -catenin多未出现异常表达, 而Wnt-5a阴性表达的肿瘤 β -catenin却有较高的异常表达率, 这一点在黏液腺癌尤为显著. 推测这两种分子在胃癌发生过程中存在相互竞争或排斥表达现象, 可能涉及了经典与非经典两种不同Wnt信号通路的活化. Wnt-5a在本组黏液腺癌病例中完全阴性的表达提示该肿瘤的发生更可能涉及Wnt经典信号途径的活化.

本文从转录和翻译水平对胃癌和癌旁组织中Wnt-5a的表达进行报道, 研究显示, Wnt-5a高表达是胃癌发生及演进过程中的频发事件, 并与胃癌的临床分期及淋巴结转移相关, 推测Wnt-5a在胃癌的发生中可能起癌基因样作用, 其异常活化可能部分参与了胃癌发生的始动过程, 该蛋白可能成为判断胃癌有用的预后不良指标. 但目前胃癌组织Wnt-5a上调表达的机制及其与肿瘤发生发展间的关系还远未清楚, 其在胃癌的预防和治疗方面的价值还有待更深入的研究.

4 参考文献

- 1 Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810
- 2 Bachmann IM, Straume O, Puntervoll HE, Kalvenes MB, Akslen LA. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8606-8614
- 3 Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*

■同行评价
本研究选题、设计尚可, 具有一定的学术价值.

- 2007; 45: 1298-1305
- 4 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850
 - 5 Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* 2005; 14: 1583-1588
 - 6 Petersen CP, Reddien PW. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 2009; 139: 1056-1068
 - 7 Fearon ER. PARsing the phrase "all in for Axin"-Wnt pathway targets in cancer. *Cancer Cell* 2009; 16: 366-368
 - 8 Oshima H, Oguma K, Du YC, Oshima M. Prostaglandin E2, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 2009; 100: 1779-1785
 - 9 Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 2006; 66: 10439-10448
 - 10 Kremenevska N, von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 2144-2154
 - 11 Jönsson M, Dejmeck J, Bendahl PO, Andersson T. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 2002; 62: 409-416
 - 12 Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8765-8773
 - 13 Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toylu A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabey N, Ozturk M. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009; 8: 90
 - 14 McDonald SL, Silver A. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 209-214
 - 15 Blanc E, Roux GL, Bénard J, Raguénez G. Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 2005; 24: 1277-1283
 - 16 Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002; 1: 279-288
 - 17 O'Connell MP, French AD, Leotlela PD, Weeraratna AT. Assaying Wnt5A-mediated invasion in melanoma cells. *Methods Mol Biol* 2008; 468: 243-253
 - 18 Xavier FC, Rodini CO, Ramalho LM, Mantesso A, Nunes FD. WNT-5A, but not matrix metalloproteinase 3 or beta-catenin protein, expression is related to early stages of lip carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 708-715
 - 19 刘晓红, 周航波, 马恒辉, 周志毅, 陆珍凤, 周晓军. 肝细胞肝癌中Wnt5a、 β -catenin和E-cadherin蛋白的表达及临床意义. *临床与实验病理学杂志* 2007; 23: 400-403
 - 20 Liu XH, Pan MH, Lu ZF, Wu B, Rao Q, Zhou ZY, Zhou XJ. Expression of Wnt-5a and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 560-567
 - 21 Liu X, Wang L, Zhang S, Lin J, Zhang S, Feitelson MA, Gao H, Zhu M. Mutations in the C-terminus of the X protein of hepatitis B virus regulate Wnt-5a expression in hepatoma Huh7 cells: cDNA microarray and proteomic analyses. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1207-1214
 - 22 DeMorrow S, Francis H, Gaudio E, Venter J, Franchitto A, Kopriva S, Onori P, Mancinelli R, Frampton G, Coufal M, Mitchell B, Vaculin B, Alpini G. The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G1150-G1158
 - 23 Blanc E, Goldschneider D, Douc-Rasy S, Bénard J, Raguénez G. Wnt-5a gene expression in malignant human neuroblasts. *Cancer Lett* 2005; 228: 117-123
 - 24 Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 2006; 4: e115
 - 25 Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 2003; 162: 899-908
 - 26 Yamamoto H, Yoo SK, Nishita M, Kikuchi A, Minami Y. Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* 2007; 12: 1215-1223
 - 27 Säfholm A, Tuomela J, Rosenkvist J, Dejmeck J, Härkönen P, Andersson T. The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxy-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6556-6563
 - 28 Pukrop T, Binder C. The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 2008; 86: 259-266
 - 29 Bosserhoff AK. Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 28-35
 - 30 O'Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 724-739
 - 31 覃业军, 周晓燕, 施达仁. β -Catenin蛋白在散发性结直肠癌中的异常表达和基因突变. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2385-2390
 - 32 刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信. SFRP2和 β -catenin在大肠癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3963-3969
 - 33 Akaboshi S, Watanabe S, Hino Y, Sekita Y, Xi Y, Araki K, Yamamura K, Oshima M, Ito T, Baba H, Nakao M. HMGA1 is induced by Wnt/beta-catenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer. *Am J Pathol* 2009; 175: 1675-1685
 - 34 Du R, Xia L, Sun S, Lian Z, Zou X, Gao J, Xie H, Fan R, Song J, Li X, Liu J, Fan D. URG11 Promotes Gastric Cancer Growth and Invasion by Activation of beta-Catenin Signaling Pathway. *J Cell Mol Med* 2008 Dec 24. [Epub ahead of print]
 - 35 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17: 9-26

编辑 李军亮 电编 何基才

PUMA基因在胃癌组织及细胞中的表达

陈鑫, 张尤历, 乌慧玲, 孔梅, 邵长江, 宋永站

陈鑫, 张尤历, 孔梅, 邵长江, 宋永站, 江苏大学附属医院消化内科 江苏省镇江市 202001
乌慧玲, 江苏大学生命科学研究院 江苏省镇江市 212001
陈鑫, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的临床和基础研究。
作者贡献分布: 陈鑫与张尤历对此文所作贡献均等; 此课题由张尤历与乌慧玲共同设计; 研究过程由陈鑫、张尤历及孔梅操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张尤历提供; 数据分析由陈鑫、乌慧玲、邵长江及宋永站完成; 本论文写作由陈鑫与张尤历完成。
通讯作者: 张尤历, 教授, 212001, 江苏省镇江市, 江苏大学附属医院消化科. zjyouli@yahoo.com.cn
电话: 0511-85021787
收稿日期: 2010-01-13 修回日期: 2010-03-19
接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-28

Expression of the PUMA gene in gastric cancer tissue and cell lines

Xin Chen, You-Li Zhang, Hui-Ling Wu, Mei Kong, Chang-Jiang Shao, Yong-Zhan Song

Xin Chen, You-Li Zhang, Mei Kong, Chang-Jiang Shao, Yong-Zhan Song, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Hui-Ling Wu, College of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Professor You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-13 Revised: 2010-03-19
Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of four mRNA isoforms of the *p53* up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) gene in gastric cancer tissue and cell lines.

METHODS: The open reading frames of four mRNA isoforms of the PUMA gene were analyzed by bioinformatics method. The expression of these four mRNA isoforms in gastric cancer tissue, normal tissue and two gastric cancer cell lines were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: PUMA- α and - β were positively expressed in normal tissue, but hardly detected in cancer tissue ($t = 9.492$ and 15.875 , respectively;

both $P < 0.05$). PUMA- γ and - δ were expressed both in cancer tissue and normal tissue, and their expression levels were significantly higher in tumor-adjacent tissue than in cancer tissue ($t = 4.823$ and 4.056 , respectively; both $P < 0.05$). The expression of the four PUMA isoforms was detected in the two gastric cancer cell lines. The expression level of PUMA- β was significantly higher in low-differentiated BGC-823 cells than in moderately differentiated SGC-7901 cells ($t = 8.710$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of PUMA isoforms is down-regulated in gastric cancer tissue and may be negatively correlated with the pathogenesis of gastric cancer. The expression of PUMA- β may be involved in gastric cancer cell differentiation.

Key Words: *p53* up-regulated modulator of apoptosis; Gastric cancer; Apoptosis; Expression

Chen X, Zhang YL, Wu HL, Kong M, Shao CJ, Song YZ. Expression of the PUMA gene in gastric cancer tissue and cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1227-1231

摘要

目的: 研究*p53*正向细胞凋亡调控因子(PUMA)基因的四种剪接体(PUMA- α , - β , - γ 及- δ)在胃癌组织及细胞中的表达特点。

方法: 应用生物信息学分析PUMA基因四种剪接体的结构特点; 同时利用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测胃癌组织、癌旁组织及不同胃癌细胞系BGC-823和SGC-7901细胞中四种剪接体的mRNA表达水平。

结果: PUMA- α 和- β 在癌旁组织中表达阳性, 但在癌组织中表达难以检测, 差异显著($t = 9.492$, 15.875 , 均 $P < 0.05$); PUMA- γ 和- δ 在癌旁及癌组织中均可见表达, 且在癌旁组织中的表达量显著高于癌组织($t = 4.823$, 4.056 , $P < 0.05$)。PUMA- α , - γ 及- δ 在胃癌不同分化程度的细胞系BGC-823(低分化)及SGC-7901(中分化)中均有表达, 但两细胞系间无统计学差异。而PUMA- β 在BGC-823中的表达明显高于

■背景资料

PUMA基因是首先在结肠癌细胞中发现的具有强大的促凋亡作用的Bcl-2家族BH3-only亚家族中的一员。该基因转录后形成四种不同的剪接体(PUMA- α , - β , - γ 及- δ)。目前国内外对于PUMA基因剪接体对胃癌的形成作用研究相对较少。

■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心

■ 研发前沿

近年PUMA基因的诱导凋亡作用与肿瘤的相关性研究成为热点。

SGC-7901细胞($t = 8.710, P < 0.05$).

结论: PUMA四种剪接体在胃癌组织中的表达下调, 与癌的发生呈负相关; PUMA- β 的表达还可能与细胞的分化程度有关。

关键词: *p53*正向细胞凋亡调控因子; 胃癌; 细胞凋亡; 表达

陈鑫, 张尤历, 鸟慧玲, 孔梅, 邵长江, 宋永站. PUMA基因在胃癌组织及细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1227-1231

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1227.asp>

0 引言

*p53*正向细胞凋亡调控因子(*p53* up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)基因^[1,2]是首先在结肠癌细胞中发现的具有强大促凋亡作用的Bcl-2家族BH3-only亚家族中的一员. 该基因具有4个外显子(1a或1b, 2, 3, 4)和三个内含子, 转录后形成四种不同的剪接体(PUMA- α , - β , - γ 及- δ). 研究发现PUMA- α 和- β 编码的蛋白中含有PUMA促凋亡活性所必需的BH3功能结构域, 而PUMA- γ 和- δ 编码的蛋白中缺乏该结构域^[1-3]. PUMA的促凋亡活性不仅取决于BH3结构域, 也取决于C末端的线粒体定位序列^[4]. PUMA各剪接体之间的表达关系目前尚不清楚. 胃癌是一种常见的恶性肿瘤, 据全球肿瘤发病和癌症死亡率的第2位^[5]. 在我国, 其发病率高居各类肿瘤之首. 胃癌的发生是一个多基因多步骤渐进的过程. 胃癌细胞的某些基因表达与细胞凋亡状况有关. 目前国内外对于PUMA基因剪接体对胃癌的形成作用研究相对较少. 本实验主要研究PUMA基因的四种剪接体在胃癌组织及细胞中的表达特点, 为进一步研究其作用机制打下实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 PUMA四种剪接体核酸序列来源于NCBI已注册的基因序列(登录号: NM_001127240). 试验所需要的胃癌及相对应的癌旁组织均来自于江苏大学附属医院, 病理诊断均为腺癌. 试验样本是在肿瘤组织脱离患者后立即取材, 置于液氮中冷藏. 胃癌细胞系BGC-823和SGC-7901细胞由本实验室保存. DMEM培养液为Gibco公司产品, 小牛血清为兰州民海生物工程有限公司产品, 逆转录试剂盒购自Fermantance公司.

1.2 方法

1.2.1 PUMA四种剪接体生物信息学分析: 采用

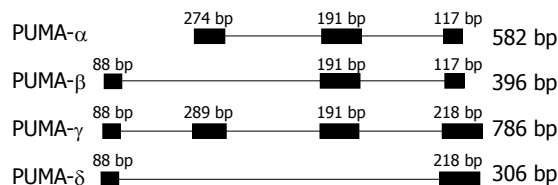


图1 PUMA四种剪接体的结构.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>及DNASTAR软件对PUMA四种剪接体进行生物信息学分析.

1.2.2 细胞培养: 人胃癌细胞系BGC-823及SGC-7901细胞采用DMEM培养液(含10%的小牛血清), 在CO₂培养箱中进行常规培养, 隔天换液, 细胞传代时用0.25%胰蛋白酶消化细胞.

1.2.3 胃癌组织总RNA的提取: 在用液氮预冷的研钵中加入适量的样品, 加液氮研磨, 磨成均匀的粉末, 加入1 mL的TRIzol混匀, 转移至灭菌的Eppendorf管中; 加入0.2 mL氯仿, 剧烈摇匀, 静置2-3 min; 12 000 r/min, 15 min, 4 °C离心; 吸取上层无色水至另一Eppendorf管; 加入等量异丙醇, 颠倒混匀, 静置10 min; 12 000 r/min, 15 min, 4 °C离心, 弃上清. 加入750 mL/L乙醇洗涤, 12 000 r/min, 5 min, 4 °C离心; 弃上清, 加入无水乙醇, 颠倒混匀, 12 000 r/min, 5 min, 4 °C离心; 弃上清, 沉淀5-10 min. 加入DEPC处理水, 混匀, 测吸光度(A)值待用.

1.2.4 RT-PCR检测相关基因: 按照逆转录试剂盒说明书将组织及细胞的总RNA逆转录成cDNA, 以 β -actin为内参照行PCR反应. PUMA基因4种不同剪接体的引物序列见表1. 反应条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 40 s, 61 °C-71 °C 40 s, 72 °C 45 s, 40个循环, 72 °C 10 min. 产物于2%琼脂凝胶电泳, 以凝胶成像系统分析结果, 计算各目的条带与内参条带吸光度比值, 以其表示各组mRNA含量的相对强度.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 采用成组资料 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

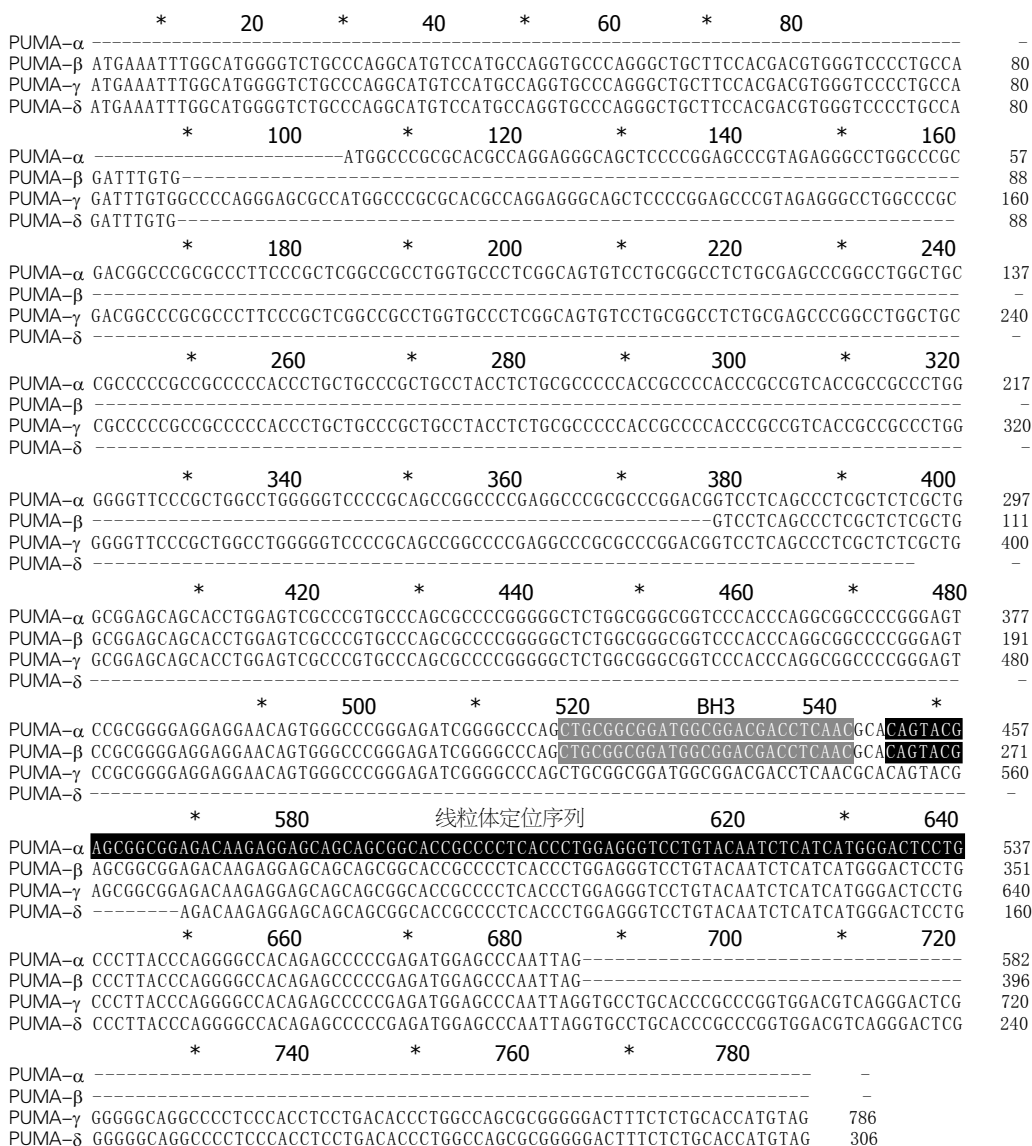
2 结果

2.1 PUMA四种剪接体生物信息学 PUMA- α ORF(open reading frame)为582 bp, 含外显子2, 3和4; - β 的ORF为396 bp, 含外显子1, 3和4; - γ 的ORF为786 bp, 含外显子1, 2, 3和4; - δ 的ORF为306 bp, 只含有外显子1和4. 且PUMA- γ 比- α 的2号外显子多15 bp; - γ , - δ 含有的外显子4比- α 和- β 长101 bp(图1, 2).

2.2 PUMA剪接体在胃癌及癌旁组织中的表

■ 相关报道

张克君等发现PUMA在胰腺癌组织中阳性率低于正常胰腺组织.



■创新盘点
本研究首次研究了PUMA基因四种剪接体在胃癌组织及细胞中的表达特点,发现PUMA剪接体与癌的发生可能成负相关,同时PUMA-β还可能与细胞分化程度有关。

图 2 PUMA四种剪接体核苷酸序列比对. 灰色阴影部分为编码BH3结构域的核酸序列, 黑色阴影部分为线粒体定位序列.

表 1 PUMA基因4种剪接体的PCR引物

剪接体	全长 (bp)	引物序列	片段大小 (bp)
PUMA-α	582	上游 5' cggacggtcctcagccctcgctct 3'	268
		下游 5'aggagtccatgatgagattgtaca 3'	
PUMA-β	396	上游 5' tgccagattgtgtctcagccct 3'	275
		下游 5'aggagtccatgatgagattgtaca 3'	
PUMA-γ	786	上游 5' cggacggtcctcagccctcgctct 3'	335
		下游 5' ccaccggcggtgtagcagcactaat 3'	
PUMA-δ	306	上游 5' gccagattgtgagacaagaggagc 3'	150
		下游 5' ccaccggcggtgtagcagcactaat 3'	

达 PUMA-α, -β在癌旁组织中表达阳性,但在胃癌组织中表达难以检测到($t = 9.492, 15.875, P < 0.05$); -γ, -δ在癌旁及癌组织中均有表达,并

且在癌旁组织中表达量显著高于胃癌组织($t = 4.823, 4.056, P < 0.05$, 图3, 4).

2.3 PUMA剪接体在胃癌BGC-823和SGC-7901细胞中的表达 PUMA四种剪接体在胃癌不同分化程度的细胞系BGC-823和SGC-7901细胞中均有表达,且PUMA-β在低分化的BGC-823细胞中表达量明显高于中分化的SGC-7901细胞($t = 8.710, P < 0.05$, 图5, 6).

3 讨论

p53作为转录调控子,在与特异的DNA序列(p53结合位点)结合后,促使其转录.很多重要的与细胞周期以及细胞凋亡相关的基因都能被p53调控. PUMA基因作为p53下游靶基因,是p53诱导凋亡途径中的关键介导者. PUMA^[3]上游启

■应用要点

本研究为PUMA成为肿瘤基因治疗打下了理论基础。

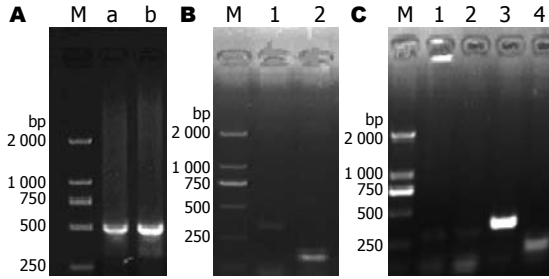


图3 PUMA四种剪接体在组织中的PCR扩增. A: 内参β-actin, a: 癌组织, b: 癌旁组织; B: PUMA四种剪接体在胃癌组织中的表达, C: PUMA四种剪接体在胃癌癌旁组织中的表达. 1: PUMA-α; 2: PUMA-β; 3: PUMA-γ; 4: PUMA-δ; M: DL-2000 Marker.

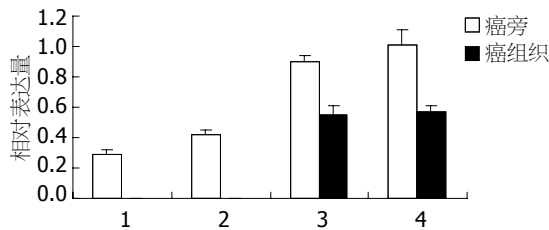


图4 PUMA四种剪接体在组织中的相对表达量. 1: PUMA-α; 2: PUMA-β; 3: PUMA-γ; 4: PUMA-δ.

动子序列中含有p53结合位点, 受到凋亡信号刺激后, p53可以直接与其靶位点结合, 从而促进PUMA基因的转录及其蛋白的表达. 多个试验证实转染外源性的p53基因或由γ射线照射、DNA损伤药物、缺氧和NO等引起内源性p53表达上调引发的促细胞凋亡作用是通过上调PUMA介导的^[2-4,6-8]. p53突变型和p53缺失的细胞在受到损伤后没有发现PUMA的上调, 也不发生细胞凋亡; 而在突变或缺失p53的细胞中转入野生型p53会恢复对PUMA的上调作用并促进细胞凋亡^[7,9]. 但PUMA又有别于其他p53靶基因, 他也可以由非p53依赖途径诱导细胞凋亡, 例如糖皮质激素^[10], E2F1转录因子^[11], JUN氨基端激酶^[12]等都可以激活PUMA的表达.

本研究发现PUMA四种剪接体在胃癌癌旁组织中均有表达, 而在胃癌组织中PUMA-α、-β表达却难以检测到, -γ、-δ与癌旁组织相比表达下调, 差异有统计学意义. 张克君等^[13]发现PUMA在胰腺癌组织中阳性率低于正常胰腺组织, 我们的结论与此观点相似. 分析PUMA-α、-β、-γ及-δ在胃癌组织中表达下调可能是由于一方面p53在肿瘤组织中发生了突变, 从而导致其下游的靶基因(如PUMA)表达缺失或活性减弱; Tannapfel等^[14]及Sud等^[15]研究发现胃癌组织中存在p53基因突变. 这也就证实了试验中发现胃

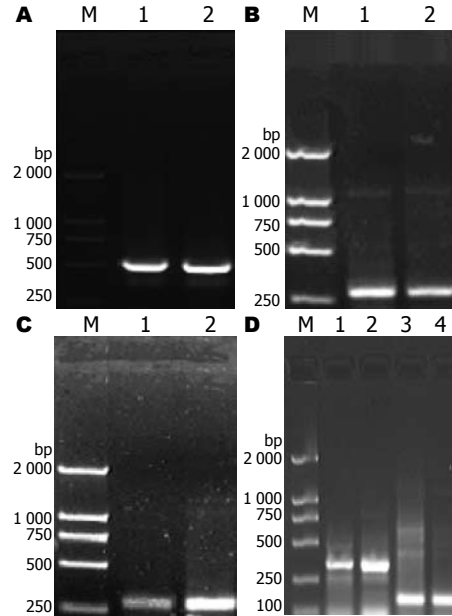


图5 PUMA四种剪接体在细胞中的PCR扩增. A: 内参β-actin, 1: BGC, 2: SGC; B: PUMA-α, 1: BGC, 2: SGC; C: PUMA-β, 1: SGC, 2: BGC; D: PUMA-γ, -δ, 1, 3: BGC, 2, 4: SGC. M: DL-2000 Marker.

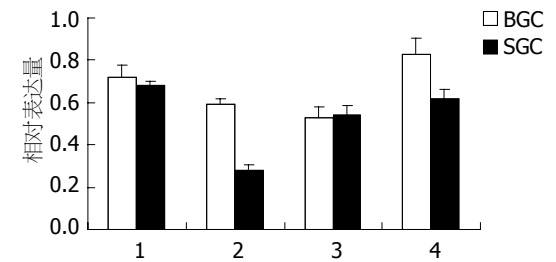


图6 PUMA四种剪接体在组织中的相对表达量. 1: PUMA-α; 2: PUMA-β; 3: PUMA-γ; 4: PUMA-δ.

癌组织中PUMA四种剪接体表达下调, 与肿瘤的发生呈负相关. 另一方面PUMA具有促凋亡作用, PUMA表达高则加快细胞凋亡, 表达低则减缓细胞凋亡^[16,17]. PUMA-α、-β具有明确的促凋亡作用, 其在胃癌组织中的表达难以检测到可能与肿瘤的生成有一定关系. 有研究报道^[1,2]-γ、-δ编码的蛋白缺乏BH3结构域, 因此其可能不具有强大的促凋亡作用. 但PUMA的促凋亡作用不仅与BH3结构域有关, 还取决于C末端的线粒体定位序列. 并且在实验中发现-γ、-δ在癌旁及癌组织中mRNA的表达水平有统计学差异, 所以-γ、-δ可能也具有一定的促凋亡作用, 或者-γ、-δ对-α和-β有调节作用. 但其具体的作用机制还有待进一步研究.

PUMA-β在胃癌不同分化程度细胞系BGC-823(低分化)和SGC-7901(中分化)细胞中表达存在统计学差异, 而其他剪接体在这两种

细胞系中表达无统计学意义. 王培新等^[18]以p53 cDNA为探针, 用Southern印迹法对人胃癌细胞系BGC-823进行了检测, 发现该细胞系中p53存在突变. 张青云等^[19]发现SGC-7901细胞属于p53突变型. 由此可见在这两种胃癌细胞系均存在p53突变. PUMA- α 、 γ 及 δ 在这两种细胞系间表达无统计学差异可能与此相关. 而 β 在两种细胞系间表达存在差异, 提示PUMA- β 的表达可能与细胞的分化程度有关, 其进一步关系还有待深入研究.

4 参考文献

- 1 Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7: 673-682
- 2 Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694
- 3 Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11318-11323
- 4 Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; 4: 248-249
- 5 Shah MA, Schwartz GK. Treatment of metastatic esophagus and gastric cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 574-587
- 6 Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1931-1936
- 7 Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 2003; 4: 321-328
- 8 Li CQ, Robles AI, Hanigan CL, Hofseth LJ, Trudel LJ, Harris CC, Wogan GN. Apoptotic signaling pathways induced by nitric oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. *Cancer Res* 2004; 64: 3022-3029
- 9 Shinagawa Y, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Hoque MO, Furihata T, Horiuchi H, Imai Y, Fujimori T, Fujibayashi T. Evaluation of the chemosensitivity of head and neck cancer cells based on the diverse function of mutated-p53. *Int J Oncol* 2003; 22: 383-389
- 10 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038
- 11 Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 8627-8634
- 12 Wong HK, Fricker M, Wyttenbach A, Villunger A, Michalak EM, Strasser A, Tolkovsky AM. Mutually exclusive subsets of BH3-only proteins are activated by the p53 and c-Jun N-terminal kinase/c-Jun signaling pathways during cortical neuron apoptosis induced by arsenite. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8732-8747
- 13 张克君, 李德春, 朱东明. PUMA蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 488-492
- 14 Tannapfel A, Schmelzer S, Benicke M, Klimpfing M, Kohlhaw K, Mössner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001; 195: 163-170
- 15 Sud R, Wells D, Talbot IC, Delhanty JD. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 126: 111-119
- 16 Hemann MT, Zilfou JT, Zhao Z, Burgess DJ, Hannon GJ, Lowe SW. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9333-9338
- 17 Jansson A, Arbman G, Sun XF. mRNA and protein expression of PUMA in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004; 12: 1245-1249
- 18 王培新, 王新娟, 高汉林, 廖晓蓓, 连新云. P53基因对人胃癌细胞系恶性生长的影响. *生物化学杂志* 1997; 13: 46-49
- 19 张青云, 吕有勇, 李铮, 李文梅, 崔建涛, 谢山海, 邓国仁. 人胃癌细胞系中p53基因变异的检测及其序列分析. *生物化学杂志* 1995; 11: 311-314

■同行评价
本文研究目的明确, 设计合理, 结果处理可信, 有待进一步研究.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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.

MAL基因在胃癌组织中的甲基化及其mRNA的表达

林若阳, 沈萍萍, 黄智铭, 郑建建, 王良兴

■背景资料

胃癌在我国是最常见的恶性肿瘤之一。胃癌发生的分子机制中, 遗传和表观遗传机制均起着重要的作用。DNA甲基化是目前研究最多也最深入的一种表观遗传学表达机制。胃癌相关基因尤其是抑癌基因的启动子区异常甲基化导致其表达失活是胃癌发生、发展重要因素之一, 现已成为胃癌发病机制研究中的热点。

林若阳, 沈萍萍, 黄智铭, 郑建建, 王良兴, 温州医学院附属第一医院 浙江省温州市 325000

林若阳, 2007级温州医学院硕士, 主要从事消化系统恶性肿瘤侵袭转移的基础和临床研究。

作者贡献分布: 此课题由林若阳设计; 研究过程由林若阳、沈萍萍及郑建建完成; 数据分析由林若阳与沈萍萍完成; 本论文写作由林若阳完成; 黄智铭对文章内容作批评性审阅; 黄智铭与王良兴提供本实验经费。

通讯作者: 黄智铭, 主任医师, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一医院消化内科. wyyzhiming@126.com

电话: 0577-88069256

收稿日期: 2009-12-31 修回日期: 2010-02-15

接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-28

MAL mRNA expression and DNA methylation in gastric cancer

Ruo-Yang Lin, Ping-Ping Shen, Zhi-Ming Huang, Jian-Jian Zheng, Liang-Xing Wang

Ruo-Yang Lin, Ping-Ping Shen, Zhi-Ming Huang, Jian-Jian Zheng, Liang-Xing Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Corresponding to: Zhi-Ming Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000 Zhejiang Province, China. wyyzhiming@126.com

Received: 2009-12-31 Revised: 2010-02-15

Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the mRNA expression and DNA methylation of the MAL gene in gastric carcinoma.

METHODS: Methylation-specific PCR (MSP) and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect DNA methylation and mRNA expression of the MAL gene in 37 gastric carcinoma samples and matched tumor-adjacent tissue samples, respectively. The correlations of DNA methylation and mRNA expression of the MAL gene with clinical and pathological parameters in gastric carcinoma were then analyzed.

RESULTS: The methylation rate of the MAL gene is 78.4% (29/37) in gastric carcinoma tissue and 5.4% (2/37) in tumor-adjacent tissue, with a

significant difference between the two groups ($P < 0.01$). MAL gene methylation is not associated with age, sex, tumor size, lymph node metastasis, tumor differentiation and clinical stage (all $P > 0.05$). The expression level of the MAL mRNA differed significantly between gastric carcinoma tissue and tumor-adjacent tissue ($P < 0.05$). MAL mRNA expression is not associated with age, sex, tumor size, tumor differentiation, lymph node metastasis and clinical stage (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Loss of MAL gene expression plays an important role in the development and progression of gastric carcinoma. DNA methylation may negatively regulate the expression of the MAL gene.

Key Words: Gastric carcinoma; MAL gene; Methylation; Methylation-specific PCR; Real-time RT-PCR

Lin RY, Shen PP, Huang ZM, Zheng JJ, Wang LX. MAL mRNA expression and DNA methylation in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1232-1236

摘要

目的: 研究MAL基因在胃癌和癌旁组织中的甲基化状态及其mRNA表达。

方法: 应用甲基化特异性PCR(MSP)和实时荧光定量RT-PCR法检测37例人胃癌组织及对应癌旁5 cm组织中MAL基因的甲基化状态和mRNA表达, 并分别将其与各临床病理指标进行统计学分析。

结果: 37例胃癌组织中MAL基因甲基化率为78.4%。对应37例癌旁组织中MAL基因甲基化率为5.4%。癌组织与癌旁组织的甲基化率差异有统计学意义($P < 0.01$)。胃癌组织中MAL基因甲基化状态与患者年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移、胃癌分化程度、临床分期无统计学意义($P > 0.05$)。在胃癌组织与对应癌旁组织中MAL基因mRNA定量表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。胃癌组织中MAL基因mRNA定量表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、胃癌分化程度、有无淋巴结转移、有无

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室; 王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

神经束浸润及肿瘤TNM分期无相关($P>0.05$).

结论: 胃癌组织中MAL基因表达缺失或低下, 并且存在高甲基化率, MAL基因发生甲基化可能与胃癌发生有关.

关键词: 胃癌; MAL基因; 甲基化; 甲基化特异性PCR; 实时荧光定量RT-PCR

林若阳, 沈萍萍, 黄智铭, 郑建建, 王良兴. MAL基因在胃癌组织中的甲基化及其mRNA的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1232-1236
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1232.asp>

0 引言

胃癌的发生、发展涉及多种癌基因与抑癌基因的表达异常. 启动子甲基化是肿瘤中普遍存在的现象, 常发生在肿瘤抑癌基因, 抑制启动子功能, 使基因不能正常表达, 导致肿瘤的发生. MAL基因作为一种较新型的抑癌基因, 目前逐渐受到关注, 但国内未见其有关胃癌的报道. 本研究通过甲基化特异性PCR及实时荧光定量PCR检测MAL基因在胃癌组织中mRNA水平表达和甲基化状态, 探讨该基因甲基化对胃癌组织中MAL mRNA表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-01/02浙江省温州医学院附属第一医院胃癌患者手术切除新鲜标本33例, 所有患者均经病理确诊, 包括不同临床分期和不同组织学类型, 其中女13例, 男24例, 年龄47-80岁, 所有患者术前均未接受放、化疗. 每份标本均取癌组织、对应癌旁组织(距癌灶边缘5 cm以外)各2块, 液氮休克后-80℃保存. Fermentas DNA提取试剂盒(MBI公司); EZ DNA甲基化试剂盒-Gold(北京天漠公司); Hot start Taq DNA聚合酶(大连宝生物公司); Sss I酶(New England Biolabs公司); TRIzol试剂(invitrogen公司); 逆转录酶(MBI公司); SYBR Green(Applied Biosystems公司); 普通PCR仪(Mycycler, BIO-RAD公司); Real Time PCR仪(ABI7500, Applied Biosystems公司); 用于methylation-specific PCR(MSP)的甲基化引物(M)和非甲基化引物(U)由上海生工合成, 用于Real-time RT-PCR的引物由上海英骏公司合成.

1.2 方法

1.2.1 甲基化特异性PCR: 组织DNA按照DNA提取试剂盒说明书提取后, 紫外分光光度计检测DNA浓度及纯度($A_{260}/A_{280}>1.8$). 取小于2 μg

DNA按照EZ DNA甲基化试剂盒-Gold说明书进行亚硫酸氢钠的修饰与DNA的纯化后, 用于PCR扩增. PCR反应体系: 10×Buffer 2 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 3.2 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 修饰后的DNA 4 μL, Hot start Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 去离子水补足至20 μL. 95℃预变性15 min之后进行35个循环反应: 95℃变性1 min, 52℃复性1 min, 72℃延伸30 s. 最后, 72℃延伸7 min. 甲基化引物(M)和非甲基化引物(U)序列根据外文文献[1], 见表1. MSP产物由2%琼脂糖凝胶(含0.1 g/L溴化乙锭)电泳检测. 以CpG甲基化转移酶(Sss. I酶)处理后的健康人基因组DNA作甲基化阳性对照, 未经该酶处理的健康人基因组DNA为非甲基化阳性对照, 以双蒸水作阴性对照.

1.2.2 实时荧光定量RT-PCR: 组织RNA按照TRIzol试剂说明书提取, 并紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度($A_{260}/A_{280}>1.8$). 取4 μg总RNA进行逆转录合成cDNA, 逆转录条件按逆转录酶说明书进行. 合成后的cDNA用于实时荧光定量PCR, 其体系为: 1 μL cDNA, 上下游引物的混合物(10 μmol/L)1 μL, 7.5 μL SYBR Green, 去离子水补足至15 μL. 反应条件: 95℃预变性10 min, 95℃变性15 s, 60℃复性15 s, 72℃延伸45 s, 共40个循环反应. 采用18SrRNA为内参. Real-time RT-PCR引物序列根据外文文献[2], 见表1. 电泳检测扩增产物条件同前.

1.2.3 标准曲线的绘制: 将逆转录后的cDNA按照10倍, 100倍, 1 000倍浓度梯度稀释进行实时荧光定量PCR测得四个不同浓度下荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数(threshold cycle, Ct)值绘制标准曲线.

1.2.4 MSP结果判定: 甲基化和非甲基化引物阳性的目的条带分别为139 bp和142 bp, 如果甲基化引物扩增后出现大小为139 bp特异性条带, 则认为启动子区域存在甲基化, 若非甲基化引物扩增后出现大小为142 bp特异性条带, 则认为启动子区域存在非甲基化, 甲基化和非甲基化引物扩增后同时出现139 bp和142 bp特异性条带为部分甲基化, 也认为启动子区域存在甲基化.

统计学处理 用P-faffi法计算胃癌和癌旁组织中MAL基因mRNA表达差异倍数, 以mean±SD表示, 采用样本t检验或近似t检验进行统计学分析. 计数资料采用Fisher精确概率法和Ridit分析. 所有数据运用SPSS14.0软件进行分析. 以 $P<0.05$ 差异有统计学意义.

■ 研发前沿

MAL基因若作为胃癌诊断指标、指导预后和治疗靶点应用于临床仍有待进一步研究.

■ 相关报道

Mimori等在研究食管癌组织基因表达时发现食管癌发生、发展与MAL基因表达关系密切,通过微点阵技术发现MAL基因在食管癌中比正常食管上皮表达显著下调,其在正常食管上皮细胞中强烈表达,在食管癌细胞中不表达。

表 1 MAL基因启动子区MSP及Real time RT-PCR分析用引物

引物	上游5'-3'	下游5'-3'	扩增产物 (bp)	退火温度(°C)
MAL-M	TTCGGGTTTTTTTGTTTTAATTC	GAAAACCATAACGACGTACTAACGT	139	56
MAL-U	TTTTGGGTTTTTTGTTTTAATTT	ACAAAAACCATAACAACATACTAACATC	142	56
MAL-P	GCAAGACGGCTTCACCTACAG	GCAGAGTGGCTATGTAGGAGAACA	74	59
18SrRNA	CGAGCCGCCTGGATACC	CCTCAGTTCGAAAACCAACAA	76	61

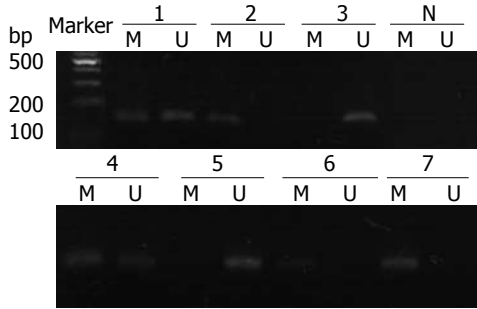


图 1 MSP法检测胃癌组织MAL基因甲基化状态. M: 甲基化; U: 未甲基化; 1, 6, 7: 胃癌组织; 2: 甲基化阳性对照; 3: 非甲基化阳性对照; 4, 5: 癌旁组织; N: 阴性对照。

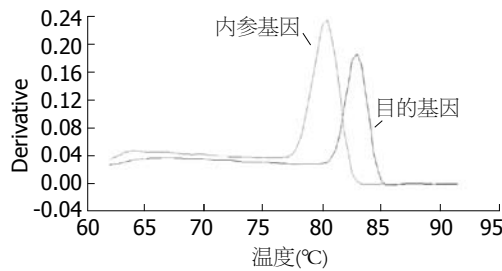


图 2 实时荧光定量RT-PCR法目的基因与内参基因扩增产物溶解曲线。

2 结果

2.1 MSP 37例胃癌组织中有29例检测到甲基化, 甲基化率为78.4%。对应37例癌旁组织2例出现甲基化, 甲基化率为5.4%。癌组织与癌旁组织之间统计学分析有非常显著性差异($P < 0.01$, 图1)。胃癌组织中MAL基因甲基化状态与患者年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移、胃癌分化程度、临床分期无统计学意义($P > 0.05$, 表2)。

2.2 实时荧光定量PCR结果 通过溶解曲线分析扩增产物显示为单峰(图2), 提示产物特异性高, 定量准确, 扩增片段经2%琼脂糖电泳, 扩增片段长度与理论大小一致(图3)。以cDNA稀释倍数取对数值为横坐标, 以对应Ct值为纵坐标作图, 做出的标准曲线(图4), 回归系数为0.9967, 接近1, 说明线性好并计算MAL基因扩增效率为92%。同样方法计算内参基因的扩增效率为106%, 两者均接近100%, 但相差大于5%, 用Pffaffi法计算

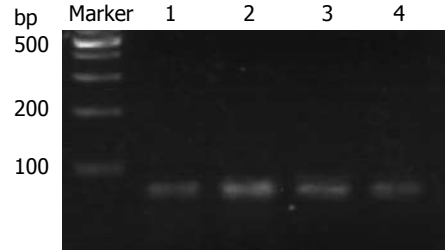


图 3 实时荧光定量RT-PCR扩增产物凝胶电泳图. 1, 2: 18SrRNA目的条带; 3, 4: MAL目的条带; 1, 3: 癌组织; 2, 4: 癌旁5 cm组织。

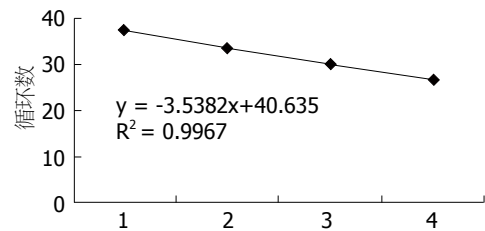


图 4 实时荧光定量RT-PCR检测胃癌组织MAL基因mRNA标准曲线。

MAL基因的mRNA相对表达水平, 公式如下: 表达水平 = 目的基因扩增效率(癌组织目的基因Ct值-癌旁组织目的基因Ct值)/内参基因扩增效率(癌旁组织内参基因Ct值-癌组织内参基因Ct值), 结果显示MAL基因mRNA在胃癌组织与对应癌旁组织中表达有统计学差异($P < 0.05$), 且发现其在胃癌组织中的表达下调与患者年龄、性别、肿瘤大小、胃癌分化程度、有无淋巴结转移、有无神经束浸润及肿瘤TNM分期无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

2.3 MAL基因甲基化与MAL基因mRNA表达的关系 用Pffaffi法计算所得的数值大于1为基因表达阳性, 小于1为基因表达阴性。采用Ridit法分析, MAL mRNA表达不同的组织中MAL基因的甲基化水平有差异($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

MAL基因是Alonson等^[3]在1987年发现的一个在T细胞分化中晚期时表达的基因。MAL基因组定位于人染色体2cen-q13, 全长21 kb, 相对

表 2 胃癌组织中MAL基因甲基化及其mRNA定量表达分析

临床病理指标	n	甲基化阳性(n)	P值	Pfaff法结果	P值
性别					
男	24	17	0.216	0.8870 ± 0.3978	0.907
女	13	12		0.9016 ± 0.3105	
年龄(岁)					
≥60	23	16	0.123	0.8427 ± 0.3762	0.361
<60	14	13		0.9608 ± 0.3403	
分化程度					
低分化	24	20	0.413	0.8832 ± 0.4007	0.646
中分化与 高分化	13	9		0.9553 ± 0.2926	
淋巴转移					
有	24	18	0.685	0.9672 ± 0.4001	0.144
无	13	11		0.7783 ± 0.2636	
肿瘤大小(cm)					
≥5	18	16	0.232	0.9449 ± 0.4347	0.474
<5	19	13		0.8493 ± 0.2915	
神经束浸润					
有	18	15	0.693	0.9113 ± 0.4457	0.780
无	19	14		0.8754 ± 0.2710	
TNM分期					
0+ I + II	10	7	0.655	0.7791 ± 0.2183	0.070
III + IV	27	22		1.0135 ± 0.4350	
癌组织	37	29	0.000		0.044
癌旁组织	37	2			

表 3 MAL基因甲基化与MAL mRNA表达关系

	阳性	阴性	P值
无甲基化	5	3	0.033
部分甲基化	4	8	
完全甲基化	3	14	

■ 同行评价

本研究设计基本合理, 内容新颖, 有一定的临床意义。

成分. 顶端运输是一些特定的细胞极性运输脂肪和蛋白成分至顶膜, 这种运输方式是上皮细胞所固有的, 功能极性运输功能的丧失往往与恶性转化过程有关^[5]. 目前已经证实MAL在顶端运输中发挥作用. MAL基因涉及细胞内运输、基因表达、免疫调节等重要方面. 目前多项研究显示, MAL具有抑癌功能, 能抑制肿瘤细胞的活性、侵袭性和致肿瘤性. MAL基因表达缺失和人类多种恶性肿瘤发生、发展有关.

Mimori等^[6]在研究食管癌组织基因表达时发现食管癌发生、发展与MAL基因表达关系密切, 通过微点阵技术发现MAL基因在食管癌中比正常食管上皮表达显著下调, 其在正常食管上皮细胞中强烈表达, 在食管癌细胞中不表达. Wang等^[7]采用非放射性RNA原位杂交方法对33例食管癌及其癌旁黏膜组织进行了MAL基因的检测和分析, 发现所有正常食管上皮组织均表达MAL基因, 只有8例肿瘤细胞表达MAL, 两者MAL基因的表达有显著差异, 当将肿瘤组织的表达情况与临床各参数分析时, MAL基因与病理分级、原发病灶、淋巴结转移、远处转移、临床分期等无关, 提示该基因异常可能是食管癌发生中的较早期事件. 本研究结果显示MAL mRNA在胃癌组织与对应癌旁组织中表达有统计学差异($P < 0.05$), 可见MAL mRNA的表达下调与胃癌的发生有一定关系. 其在胃癌组织中的表达下调与患者年龄、性别、肿瘤大小、胃癌分化程度、有无淋巴结转移、有无神经束浸润及肿瘤TNM分期无统计学意义($P > 0.05$).

DNA甲基化是最早发现的基因表观修饰方式之一, 他是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基转移到特定碱基上的过程. DNA甲基化能关闭某些基因的活性, 去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达. Lind等^[1]通过MSP及测序的方法显示肠腺瘤与肠癌组织中较正常肠黏膜组织MAL基因发生甲基化的频率高, 分别是71%与80%, 而正常组织甲基化率为4%; 在肠癌细胞株中, MAL基因甲基

分子质量16.7103 Da, 有4个外显子和3个内含子. MAL基因编码T细胞分化蛋白, 与BENE、Plasmolipin、EST克隆H09290同属于一个大的基因家族. 结构分析显示, 他们所编码的蛋白均为四折跨膜蛋白质, 是不溶于去垢剂的富含糖脂和胆固醇的膜微结构域成分. 其成员在多种组织如食管、胃肠道、肺、肾等广泛表达, 而且不同种属之间有同源蛋白质, 提示他们在细胞中有重要的功能. 1997年Millán等^[4]提出MAL参与顶端传送体的形成, 可能是高尔基体和远端质膜之间囊泡转运和蛋白质分选的一个功能

化水平与其mRNA表达缺失相关;在肠癌标本中, MAL mRNA表达阳性的组织中其甲基化水平低于表达阴性组织,但在统计学上无意义.本研究中结果显示37例胃癌组织的MAL基因甲基化率为78.4%,37例癌旁组织的MAL基因甲基化率为5.4%,癌组织与癌旁组织的甲基化率的差异有统计学意义($P<0.01$),表明在胃癌组织中MAL基因存在着高甲基化. MAL mRNA表达不同的胃癌组织中MAL基因的甲基化水平有差异,由此表明MAL基因甲基化可能是其表达缺失或低下的重要原因.我们还发现,胃癌组织中MAL基因甲基化状态与患者肿瘤大小、有无淋巴结转移、胃癌分化程度、临床分期无统计学意义($P>0.05$),可能存在以下原因:(1)MAL基因甲基化发生于胃癌早期;(2)基因启动子甲基化区域、水平存在差异造成了统计学上无意义. Buffart等^[8]对MAL基因启动子上两个发生了甲基化的区域进行了研究,分别是M1区[(-680)-(-573) bp]和M2区[(-92)-(-7) bp],不同胃癌组织在这两个区域发生甲基化率不同,其单变量分析显示MAL基因甲基化率在胃癌组织病理类型、胃癌患者临床分期上无统计学意义;(3)还存在其他基因表达调节机制和癌细胞侵袭转移机制.

总之, MAL基因表达在胃癌组织中异常减少或缺失,胃癌组织中MAL基因存在高甲基化,其甲基化可能是该基因失活的重要方面. MAL基因若要作为胃癌诊断指标、指导预后和治疗

靶点应用于临床仍有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Lind GE, Ahlquist T, Kolberg M, Berg M, Eknaes M, Alonso MA, Kallioniemi A, Meling GI, Skotheim RI, Rognum TO, Thiis-Evensen E, Lothe RA. Hypermethylated MAL gene - a silent marker of early colon tumorigenesis. *J Transl Med* 2008; 6: 13
- 2 Wilting SM, de Wilde J, Meijer CJ, Berkhof J, Yi Y, van Wieringen WN, Braakhuis BJ, Meijer GA, Ylstra B, Snijders PJ, Steenbergen RD. Integrated genomic and transcriptional profiling identifies chromosomal loci with altered gene expression in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 890-905
- 3 Alonso MA, Weissman SM. cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1997-2001
- 4 Millán J, Puertollano R, Fan L, Rancano C, Alonso MA. The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochem J* 1997; 321 (Pt 1): 247-252
- 5 Marazuela M, Alonso MA. Expression of MAL and MAL2, two elements of the protein machinery for raft-mediated transport, in normal and neoplastic human tissue. *Histol Histopathol* 2004; 19: 925-933
- 6 Mimori K, Nishida K, Nakamura Y, Ieta K, Yoshikawa Y, Sasaki A, Ishii H, Alonso MA, Mori M. Loss of MAL expression in precancerous lesions of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1670-1677
- 7 Wang Z, Wang M, Xu X, Xu Z, Han Y, Cai Y, Sun Y, Wu M. Studies of MAL gene in human esophageal cancer by RNA in situ hybridization. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2000; 17: 329-331
- 8 Buffart TE, Overmeer RM, Steenbergen RD, Tijssen M, van Grieken NC, Snijders PJ, Grabsch HI, van de Velde CJ, Carvalho B, Meijer GA. MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 1802-1807

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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项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.(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

大肠癌潜在标志物—热休克蛋白27

刘伟杰, 秦环龙, 马延磊, 彭佳远

刘伟杰, 秦环龙, 马延磊, 彭佳远, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
刘伟杰, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究, 上海市科学技术发展基金资助项目, No. 05DJ14010
作者贡献分布: 刘伟杰与秦环龙对此文所作贡献均等; 此课题由刘伟杰、秦环龙、马延磊及彭佳远设计; 研究过程由刘伟杰、马延磊及彭佳远操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由秦环龙提供; 数据分析由刘伟杰、马延磊及彭佳远完成; 本论文写作由刘伟杰与秦环龙完成。
通讯作者: 秦环龙, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hl_qin@yahoo.com.cn
电话: 021-64369181-8261
收稿日期: 2010-01-24 修回日期: 2010-03-16
接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-28

Heat shock protein 27: a potential biomarker for colorectal carcinoma

Wei-Jie Liu, Huan-Long Qin, Yan-Lei Ma, Jia-Yuan Peng

Wei-Jie Liu, Huan-Long Qin, Yan-Lei Ma, Jia-Yuan Peng, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Supported by: the Shanghai Science and Technology Development Fund, No. 05DJ14010
Correspondence to: Professor Huan-long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. hl_qin@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-24 Revised: 2010-03-16
Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To find specific biomarkers for colorectal carcinoma using a proteomic method to provide clues to early diagnosis, prognosis and therapy of colorectal carcinoma as well as to understanding the molecular mechanisms governing cancer progression.

METHODS: Six colorectal carcinoma patients were included in the study. High-resolution two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were utilized for the identification of proteins differentially expressed between cancer and adjacent non-cancerous tissue. The differential expression of heat shock protein 27 (HSP27)

was further verified by Western blot and immunohistochemistry.

RESULTS: Comparative analysis of 2-DE maps revealed 42 differentially expressed proteins between the two groups. Ten differential proteins were further identified by mass spectrometry, including HSP27, disulfide isomerase (DI), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HnRNP A2/B1), triosephosphate isomerase (TIM), pyruvate kinase, etc. Western blot and immunohistochemistry analyses confirmed the overexpression of HSP27 in colorectal carcinoma. These results indicate that HSP27 may be a potential biomarker for colorectal cancer.

CONCLUSION: Many differential proteins are identified between cancer and adjacent non-cancerous tissue in patients with colorectal carcinoma. HSP27 might be a potential biomarker for early diagnosis, therapy and prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Heat shock protein 27; Proteomics; Biomarker

Liu WJ, Qin HL, Ma YL, Peng JY. Heat shock protein 27: a potential biomarker for colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1237-1243

摘要

目的: 探讨大肠癌特异性标志物, 为大肠癌的早期诊断、预后判断和治疗提供帮助, 同时为理解大肠癌的发病机制提供线索。

方法: 收集6例大肠癌患者, 应用高灵敏的二维凝胶电泳和MALDI-TOF-MS技术检测出肿瘤黏膜和邻近正常结肠黏膜之间差异表达的蛋白。对其中之一热休克蛋白27(HSP27)进行Western blot和免疫组织化学验证。

结果: 筛选出42个具有明显表达差异的蛋白质点, 质谱鉴定出10个差异表达蛋白, 包括HSP27、二硫异构酶、核不均一核糖核蛋白A2/B1、磷酸丙糖异构酶、丙酮酸激酶等。Western blot和免疫组织化学结果证实HSP27

背景资料

大肠癌是最常见的癌症类型之一, 其肿瘤标志物为研究热点, 蛋白质组学被认为是在整体蛋白表达分析中的一种重要技术并有助了解基因功能。

同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

■ 研发前沿

HSP27在大肠癌的致癌过程中所起的作用仍然不清,但其表达水平在包括神经母细胞瘤,肝癌,食管腺癌和胃癌中增加。

在大肠癌中有过度表达,提示其可能为重要的肿瘤标志物。

结论: 大肠癌肿瘤组织与大肠正常黏膜之间存在差异表达蛋白, HSP27在大肠癌中有异常表达,可能作为大肠癌发生、发展的候选生物标志物。

关键词: 大肠癌; 热休克蛋白27; 蛋白质组学; 生物标志物

刘伟杰, 秦环龙, 马延磊, 彭佳远. 大肠癌潜在标志物—热休克蛋白27. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1237-1243
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1237.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是第三大最常见的癌症类型,全世界癌症引起死亡位居第4位. 全球每年有近100万大肠癌新发病例, 492 000人因该病而死亡^[1]. 大肠癌患者累计生存风险达6%^[2]. 最近的研究关注于肿瘤发生的遗传变化. 但是,一些独立的研究已表明,转录水平的研究存在明显缺点^[3-5]. mRNA定量并不能精确反应蛋白水平的差异^[6]. 因此,直接比较正常组织与肿瘤间的差异蛋白质似乎更精确. 随着后基因组时代的到来,蛋白质组学被认为是在整体蛋白表达分析中的一种重要技术并有助了解基因功能^[7]. 蛋白质组学借助一种高通量的鉴定方式,可研究由疾病过程中整体蛋白质的变化,因为他能够同时分析成千上万的修饰或未修饰的蛋白质^[8,9]. 所以蛋白质组学常应用于多种癌症的标志物检测^[10-17]. 虽然已有蛋白质组学研究报道^[18-20]结果略有差异,原因可能是由于种族差异、不同程度的质谱分析能力,或特定的蛋白质的技术问题. 二维凝胶电泳(2-dimension electrophoresis, 2-DE)仍然是许多研究蛋白质组学的首选技术^[21]. 因为他简单,可靠性高,所包含信息量大以及便于掌握,是最常用的方法. 在合适条件下,数千种蛋白质可以溶解在单一的2-DE凝胶上,便于大规模的研究差异表达分子^[22]. 本研究目的是使用2-DE和MALDI-TOF/TOF质谱技术检测新的大肠癌相关分子.

1 材料和方法

1.1 材料 选取在上海交通大学附属第六人民医院普外科进行手术的大肠癌患者(术前未经任何放、化疗,无明显其他系统疾病者)6例,对该组患者的大肠黏膜组织进行蛋白质组学研究. 于

术中切除肿瘤标本后剪取肿瘤处黏膜组织和距肿瘤10 cm以上结肠黏膜组织(病理证实无肿瘤浸润转移)各约2 g作为肿瘤组(Ca组)和正常黏膜组(N组),并立即转移至-70 °C冰箱中保存.

1.2 方法

1.2.1 蛋白提取和定量: 将患者的组织样品自超低温冰箱取出、化冻后,各取1 g左右,用生理盐水清洗干净后,剪成1 mm×1 mm×1 mm小块,加入500 μL lysis Buffer(9.5 mol/L Urea, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% carrier ampholyte(3-10NL), 罗氏cooktail酶抑制剂,使用DOUNCE匀浆器进行匀浆,然后超声破碎. 整个过程在冰浴进行. 离心14 000 r/min, 1 h,收集上清. 使用Bio-Rad protein assay reagent定量,采用Bradford法. 将每组内6个样品等量合并,重新定量后分装成100 μg一管,置于500 μL离心管中,-70 °C低温保存.

1.2.2 双向电泳: 将等量合并后的样品各作三块凝胶,每个样品上样100 μg. 第一向,等电聚焦,EF为pH3-10非线性胶条,电泳条件: 30 V 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8 h, 500 V 4 h; 第二向SDS-PAGE电泳, SDS-PAGE为12.5%的胶(15 mA/胶 30 min, 30 mA/胶至溴酚蓝离胶下沿0.5 cm).

1.2.3 染色: 银染,水洗5 min, 400 mL/L乙醇、100 mL/L乙酸重复固定15 min,重复2遍. 300 mL/L乙醇、0.2%硫代硫酸钠、6.8%乙酸钠30 min. 水洗5 min,重复3遍. 2.5%碳酸钠,0.04%的甲醛溶液,显影至背景出现,1.46% EDTA溶液停显10 min. 水洗3 min,重复3遍.

1.2.4 扫描、凝胶图像分析及统计分析: 凝胶通过UMax Powerlook 2110XL扫描获得6张2-DE图谱(每组3张,共2组,分别为正常黏膜组、肿瘤组). 利用ImageMaster软件分析图谱,将以上2组图谱作比较,蛋白点按照他们的相对体积(relative volume)进行定量分析,据此来比较2组2-D图谱上相同位置蛋白点的表达强度的差异. 选取有至少1.5倍量变的蛋白斑点作为鉴定的差异候选蛋白. 统计方法: 计算每组中同一蛋白点在3张2-D图谱上相对体积(relative volume)的均值,统计分析2组的均值,2组间的比较采用*t*检验. 相对体积的计算按照如下方法: 每个点的体积/胶上所有点的体积. 为了验证重复性,2-DE分别重复3次.

1.2.5 质谱及生物信息学分析: 选取图像分析得到的差异蛋白点,切下差异点,做胶内酶解,通

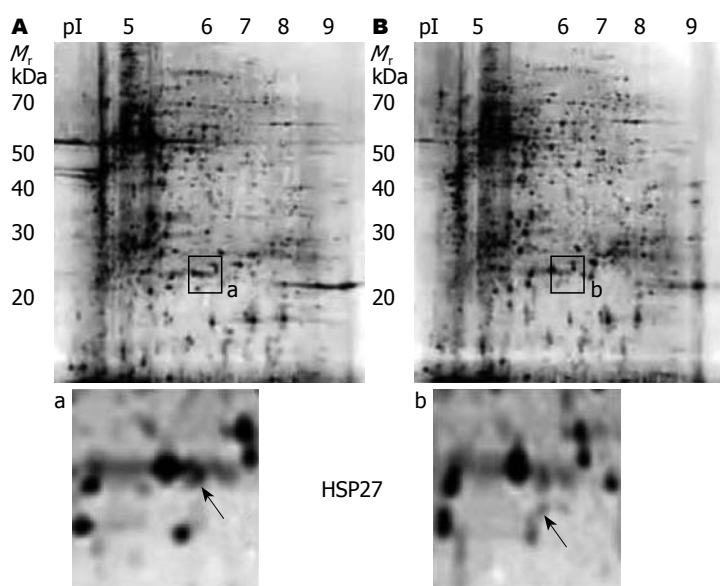


图1 两组组织2-DE图谱. A: 正常黏膜组织; B: 大肠癌黏膜组织.

■ 相关报道

肿瘤差异蛋白组已经成为研究肿瘤潜在标志物的重要手段之一, 其能够一次性筛选出多种蛋白以供研究. 目前, 部分研究已经通过肿瘤差异蛋白组方法, 检测出了多种与恶性肿瘤发病、进展及转移相关的差异蛋白.

过MALDI-TOF分析, 获得蛋白点的相应肽质量指纹图谱, 将肽质量指纹数据通过因特网在蛋白质序列库中进行搜索, 搜索软件为Mascot, 数据库选择为NCBIInr, 物种为人类(human), 以Mowse分值为基础的概率(P)评价数据库搜寻结果的质量, 分值大小表示鉴定蛋白属于随机匹配的可能性, >63表明具有显著性意义.

1.2.6 Western blot分析: 利用方法1.2.1所抽提定量的蛋白质(各6个), 每份抽提的蛋白提取10 μ L, 加等体积的2 \times 上样缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10%甘油, 0.1%溴酚蓝, 1 mol/L DTT), 沸水浴煮3 min点样于10%聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE电泳, 20 mA稳流电泳3 h. SDS-PAGE电泳后, 剪取与凝胶大小一致的硝酸纤维素膜及6张Whatman 3 mm滤纸, 浸于转移缓冲液(48 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 39 mmol/L 甘氨酸, 0.037% SDS)中5 min, 进行转膜. 将硝纤膜取出置一平皿中, 加封闭液封闭后, 加入经稀释的一抗(兔抗人HSP27, 多抗, 1:1 000稀释, abCAM公司), 4 $^{\circ}$ C反应过夜, TBST漂洗3次. 加入二抗(1:10 000稀释, Santa Cruz公司), 室温作用2 h. 取出膜后TBST充分漂洗, 加入ECL显色液, 置于柯达活体成像仪中观察结果, 条件设置为曝光5 min, CCD自动获取图片结果. 蛋白表达值为条带的灰度值以 β -actin(1:1 000稀释, Santa Cruz公司43 kDa)内参照校正. 待测蛋白相对含量计算如下: 灰度值 = 条带面积 \times (条带灰度-背景灰度); 相对含量 = 待测蛋白灰度值/ β -actin(内参)灰度值.

1.2.7 免疫组织化学分析: 4 μ m石蜡切片贴在涂有切片黏合剂的载玻片上, 58 $^{\circ}$ C烤24 h, 常规

脱蜡. 1% H_2O_2 作用20 min或3% H_2O_2 作用5-10 min以消除内源性过氧化物酶的活性; 抗原修复或酶消化(将切片置于0.01 mol/L pH6.0 CB(柠檬酸缓冲液)中, 微波III档(98 $^{\circ}$ C), 10 min \times 2次, 自然冷却至室温; PBS洗3 min \times 3次, 1%二抗(1:400稀释)正常血清室温下封闭20 min. 然后加适当稀释一抗(兔抗人HSP27, 多抗, 1:50稀释, abCAM公司), 37 $^{\circ}$ C 1-2 h; PBS洗3 min \times 3次; 阴性对照组加入PBS代替一抗, EnVision试剂37 $^{\circ}$ C, 10-15 min; PBS洗3 min \times 3次; 0.04% DAB+0.03% H_2O_2 显色8 min左右, 镜下控制显色程度, 即时终止; 自来水洗3 min, 复染(苏木素衬染30 s, 水洗, 盐酸乙醇蓝化2 s, 水洗, 微波蓝化), 常规树脂封片; 结果, 阳性产物为棕黄色或棕褐色, 背景为蓝色.

统计学处理 统计学分析采用SPSS11.5版本软件.

2 结果

2.1 大肠癌组织与周围正常组织差异表达2-DE谱 通过2-DE技术, 得到大肠癌蛋白质及邻近正常组织蛋白表达谱. 对肿瘤和相应正常组织的蛋白质谱进行比较, 检测出多种差异表达蛋白. 应用Computer-assisted Image Master软件(GE healthcare)对差异表达蛋白进行定量和定性分析, 蛋白表达强度差异在1.5倍以上者, 被认为差异蛋白, 做进一步质谱分析(图1).

2.2 差异蛋白的质谱鉴定 筛选出42个具有明显表达差异的蛋白质点, 对其中表达差异最显著的13个点作MALDI-TOF质谱分析, 按照质谱分析所得的肽指纹图谱及相对分子量和等

■创新盘点

本研究利用高通量的蛋白质组学技术,结合Western blot与免疫组织化学,筛选出了HSP27作为候选标志物。

表 1 质谱分析检测出的10个差异表达蛋白

差异点号	Mowse分值	相对分子质量(Da)	蛋白名称	序列覆盖率(%)	pI
706	78	57 043	二硫异构酶	16	6.10
1627	69	31 144	核不均一核糖核蛋白A2/B1	20	9.14
1741	72	42 480	α -肌动蛋白	12	5.23
1777	83	58 441	丙酮酸激酶	23	7.58
1794	127	57 754	角蛋白复合体1	32	6.95
2139	188	62 255	角蛋白9	28	5.14
2282	68	22 826	热休克蛋白27	25	5.98
2300	66	22 518	平滑肌蛋白	9	8.56
2396	79	26 894	磷酸丙糖异构酶	10	7.10
2412	77	22 518	平滑肌蛋白	9	8.56

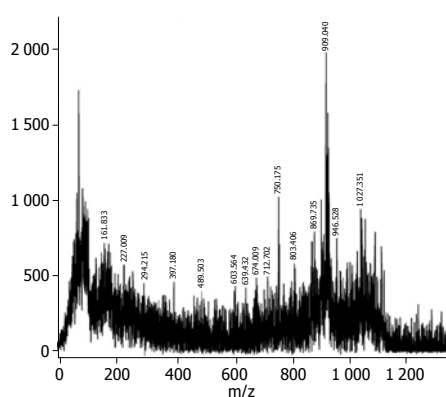


图 2 经质谱分析所得的肽指纹图谱(HSP27)。

电点,通过对比网上数据库共检测出10个蛋白,包括HSP27、 α -肌动蛋白(α -actin)、二硫异构酶(disulfide isomerase, DI)、平滑肌蛋白(smooth muscle protein)2个、核不均一核糖核蛋白A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1, HnRNP A2/B1)、磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, TIM)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase)、角蛋白9(Keratin 9)、角蛋白复合体1(Keratin mixture 1)。表1列举了上述10个蛋白的信息。

上述差异蛋白中,有5种蛋白在过去的大肠癌蛋白质组学研究未见报道,他们是:HSP27、DI、HnRNP A2/B1、TIM、丙酮酸激酶,而HSP27差异最为显著,在癌组织中的表达量是正常组织中的2.93倍。图2、图3为HSP27的质谱检测结果,其在肿瘤中的表达水平较正常组织中显著升高。

2.3 大肠癌中HSP27的高表达 Western blot验证结果显示,大肠癌组织中,HSP27明显升高,癌组织为 0.5345 ± 0.1364 ,正常组织为 0.3403 ± 0.0482 ($P = 0.0092$,图4,5)。这结果与2-DE结果相

符。同时,免疫组织化学证实,大肠癌细胞质及细胞核中可见HSP27的强染色,周围间质中却很少见相似的染色(图6),这也从另一方面证实了蛋白质组学的研究结果。

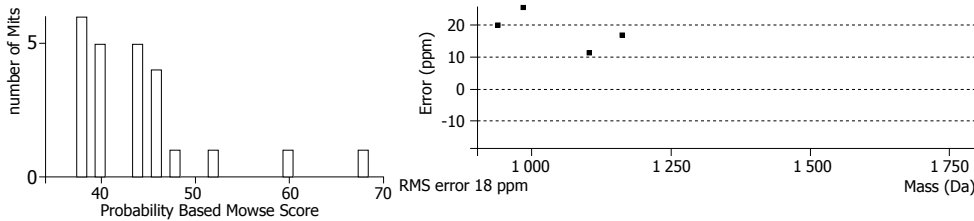
3 讨论

大肠癌是消化系统常见的肿瘤,其发病率和死亡率无论在发达国家还是在发展中国家都呈上升趋势,而大肠癌的早期诊断及复发的早期检测是其有效治疗的关键。由于细胞的功能分子是蛋白质,所以蛋白分析较cDNA芯片更具临床价值^[30]。对于肿瘤和正常组织,比较蛋白质组学能检测出候选差异蛋白分子,有助于肿瘤的诊断、治疗等。本研究的旨在找寻这些分子,为未来大肠癌的发病机制、诊断及治疗奠定基础。本研究中,通过蛋白质组学技术,我们建立了大肠癌及临近正常组织之间的差异表达蛋白谱,并且检测出了10个候选分子、大多数分子参与细胞的生物学过程,包括细胞增殖、转化、凋亡、代谢、蛋白折叠,构建细胞骨架等功能。其中的5个蛋白包括:HSP27、DI、HnRNP A2/B1、TIM、丙酮酸激酶在其他器官的恶性肿瘤中有报道,但在大肠癌中的表达未见报道。由于研究表明HSP27可能与大肠癌基因突变相关^[23-29],所以随后的研究更多关注于HSP27。

HSP27属于热休克蛋白,相对分子质量27 kDa,依据不同的磷酸化状态,其在细胞内存在不同的聚合体状态,如单聚体、两聚体或多聚体,磷酸化则发生于丝裂原赖的蛋白激酶/p38途径。HSP27在细胞生物学过程中参与细胞信号传导,从而影响细胞的分化、凋亡等。HSP27在大肠癌的致癌过程中所起的作用仍然不清,但其表达水平在包括神经母细胞瘤^[24],肝癌^[25],食管

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 65 significant ($P < 0.05$).



应用要点

本研究结果提示HSP27为大肠癌的一种潜在标志蛋白, 为深入了解大肠癌的发生机制及抗凋亡能力提供有价值的信息。

Protein View

match to: gi | 662841 Score: 68 Expect: 0.033
heat shock protein 27 [Homo sapiens]

Nominal mass (M_r): 22 427; Calculated pI value: 7.83
NCBI BLAST search of gi | 662841 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy Homo sapiens

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 31
Number of mass values matched: 5
Sequence Coverage: 25

Matched peptides shown in Light Gray

```

1 MTERRVPPSL LRGPSWDPFR DWYPHSR.LFD QAFGLPRLPE EWSQWLGGSS
51 WPGYVRPLPP AAIESPAVAA PAYSRALSRQ LSSGVSEIRH TADRWRVSLD
101 VNHAFDELK VKTKDGVVEI TKGHEERQDE HGYISRCFTR KYILPPGVDP
151 TQVSSLSLPE GTLTVPEAMP KLATQSNEIT IPVTFESRAQ LGGRSCKIR
    
```

图 3 NCBInr搜索结果.

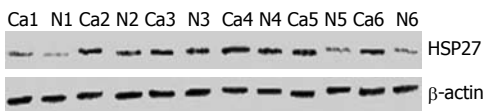


图 4 两组中HSP27的Western blot分析结果. N: 正常黏膜组织; Ca: 大肠癌黏膜组织.

腺癌^[26]和胃癌^[29]中增加. 作为不依赖ATP的分子伴侣, HSP27通过抑制应激诱导及死亡受体诱导的细胞凋亡途径而实现抗细胞凋亡作用^[31]. 热休克蛋白是一种多功能的细胞凋亡调节因子, 在凋亡途径的多个节点进行调节^[32]. HSP27的表达水平增加可能引起肿瘤的抗宿主防御机制, 提高肿瘤细胞转移潜力. 这也支持Parcellier等的研究^[33], 他们的结果提示HSP27能够促进磷酸化I κ B α 水解和增强NF- κ B的活性, 这可能说明其具有抗凋亡的特性. 因此, HSP27具有致肿瘤作用也不足为奇.

高通量蛋白组学技术的出现, 将检测出更多的新的分子生物标志物或蛋白质生物标志物, 使恶性肿瘤的早期诊断更可靠, 并预测其进展^[34]. 在本研究中, 通过比较蛋白组学来寻找大肠癌及相对正常大肠黏膜之间的差异表达蛋白, 取得了一定的结果. 肿瘤标志物(tumor

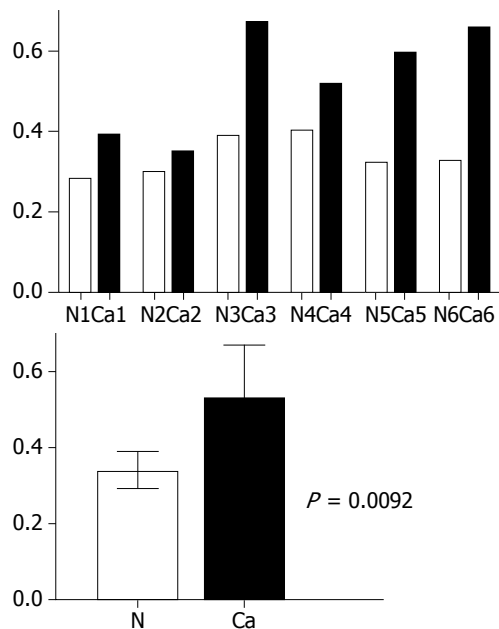


图 5 两组中HSP27的相对含量及两组平均值. N: 正常黏膜组织; Ca: 大肠癌黏膜组织.

biomarker)是在肿瘤细胞或其周围组织中一系列基因表达改变的结果, 例如病毒基因的插入、DNA甲基化、染色体移位等导致细胞内分子水平的改变, 从而产生肿瘤标志物. 肿瘤标志物检

■同行评价

本研究方法有一定先进性, 提供了一定有参考价值的信息, 但仍需进一步研究.

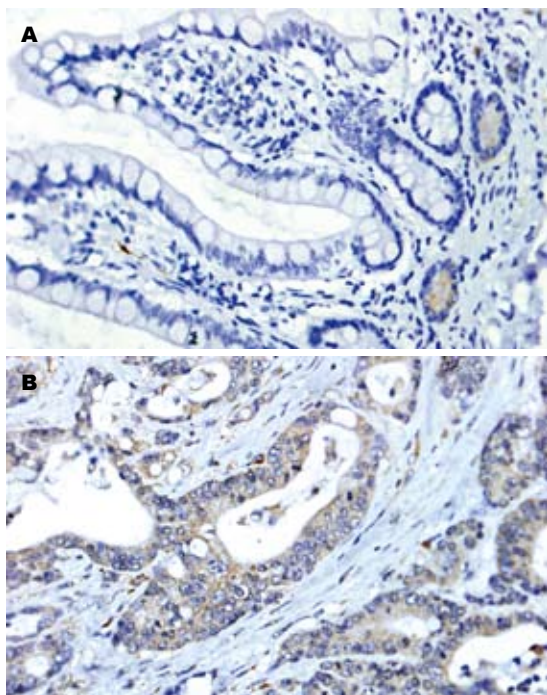


图6 免疫组织化学方法示HSP27在2种组织的表达($\times 400$). A: 正常大肠黏膜; B: 大肠癌黏膜组织.

测已成为继影像诊断和病理诊断之后临床最常用的肿瘤诊断方法之一. 理想肿瘤标志物应具有较强的肿瘤特异性, 并可检测出最小的病灶, 能定量反映肿瘤负荷. 免疫印迹分析进一步证实HSP27的双向电泳结果, 显示其在大肠癌组织中显著高于正常大肠组织. 同时, 免疫组织化学证实HSP27的细胞定位主要位于肿瘤细胞的细胞质和细胞核内, 并不表达于周围间质. 以上研究结果表明, 蛋白质组学研究结果可靠, 并认为HSP27可能参与大肠癌癌变过程, 为大肠癌的一种潜在标志物.

通过差异蛋白质组学研究, 我们检测出HSP27为大肠癌变过程的一个标志分子. 通过HSP27及其他相关分子的深入研究, 将会为解释“大肠腺瘤及腺癌序列”提供依据, 为大肠癌早期诊断, 判断预后、协助治疗提供依据. 未来的研究涉及通过干扰RNA技术阻断其表达, 来观察细胞株的变化. 同时需要进一步研究来阐明HSP27在肿瘤的发生中的具体作用, 并确认他是否是针对肿瘤应激的快速反应分子, 或是大肠癌进展的生物学标志物.

4 参考文献

- Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC,

- Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997; 18: 533-537
- Cole AR, Ji H, Simpson RJ. Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: a comparison with colonic polyps. *Electrophoresis* 2000; 21: 1772-1781
- Gordon JL, Smith DP, Alpers DH, Strauss AW. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding a portion of rat intestinal preapolipoprotein AIV messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 1982; 21: 5424-5431
- 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
- Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma DJ, Man XB, Hong Y, Zhang L, Li L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics* 2005; 5: 1125-1139
- Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 683-695
- Li Z, Zhao X, Bai S, Wang Z, Chen L, Wei Y, Huang C. Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1810-1823
- Herrmann PC, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Cancer proteomics: the state of the art. *Dis Markers* 2001; 17: 49-57
- Byrne JC, Downes MR, O'Donoghue N, O'Keane C, O'Neill A, Fan Y, Fitzpatrick JM, Dunn M, Watson RW. 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res* 2009; 8: 942-957
- Park HJ, Kim BG, Lee SJ, Heo SH, Kim JY, Kwon TH, Lee EB, Ryoo HM, Cho JY. Proteomic profiling of endothelial cells in human lung cancer. *J Proteome Res* 2008; 7: 1138-1150
- Dowling P, O'Driscoll L, Meleady P, Henry M, Roy S, Ballot J, Moriarty M, Crown J, Clynes M. 2-D difference gel electrophoresis of the lung squamous cell carcinoma versus normal sera demonstrates consistent alterations in the levels of ten specific proteins. *Electrophoresis* 2007; 28: 4302-4310
- Sun W, Xing B, Sun Y, Du X, Lu M, Hao C, Lu Z, Mi W, Wu S, Wei H, Gao X, Zhu Y, Jiang Y, Qian X, He F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1798-1808
- Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/ TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis* 2006; 27: 1641-1650
- Qi YJ, He QY, Ma YF, Du YW, Liu GC, Li YJ, Tsao GS, Ngai SM, Chiu JF. Proteomic identification

- of malignant transformation-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1625-1635
- 17 Yoo C, Zhao J, Pal M, Hersberger K, Huber CG, Simeone DM, Beer DG, Lubman DM. Automated integration of monolith-based protein separation with on-plate digestion for mass spectrometric analysis of esophageal adenocarcinoma human epithelial samples. *Electrophoresis* 2006; 27: 3643-3651
- 18 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
- 19 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
- 20 Olesen SH, Christensen LL, Sørensen FB, Cabezón T, Laurberg S, Orntoft TF, Birkenkamp-Demtröder K. Human FK506 binding protein 65 is associated with colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 534-544
- 21 Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002; 2: 3-10
- 22 Friedman DB, Hill S, Keller JW, Merchant NB, Levy SE, Coffey RJ, Caprioli RM. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4: 793-811
- 23 Xiao G, Lu Q, Li C, Wang W, Chen Y, Xiao Z. Comparative proteome analysis of human adenocarcinoma. *Med Oncol* 2009 Apr 21. [Epub ahead of print]
- 24 Pei H, Zhu H, Zeng S, Li Y, Yang H, Shen L, Chen 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
- 25 Zanini C, Pulerà F, Carta F, Giribaldi G, Mandili G, Maule MM, Forni M, Turrini F. Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma. *Virchows Arch* 2008; 452: 157-167
- 26 Luk JM, Lam CT, Siu AF, Lam BY, Ng IO, Hu MY, Che CM, Fan ST. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006; 6: 1049-1057
- 27 Langer R, Ott K, Specht K, Becker K, Lordick F, Burian M, Herrmann K, Schrattenholz A, Cahill MA, Schwaiger M, Hofler H, Wester HJ. Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 8279-8287
- 28 Guo K, Kang NX, Li Y, Sun L, Gan L, Cui FJ, Gao MD, Liu KY. Regulation of HSP27 on NF-kappaB pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis. *BMC Cancer* 2009; 9: 100
- 29 Doshi BM, Hightower LE, Lee J. The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 445-457
- 30 Giaginis C, Daskalopoulou SS, Vgenopoulou S, Sfiniadakis I, Kouraklis G, Theocharis SE. Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 14
- 31 Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 2907-2918
- 32 Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 61-70
- 33 Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5790-5802
- 34 Melle C, Bogumil R, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von Eggeling F. Detection and identification of heat shock protein 10 as a biomarker in colorectal cancer by protein profiling. *Proteomics* 2006; 6: 2600-2608

编辑 李军亮 电编 何基才

肝硬化低钠血症与Vaptans

向慧玲

■背景资料

肝硬化患者低钠血症的出现往往提示预后不良,而顽固性腹水的利尿剂治疗又进一步加重了低钠血症的发生,目前临床治疗有效手段不多。AVP V₂受体拮抗剂(Vaptans)的出现部分改变了肝硬化腹水治疗的困境。在天津市第三中心医院进行的Tolvaptan的2期临床试验在肝硬化顽固性腹水患者中显示出良好的疗效。

向慧玲,天津市第三中心医院消化内科 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170

通讯作者: 向慧玲, 300170, 天津市, 天津市第三中心医院消化内科, 天津市人工细胞重点实验室. huilingxiang@163.com
电话: 022-84112209

收稿日期: 2010-01-20 修回日期: 2010-04-08

接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-04-28

Hyponatremia in cirrhosis and vaptans

Hui-Ling Xiang

Hui-Ling Xiang, Department of Gastroenterology, Tianjin Third Central Hospital; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China

Correspondence to: Hui-Ling Xiang, Department of Gastroenterology, Tianjin Third Central Hospital; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China. huilingxiang@163.com

Received: 2010-01-20 Revised: 2010-04-08

Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-04-28

Abstract

Hyponatremia is a common problem in patients with advanced cirrhosis. Hyponatremia in cirrhosis includes two distinct types: hypovolemic hyponatremia, and hypervolemic or dilutional hyponatremia. The former is characterized by low blood sodium, low blood volume, dehydration and prerenal renal dysfunction, not accompanied by edema and ascites, while the latter is characterized by insufficient circulatory volume and dilutional hyponatremia, accompanied by edema and ascites. Hyponatremia is closely related to various complications of cirrhosis and to early mortality after liver transplantation. Vaptans, a class of selective non-peptide arginine vasopressin (AVP) receptor antagonists, act by antagonizing specifically the effects of AVP V₂ receptor located in the renal collecting tubules to inhibit water reabsorption without affecting electrolytes excretion. Vaptans has been evaluated by several clinical trials for their role in the management of hyponatremia. The short-term treatment with vaptans is associated with a marked increase in renal solute-free water excretion and improvement of hyponatremia with no apparent adverse reactions. The discovery

of vaptans is considered a new milestone in the management of hyponatremia in cirrhosis.

Key Words: Cirrhosis; Hyponatremia; Vaptans

Xiang HL. Hyponatremia in cirrhosis and vaptans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1244-1249

摘要

低钠血症是晚期肝硬化的常见并发症,包括:低血容量性低钠血症和高血容量性,即稀释性低钠血症。前者以低血钠、低血容量、脱水及肾前性肾功能不全为特征,不伴浮肿和腹水;后者以有效血循环不足,稀释性低血钠为特征,伴有浮肿和腹水。低钠血症与肝硬化的各种并发症及肝移植术后近期死亡率密切相关。Vaptans是一类选择性非肽类精氨酸加压素(AVP)受体拮抗剂类药物,通过与肾脏集合管上AVP V₂竞争性结合,抑制肾脏集合管对水的重吸收,达到排水利尿作用(水利尿),不增加电解质的排泄。已有多项临床试验评价Vaptans在低钠血症中的作用。短期应用Vaptans可以显著增加患者无溶质水的排出,纠正低钠血症,没有明显不良反应。Vaptans被认为是肝硬化低钠血症治疗上的里程碑。

关键词: 肝硬化; 低钠血症; Vaptans

向慧玲. 肝硬化低钠血症与Vaptans. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1244-1249

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1244.asp>

0 引言

低钠血症是失代偿肝硬化的常见并发症之一。尽管在50多年前就有学者提出低钠血症的概念^[1],但低钠血症的临床意义一直被临床医生忽略。19世纪70-80年代,对低钠血症的研究得到一定发展,发现低钠血症与肝硬化预后密切相关^[2]。近年来的研究还表明,低钠血症是肝移植预后的一个重要指标^[3-7]。随着精氨酸加压素受体拮抗剂(vaptans)的出现,低钠血症再一次引起了肝病学者的重视。Vaptans是一类选择性非肽类血

■同行评议者

唐世刚,教授,大连大学附属中山医院内科

管精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)V₂受体拮抗剂, 通过与AVP V₂受体的竞争性结合, 抑制肾脏集合管对水的重吸收, 促进自由水的排出, 从而达到排水利尿作用(水利尿), 并且不伴有电解质排泄的增加. Vaptans的疗效已经在心功能衰竭、抗利尿激素分泌失调及肝硬化低钠血症患者中得到验证^[8-15]. 本文就肝硬化低钠血症的发病机制、临床表现及治疗的最新进展进行综述.

1 低钠血症的定义和发病率

低钠血症是指血清钠浓度低于130 mmol/L, 血浆渗透压低于280 mmol/L, 可伴或不伴有细胞外液容量的改变^[4,16]. 综合国内报道, 肝硬化腹水患者并发低钠血症的比例在50%-60%^[17], 国外报道的比例在30%左右^[18].

2 低钠血症的临床类型

肝硬化低钠血症可分为两大类^[4]: (1)低容量性低钠血症. 这部分患者低钠血症的发生与细胞外液的大量丢失有关, 或因使用利尿剂造成细胞外液从肾脏大量丢失, 或因呕吐腹泻等从胃肠道丢失, 水和钠的同时丧失导致血容量绝对减低和低钠血症. 这类低钠血症以低血钠、低血容量、脱水及肾前性肾功能不全为特征, 不伴有浮肿和腹水. 这类低钠血症患者由于血浆渗透压迅速下降导致脑功能障碍容易继发肝性脑病. (2)高容量性低钠血症或稀释性低钠血症. 这部分患者低钠血症的发生与肝硬化高动力循环及体液的再分配有关, 有效血循环不足导致肾素-血管紧张素-醛固酮系统被激活, 引起肾脏对水的重吸收超过钠的重吸收造成稀释性低钠血症^[19]. 这类低钠血症, 由于体内细胞外液绝对增多, 在出现低钠血症的同时常合并浮肿和腹水. 以下重点讲述稀释性低钠血症.

3 肝硬化稀释性低钠血症的发病机制

正常人通过位于下丘脑的渗透压感受器来调节全身体液的平衡. 肝硬化时肝功能受损, 肝脏对雌激素、抗利尿剂激素和醛固酮灭活减少, 致肾脏对水的重吸收超过钠的重吸收; 严重肝硬化时, 由于内脏循环血管持续扩张, 导致有效血容量不足, 刺激垂体神经部血管加压素持续高分泌, 肾脏自由水清除障碍, 最终导致机体内外水量严重滞留, 而钠的滞留相对不足, 临床表现为稀释性低钠血症^[19].

4 脑组织对低钠血症的反应

血钠浓度升高时, 血浆渗透压升高, 水从细胞内向细胞外移动, 导致细胞脱水和皱缩. 反之, 当血钠浓度降低时, 水从细胞外向细胞内移动, 引起细胞水肿^[20]. 当脑细胞水肿时, 由于受到颅骨容量的限制, 脑组织将启动自身的调节机制来防止颅内容量的进一步增加, 脑细胞将会适应性的排出细胞内溶质, 使得细胞内渗透压下降, 从而限制脑水肿的进一步发展. 首先, 通常在低钠血症发生的24 h内, 脑组织排出细胞内的K离子以降低细胞内渗透压; 随后, 随着脑水肿进一步加剧, 细胞内的低分子有机溶质如肌醇、谷氨酰胺、胆碱及牛磺酸等被排出细胞外以有效调节细胞内渗透压避免脑水肿进展过快^[21-24]. 这种调节机制的效能与低钠血症进展的速度和严重程度密切相关. 脑组织对慢性低钠血症的适应性明显高于急性低钠血症. 肝硬化患者脑组织对低钠血症的适应机制类似.

低钠血症对脑组织的损伤还见于低钠血症恢复过程. 随着血钠浓度的逐渐纠正, 脑细胞内电解质和渗透压也逐渐恢复, 电解质恢复较快, 渗透压恢复相对较慢, 低钠血症持时越长, 渗透压恢复越慢^[25]. 如果低钠血症纠正过快, 脑细胞难以适应细胞外液渗透压的快速变化, 从而发生脱髓鞘反应, 即渗透性脱髓鞘综合征^[23,25,26].

5 低钠血症的临床意义

目前临床上根据患者血钠水平将肝硬化腹水低钠血症分为轻、中、重3度, 即125-130 mmol/L为轻度, 120-125 mmol/L(包含125 mmol/L)为中度, ≤120 mmol/L为重度. 然而, 肝硬化腹水患者低钠血症的临床表现往往缺乏特异性, 并易为原发病肝硬化所掩盖. 这主要取决于其血钠水平下降的程度及速度.

5.1 低钠血症与神经系统功能 低钠血症常伴发广泛的与脑水肿相关的神经系统症状如头痛、定向力障碍、意识混乱、癫痫发作甚至脑疝. 急性低钠血症发生神经系统症状的机率远高于慢性低钠血症. 肝硬化低钠血症发生神经系统症状的机会相对较低, 可能与低钠血症进展缓慢有关. 最近有研究者研究低钠血症致肝昏迷机制时提出“轻度脑水肿”学说^[27], 该学说认为肝硬化时增高的血氨及其他神经毒性物质如谷氨酰胺等进入脑组织使得脑细胞内渗透压升高而引起轻度脑星形胶质细胞肿胀, 这种轻度的水肿不至于引起颅内压升高, 但足以构成

■ 研发前沿

目前Vaptans类药物的研究主要集中在充血性心力衰竭、多囊肾、低钠血症等方面, 关于肝硬化腹水的研究尚在2、3期临床试验中, 关于Vaptans长期使用的不良反应及与常规利尿剂连用仍是亟待解决的问题.

■创新盘点

本文的亮点在于结合作者临床试验的初步印象,重点分析Vaptans类药物在肝硬化腹水合并低钠血症中的意义。

表 1 Vaptans的临床研究进展状态

名称	剂型	作用受体	临床研究状态	针对肝硬化研究
Conivaptan	针剂	V1a/V ₂	已经被美国批准上市用于治疗住院的低钠血症患者	无
Lixivaptan	片剂	V ₂	2期临床试验中	有 ^[47-49]
Satavaptan	片剂	V ₂	3期临床试验中	有 ^[50,51]
Tolvaptan	片剂	V ₂	3期临床试验中	有 ^[38-41]
Mozavaptan	片剂	V ₂	已经被日本批准上市用于治疗抗利尿激素分泌失调患者	有 ^[52]

神经系统损伤的基础,在这种背景下,低钠血症的出现将对脑胶质细胞造成二次打击,造成胶质细胞水肿进一步加重诱发肝性脑病。有很多线索支持这个假设:(1)磁共振成像显示低钠血症时脑组织存在不同程度的水肿^[28,29]。(2)血钠浓度与血NH₃是决定肝硬化患者脑电图的两个独立因素^[30]。(2)接受TIPS治疗患者,低钠血症是肝昏迷的首要独立危险因素^[31]。(3)使用利尿剂患者极易发生肝性脑病,而众所周知,利尿剂是引起低钠血症最常见的诱因。(4)一项肝硬化的前瞻性研究提示血钠是发生肝昏迷的独立预测因素^[32]。

5.2 低钠血症与肝硬化并发症 除肝昏迷以外,低钠血症还与肝硬化其他并发症^[33]有关:(1)与肝性脑病、肝肾综合征、细菌感染的发生呈正相关;(2)血钠越低,Child-Pugh(CPS)分级病情越严重;(3)与不合并低钠血症的肝硬化腹水相比,合并有低钠血症的患者其腹水治疗效果差得多,而且往往为顽固性腹水;(4)Borroni等^[34]通过研究191例肝硬化腹水伴或不伴低钠血症的患者发现,血钠水平越低,预后越差,病死率(尤其是短期死亡率)越高;(5)严重低钠血症患者脑组织内水、钠、钾、氯进入脑脊液,过快纠正血钠水平容易导致渗透性脱髓鞘综合征的发生^[26]。(6)最近两一项关于肝硬化的大规模人群研究表明低钠血症是健康相关生活质量的独立预测因素,并且与Child-Pugh及MELD分值无关^[35]。

5.3 低钠血症和肝移植 低钠血症患者肝移植后发生中枢神经系统脱髓鞘反应的危险性增加^[36,37]。最近2项研究表明移植前低钠血症不仅与移植后神经系统功能失调有关,而且与肝移植后肾功能衰竭及感染的发生、血制品使用增多、住院时间延长和移植术后近期死亡率密切相关^[6,36,37]。

6 低钠血症的治疗

从治疗角度讲,区分不同类型低钠血症十分重要。低容量性低钠血症应积极补充丧失的水和

电解质,而高容量性低钠血症则应增加肾脏自由水的排出,降低扩张的血容量。

6.1 常规治疗 入量限制(1 000-1 500 mL/d),通常被作为高容量性低钠血症的标准措施,但疗效有限。高张盐水由于有增加腹水和浮肿的危险而不被推荐用来治疗肝硬化高容量性低钠血症。腹水回输不仅可以缓解肝硬化患者腹水症状,而且可以增加患者尿量,改善肾功能,还能降低单纯大量放腹水导致急性失钠的可能,使低钠血症得到一定的改善,但不适用于感染性和癌性腹水,且需要住院治疗,患者耐受性差。静脉输注白蛋白等血制品能改善肝硬化患者低钠血症,但费用昂贵,来源紧张,且存在感染输血相关性疾病的危险而受到一定限制。

6.2 Vaptans 随着Vaptans类药物的出现,肝硬化低钠血症的治疗有了一个巨大的飞跃。Vaptans是一类具有口服活性的选择性非肽类精氨酸加压素(AVP)V₂-受体拮抗剂,通过抑制肾脏集合管对水的重吸收,达到排水利尿作用(水利尿)。在健康志愿者,Vaptans诱导明显的剂量依赖性尿量增加,伴有尿渗透压下降,自由水排出增加。与传统利尿剂相比,Vaptans不增加健康志愿者尿钠的排泄^[11]。Vaptans已开发的适应证为治疗等容量性和高容量性低钠血症^[10-13,38-41],并作为利尿疗法的辅助药物来治疗失代偿性心力衰竭患者的容量负荷增加,也用于治疗心源性的水肿^[14]。在多囊性肾脏疾病的研究也在进行中^[42-44],但在肝硬化腹水患者中的资料相对较少(表1)^[45,46]。

6.2.1 Vaptans在肝硬化患者中的作用:(1)短期作用:Vaptans治疗肝硬化腹水的研究表明,短期(1-2 wk)给予Vaptans可以增加肝硬化腹水患者尿渗透压,尿自由水排出加快,尿钠没有明显改变,尿量在服药后1-2 h开始增加,持续4-12 h,并且与剂量相关,但患者尿量从无增加到4-6 L/d,差异较大^[38-41,45-52]。多项Vaptans治疗肝硬化低钠血症的研究表明可以明显改善血钠水平,血钠

浓度升高发生在服药开始的几天后, 平均升高 2-7 mmol/L, 27%-54% 患者血钠水平恢复正常, 短期治疗对肾功能, 循环功能及RAA系统无影响^[38-41,47-52]. (2)长期作用: 到目前为止, 仅有为数不多的几项研究报道了Vaptan治疗肝硬化低钠血症患者1年结果, 研究表明Vaptan治疗可以长期改善肝硬化低钠血症, 并无明显不良反应^[53,54]. 不良反应: 大部分的研究表明Vaptans的作用安全有效, 并且没有严重不良反应. 在国外以健康成人、淤血性心功能衰竭、低钠血症、多囊肾为对象进行临床试验中, 最常见的主要不良反应为口渴, 发生率约为29%, 其他不良反应有尿频、口干、眩晕、疲劳、头痛、多尿. 理论上还可能出现的、需要引起重视的不良反应包括: 高钠血症、血钠浓度升高过快和肾功能衰竭等. 现有的短期报道显示高钠血症(血钠超过145 mmol/L)发生机率极低(2%-4%), 且多见于神志不清不能自由饮水的患者^[38-54]. 有几项研究发现 有4%-14%的患者治疗最初几天内血钠浓度升高超过8 mmol/L, 但未见到中枢神经系统脱髓鞘改变^[53,54]. 但是, 仍需注意在纠正低钠血症过程中, 应使血钠缓慢上升, 以不超过24 h 12 mmol/L为宜, 对有中枢神经系统脱髓鞘危险因素患者, 更应控制血钠上升速度在24 h 8-10 mmol/L^[55]. 短期研究未有肾功能不全的报道. 但这些研究都是在住院患者中进行的短期(1-2 wk)研究, 患者均接受严格的血压, 血电解质等监测, 并且使用剂量相对较小, 进一步的安全性还需要大规模长期的研究证实. 需要注意的是, Vaptans能引起强力的水利尿作用, 故可能会导致体液的快速重分配, 因此需要密切监测患者各项指标尤其是在用药的最初几天内. 并且, 现有的研究中, 与Vaptans联用的传统利尿剂剂量相对较小, 关于与其他利尿剂联用的问题还需要进一步的临床研究.

6.2.2 Vaptans治疗肝硬化腹水: Vaptans能减少肝硬化腹水患者的腹水量. 现在, 已有多项关于Vaptans预防肝硬化腹水形成及大剂量放腹水后复发的II期临床试验正在进行中, 我们的tolvaptan II期临床研究初步的结果显示tolvaptan可以减少腹水的生成和降低放腹水后腹水的复发率(结果尚未发表). 目前已经有试验进入到III期临床, 结果值得期待.

6.2.3 Vaptans在肝硬化低钠血症治疗中的优势: Vaptans类药物在肝硬化低钠血症治疗中存在其独特的优势: (1)低钠血症的扭转使得患者可以

不必严格限制水的摄入, 从而改善患者生活质量. (2)与常规利尿剂联用可减少尿钠的排出, 避免低钠血症的出现. (3)随着低钠血症的改善, 肝性脑病的发生将减少. (4)移植前改善低钠血症可以减少移植后中枢神经系统并发症.

7 结论

低钠血症是晚期肝硬化的常见严重并发症之一, 与肝硬化的各种并发症及肝移植术后近期死亡率密切相关. Vaptans是一类选择性AVP V₂受体拮抗剂, 可以抑制肾脏集合管对水的重吸收, 而不增加尿钠排泄. Vaptans类药物的出现奠定了肝硬化腹水及低钠血症治疗新的里程碑.

8 参考文献

- 1 Elsenmenger WJ, Blondheim SH, Bongiovanni AM, Kunkel HG. Electrolyte studies on patients with cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 1950; 29: 1491-1499
- 2 Arroyo V, Rodés J, Gutiérrez-Lizárraga MA, Revert L. Prognostic value of spontaneous hyponatremia in cirrhosis with ascites. *Am J Dig Dis* 1976; 21: 249-256
- 3 Ruf AE, Kremers WK, Chavez LL, Descalzi VI, Podesta LG, Villamil FG. Addition of serum sodium into the MELD score predicts waiting list mortality better than MELD alone. *Liver Transpl* 2005; 11: 336-343
- 4 Ginès P, Guevara M. Hyponatremia in cirrhosis: pathogenesis, clinical significance, and management. *Hepatology* 2008; 48: 1002-1010
- 5 Ackermann D. [Treatment of ascites, hyponatremia and hepatorenal syndrome in liver cirrhosis] *Ther Umsch* 2009; 66: 747-751
- 6 Londoño MC, Guevara M, Rimola A, Navasa M, Taurà P, Mas A, García-Valdecasas JC, Arroyo V, Ginès P. Hyponatremia impairs early posttransplantation outcome in patients with cirrhosis undergoing liver transplantation. *Gastroenterology* 2006; 130: 1135-1143
- 7 Londoño MC, Cárdenas A, Guevara M, Quintó L, de Las Heras D, Navasa M, Rimola A, García-Valdecasas JC, Arroyo V, Ginès P. MELD score and serum sodium in the prediction of survival of patients with cirrhosis awaiting liver transplantation. *Gut* 2007; 56: 1283-1290
- 8 Ginès P. Vaptans: a promising therapy in the management of advanced cirrhosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1150-1152
- 9 Decaux G, Soupart A, Vassart G. Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. *Lancet* 2008; 371: 1624-1632
- 10 Olszewski W, Gluszek J. [Vasopressin antagonists in treatment of hyponatremia] *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117: 356-362
- 11 Ali F, Guglin M, Vaitkevicius P, Ghali JK. Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists. *Drugs* 2007; 67: 847-858
- 12 Shackel N, McCaughan G. Treatment for cirrhosis-associated hyponatremia? Vaptans and aquaresis. *Hepatology* 2007; 45: 1080-1081
- 13 Gross P. Treatment of hyponatremia. *Intern Med*

■名词解释

精氨酸加压素 (AVP): 也叫抗利尿激素, 是一种神经肽激素, 由位于视丘下部核团的神经元细胞体合成通过轴突运送到垂体后叶并在此入血. 他不仅有增高血压的作用, 还有明显的抗利尿作用. 当血浆晶体渗透压增高和循环血量减少时, AVP分泌释放增加, 以促进肾脏远曲小管对水的重吸收, 使尿量减少, 是调节身体水平衡的重要激素.

■同行评价

本文文笔比较流畅,对临床肝硬化低钠血症及其并发症的治疗有一定的实际指导和应用价值。

- 2008; 47: 885-891
- 14 Oghlakian G, Klapholz M. Vasopressin and vasopressin receptor antagonists in heart failure. *Cardiol Rev* 2009; 17: 10-15
 - 15 O'Donoghue D, Trehan A. SIADH and hyponatremia: foreword. *NDT Plus* 2009; 2: iii1-iii4
 - 16 陈灏珠. 实用内科学. 第10版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 794-797
 - 17 徐晓光, 蔡洪培. 肝硬化低钠血症研究进展. *中华消化杂志* 2002; 22: 560-561
 - 18 Ginès P, Jiménez W. Aquaretic agents: a new potential treatment of dilutional hyponatremia in cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 24: 506-512
 - 19 Ginès P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jiménez W, Liard JF, Martin PY, Schrier RW. Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *Hepatology* 1998; 28: 851-864
 - 20 Verbalis JG, Gullans SR. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 1991; 567: 274-282
 - 21 Sterns RH, Silver SM. Brain volume regulation in response to hypo-osmolality and its correction. *Am J Med* 2006; 119: S12-S16
 - 22 Ayus JC, Achinger SG, Arieff A. Brain cell volume regulation in hyponatremia: role of sex, age, vasopressin, and hypoxia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F619-F624
 - 23 Restuccia T, Gómez-Ansón B, Guevara M, Alessandria C, Torre A, Alayrach ME, Terra C, Martín M, Castellví M, Rami L, Sainz A, Ginès P, Arroyo V. Effects of dilutional hyponatremia on brain organic osmolytes and water content in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 1613-1622
 - 24 Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996; 24: 919-923
 - 25 Soupart A, Decaux G. Therapeutic recommendations for management of severe hyponatremia: current concepts on pathogenesis and prevention of neurologic complications. *Clin Nephrol* 1996; 46: 149-169
 - 26 Verbalis JG, Gullans SR. Rapid correction of hyponatremia produces differential effects on brain osmolyte and electrolyte reaccumulation in rats. *Brain Res* 1993; 606: 19-27
 - 27 Häussinger D. Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 1187-1190
 - 28 Córdoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35: 598-604
 - 29 Kale RA, Gupta RK, Saraswat VA, Hasan KM, Trivedi R, Mishra AM, Ranjan P, Pandey CM, Narayana PA. Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006; 43: 698-706
 - 30 Zwingmann C, Leibfritz D. Ammonia toxicity under hyponatremic conditions in astrocytes: de novo synthesis of amino acids for the osmoregulatory response. *Neurochem Int* 2005; 47: 39-50
 - 31 Torre Delgadillo A. [Refractory ascites and dilutional hyponatremia: current management and new aquaretics] *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70: 299-311
 - 32 Guevara M, Baccaro ME, Torre A, Gómez-Ansón B, Ríos J, Torres F, Rami L, Monté-Rubio GC, Martín-Llahí M, Arroyo V, Ginès P. Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a prospective study with time-dependent analysis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1382-1389
 - 33 Wu CC, Yeung LK, Tsai WS, Tseng CF, Chu P, Huang TY, Lin YF, Lu KC. Incidence and factors predictive of acute renal failure in patients with advanced liver cirrhosis. *Clin Nephrol* 2006; 65: 28-33
 - 34 Borroni G, Maggi A, Sangiovanni A, Cazzaniga M, Salerno F. Clinical relevance of hyponatremia for the hospital outcome of cirrhotic patients. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 605-610
 - 35 Angeli P, Wong F, Watson H, Ginès P. Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey. *Hepatology* 2006; 44: 1535-1542
 - 36 Cárdenas A, Ginès P. [Dilutional hyponatremia, hepatorenal syndrome and liver transplantation] *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31: 29-36
 - 37 Yun BC, Kim WR, Benson JT, Biggins SW, Therneau TM, Kremers WK, Rosen CB, Klintmalm GB. Impact of pretransplant hyponatremia on outcome following liver transplantation. *Hepatology* 2009; 49: 1610-1615
 - 38 Berl T, Quittnat-Pelletier F, Verbalis JG, Schrier RW, Bichet DG, Ouyang J, Czerwiec FS. Oral tolvaptan is safe and effective in chronic hyponatremia. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 705-712
 - 39 Boyer TD. Tolvaptan and hyponatremia in a patient with cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 699-702
 - 40 Plosker GL. Tolvaptan. *Drugs* 2010; 70: 443-454
 - 41 Wong F, Blei AT, Blendis LM, Thuluvath PJ. A vasopressin receptor antagonist (VPA-985) improves serum sodium concentration in patients with hyponatremia: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 2003; 37: 182-191
 - 42 Gattone VH 2nd, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* 2003; 9: 1323-1326
 - 43 Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH 2nd. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2004; 10: 363-364
 - 44 Belibi FA, Edelstein CL. Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 315-328
 - 45 Guyader D, Patat A, Ellis-Grosse EJ, Orczyk GP. Pharmacodynamic effects of a nonpeptide antidiuretic hormone V2 antagonist in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology* 2002; 36: 1197-1205
 - 46 Thuluvath PJ, Maheshwari A, Wong F, Yoo HW, Schrier RW, Parikh C, Steare S, Korula J. Oral V2 receptor antagonist (RWJ-351647) in patients with cirrhosis and ascites: a randomized, double-blind, placebo-controlled, single ascending dose study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 973-982
 - 47 Gerbes AL, Gülberg V, Ginès P, Decaux G, Gross P, Gandjini H, Djian J. Therapy of hyponatremia in cirrhosis with a vasopressin receptor antagonist: a randomized double-blind multicenter trial.

- Gastroenterology* 2003; 124: 933-939
- 48 Ginès P, Wong F, Watson H, Milutinovic S, del Arbol LR, Olteanu D. Effects of satavaptan, a selective vasopressin V(2) receptor antagonist, on ascites and serum sodium in cirrhosis with hyponatremia: a randomized trial. *Hepatology* 2008; 48: 204-213
- 49 Ku E, Nobakht N, Campese VM. Lixivaptan: a novel vasopressin receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 657-662
- 50 Schrier RW, Gross P, Gheorghide M, Berl T, Verbalis JG, Czerwiec FS, Orlandi C. Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2099-2112
- 51 Ginès P, Wong F, Watson H, Terg R, Bruha R, Zarski JP. Clinical trial: short-term effects of combination of satavaptan, a selective vasopressin V receptor antagonist, and diuretics on ascites in patients with cirrhosis without hyponatremia - a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 Jan 22. [Epub ahead of print]
- 52 Lemmens-Gruber R, Kamyar M. [Pharmacology and clinical relevance of vasopressin antagonists] *Internist (Berl)* 2008; 49: 628, 629-630, 632-634
- 53 Soupart A, Gross P, Legros JJ, Alföldi S, Annane D, Heshmati HM, Decaux G. Successful long-term treatment of hyponatremia in syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion with satavaptan (SR121463B), an orally active nonpeptide vasopressin V2-receptor antagonist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 1154-1160
- 54 Decaux G. Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am J Med* 2001; 110: 582-584
- 55 Decaux G, Soupart A. Treatment of symptomatic hyponatremia. *Am J Med Sci* 2003; 326: 25-30

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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 2009-06-19)

晚期复杂性肝癌的临床处理

张怡安, 朱畴文

■背景资料

原发性肝癌居全世界常见恶性肿瘤第六位, 在我国其发病率逐年上升. 由于缺乏对肝癌高危患者的随访监测, 许多肝癌患者在确诊时已经处于晚期或者终末期, 错过了治疗的最佳时机. 介入治疗一直是不能行手术治疗的主要肝癌患者的治疗手段, 而现今分子靶向治疗, 生物治疗, 传统中药治疗又为这些患者提供了新的治疗方案.

张怡安, 朱畴文, 复旦大学附属中山医院消化内科 上海市 200032

作者贡献分布: 本文综述由张怡安完成; 朱畴文审校.

通讯作者: 朱畴文, 副教授, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院消化内科. zyian2020@hotmail.com

电话: 021-54082943

收稿日期: 2010-01-17 修回日期: 2010-04-04

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-04-28

Management of advanced hepatocellular carcinoma

Yi-An Zhang, Chou-Wen Zhu

Yi-An Zhang, Chou-Wen Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Associate Professor Chou-Wen Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. zyian2020@hotmail.com

Received: 2010-01-17 Revised: 2010-04-04

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-04-28

Abstract

Many patients are diagnosed with hepatocellular carcinoma (HCC) at an advanced or terminal stage. Due to hepatic decompensation, they have missed the best opportunity for treatment. Of all HCC staging systems, the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification is the only one that can satisfy the aspects of tumor progression, liver function and performance scale. Patients at each stage of BCLC are provided with different therapies. Interventional therapies for advanced HCC include transcatheter arterial chemoembolization (TACE), transcatheter arterial embolization (TAE) and hepatic arterial infusion chemotherapy (HIAC). HIAC may be a choice for patients with poor liver function and portal vein thrombosis (PVT). While systematic therapy for advanced HCC is not recommended and there are still disputes over the efficacy of biotherapies, molecular targeted therapy may become a first-line treatment for advanced HCC.

Key Words: Advanced hepatocellular carcinoma; Staging; Management

Zhang YA, Zhu CW. Management of advanced hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1250-1254

摘要

许多患者被诊断为肝癌时, 已经处于肝癌晚期甚至终末期, 肝功能已失代偿, 错过了治疗的最佳时机. 相比于现今其他肝癌分期存有的缺陷, 最新的巴塞罗那分期方案是唯一能满足肿瘤分期、肝功能及全身状况的分期方法, 同时能够为每个分期提供治疗方案. 晚期肝癌的介入治疗包括肝动脉化疗栓塞、肝动脉栓塞以及肝动脉化疗药物注射. 一些临床试验表明, 肝动脉化疗药物注射可适用于有肝功能失代偿及门静脉栓塞的患者. 晚期肝癌患者一般不推荐全身性药物应用, 而生物治疗仍存在许多争议. 最新的分子靶向治疗有望成为晚期肝癌一线标准治疗药物.

关键词: 晚期肝癌; 分期; 治疗

张怡安, 朱畴文. 晚期复杂性肝癌的临床处理. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1250-1254

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1250.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic cancer, PHC)是全世界排名第6位的最常见恶性肿瘤, 其发病率正逐年上升^[1]. 根据美国癌症协会统计, 2009年美国肝癌新发病例22 620例, 其中男16 410例, 女6 210例, 男性发病率显著高于女性. 2009年因PHC死亡的总人数为18 160, 同样男性病死率高于女性^[2]. 全球82%的肝癌患者来自发展中国家, 中国占55%^[1]. 我国2005年肝癌新发病276 514人, 相比于2000年新发患者数增加33 519人, 发病率位列各种癌症第二^[3]. 许多研究已证实, 肝炎病毒的感染是导致病毒性肝炎、肝硬化最终引起肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素. 在我国以HBV感染为主, 而发达国家HCV感染率较高^[4]. 虽然近几十年对于HCC的早期诊断与治疗有了长足的进步, 但是由于地域差异, PHC在病因学、遗传学等发面有着很

■同行评议者

郑素军, 副主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

大的不同. 另一方面, 发展中国家由于经济等原因缺乏对肝癌高危人群随访监测, 不少肝癌患者被诊断时, 已处于肝癌晚期或终末期, 肝功能失代偿或者合并门静脉癌栓、远处转移等复杂情况, 或是在治疗过程中肝脏本身病情加重, 此时已经错过了治疗的最佳时期. 这些患者应该如何治疗, 本文对此作简要综述.

1 PHC的分期

1.1 现有分期及不足之处 与其他恶性肿瘤相比, PHC患者的预后不仅取决于肿瘤本身, 还取决于肝功能情况. 因此, 一个理想的肝癌分期必须涵盖病理及临床这两方面因素. 然而, 直至现今仍没有一个非常标准的分级系统能够达到这种要求. 此外, 由于地域、病因、遗传学等差异使得这一标准的建立更加困难. 目前HCC运用最广泛的分期系统是由美国肿瘤研究联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)制定的TNM分期, 其根据患者肿瘤数目及大小, 血管侵袭, 周围淋巴结转移, 远处播散情况进行分期^[5]. 其他的肝癌分期还包括奥田邦雄(Okuda)分期、意大利肝癌计划(cancer of the Italian program, CLIP)分期、日本综合评分(Japanese integrated score, JIS)分期, 以及中国分期(CS). 近期还有学者提出终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)也可以用来预测肝癌患者预后生存率^[6]. 这些分期各有其优点, 但或多或少存在着某些缺陷. TMN分期仅仅注意了肿瘤的特征而忽略了肝功能; Okuda分期是以肿瘤大小、腹水有无、血清白蛋白及胆红素水平四项分为三期, 为最早使用的分期方法之一. 其缺点是对肿瘤大小的估计较主观并忽略了其他一些重要因素, 如肿瘤是单病灶、多病灶还是弥漫性的, 是否有血管侵犯等情况; CLIP分期评分法包括Child-Pugh分期、肿瘤形态、血清AFP和门脉癌栓这4项, 因没有针对肿瘤分期提供适当的治疗方法, 因此不能为每个患者选择适当的治疗. 相比之下, 最新的巴塞罗那分期(BCLC)不仅仅是肝癌的分期, 更提供了不同时期的治疗选择, 被提议是最好的治疗指南^[7].

1.2 BCLC分期 BCLC分期是通过几个队列研究和随机对照研究所建立起来的, 他不是一个根据分数来分期的系统, 而是由几个研究所得出的独立预后因子组成的一个分期系统. 综合了体力状况(performance scale, PS)评分、肿瘤数目及侵犯情况、Okuda分期和Child-Pugh分期. 0

期(极早期HCC)患者是指“PS 0, Child A, Okuda 1, 单发<2 cm原位癌”, 肝功能正常者行根治性手术切除, 5年生存率达70%; A期(早期HCC)患者是指“PS 0, Okuda 1-2, Child A-B, 单发或多发肿瘤<3 cm, 数量≤3个”, 可根据有无合并症, 行肝移植或者无水酒精注射、射频消融术; B期(中期HCC)患者是指“PS 0, Child A-B, Okuda 1-2, 大的, 多发结节,”可行化疗栓塞; C期(晚期HCC)患者指“PS 1-2, Okuda 1-2, Child A-B, 有门脉浸润, N1, M1”试用二期临床研究或临床随机试验背景下的新疗法, 若无则行肝动脉化疗栓塞; D期(终末期HCC)患者指“PS>2, Okuda 3, Child C”, 由于无论采取何种治疗, 患者的预后都极差, 所以仅应该接受对症支持治疗^[8]. 为了准确判断患者预后, 估计治疗对预期寿命的影响, 理想的分期系统应考虑到肿瘤分期、肝功能及全身状况. 而目前, 唯一能满足上述要求的分期方法只有BCLC方案.

2 晚期肝癌治疗

2.1 肝动脉栓塞/肝动脉化疗栓塞 许多研究已经证实肝动脉栓塞(transcatheter arterial embolization, TAE)、肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)在晚期肝癌患者姑息治疗中的作用. 在一项包括3 892例肝癌患者参与的回溯性研究中, 根据BCLC分期将患者分为早期, 中期, 晚期和终末期. 其中晚期患者852例, 200例接受了TAE治疗, 193例接受了适形放疗(conformal radiotherapy, CR), 另有459例肝癌患者接受了保守治疗. 结果显示, 接受TAE治疗的患者1年、3年和5年生存率分别为29.5%、6.0%、4.4%, 中位生存期为6.8 mo±0.5 mo, 高于接受放射治疗(radiotherapy, RT)和保守治疗的晚期肝癌患者. 接受RT治疗的肝癌患者1、3、5年生存率及中位生存期优于保守治疗患者; TAE这一优势同样显现在终末期肝癌的治疗中^[9]. 这与BCLC分期所建议的有血管侵袭及N1, M1的患者接受新药治疗相违背. 在另一项临床试验中, 80例无法行肿瘤切除的肝癌患者分别接受了TACE和保守治疗, TACE组1年、2年、3年的生存率分别为57%、31%、26%, 相比于对照组32%、11%、3% ($P = 0.002$), 两者有着显著的差别^[10]. 而TACE与TAE相比, 对于肝癌患者的预后没有差别^[11]. 所以对于这两种方法的选择, 不同的医院可以根据自身情况而决定. TAE和TACE的禁忌证包括肝功能失代偿以及有血管侵袭

■研发前沿

近来分子靶向药物治疗晚期肝癌成为研究热点, 一些药物取得了突破性的进展. 分子靶向药物主要包括表皮生长因子受体抑制剂、抗血管生成药物和多激酶抑制剂. 由于不同临床试验纳入患者标准不同, 同时还存在样本量过小等问题, 分子靶向治疗药物的有效性和安全性仍需更多的临床试验进行评估.

■相关报道

一项由Hoffmann等进行的随机双盲多中心三期临床试验, 旨在研究TACE联合索拉非尼相比于单独TACE治疗在HCC患者中的优势. 结果提示TACE合并索拉非尼治疗的患者, 其疾病中位进展时间相比于TACE合并安慰剂组显著延长, 为那些等待手术治疗的HCC患者争取到了宝贵的时间.

■创新盘点

本文首先总结了肝癌的几种分期方法,并对各种分期方法进行了简单述评,重点介绍了BCLC分期法.而后对晚期肝癌目前的治疗方法,包括介入治疗、分子靶向药物治疗、生物治疗、传统中药治疗等进行了综述,对不同治疗方法的适应证及优缺点进行了详细阐述.

和肝外播散的终末期肝癌患者,因为治疗本身可能引发患者肝功能衰竭增加死亡率. TAE和TACE的不良反应包括头晕,呕吐,发热,肝酶增高,其严重程度不一^[12].

2.2 TACE+RT 现今有研究表明, TACE+RT可以提高晚期肝癌患者对于治疗的反应. 在一项前瞻性的研究中,入选的25例不能行根治性切除术的患者,肿瘤直径大小平均为10.3 cm. 所有患者均接受了局部放射治疗(46.9-5.9 Gy),并在这25位中有16位患者在放疗前和/或放疗后行TACE,随访23 mo, TACE+RT组患者总体生存期明显高于只接受了局部放疗的患者^[13].

2.3 肝动脉化疗药物注射 全身性应用化疗药物对于晚期肝癌患者治疗效果较差,相比之下,局部化疗可以使药物浓集于病灶的同时减少化疗药物对全身的不良反应. 晚期肝癌患者合并门静脉栓塞(PVT)的概率很高,由于PVT是TACE的禁忌证,使得这类患者治疗方法受到了局限. 有研究表明合并PVT的晚期肝癌患者预后不超过6 mo^[14]. 对于这类患者,可以选择使用肝动脉化疗药物注射(hepatic arterial infusion chemotherapy, HAIC)进行治疗. 现已有许多研究表明, HAIC对于晚期肝癌患者有一定疗效. 在一项研究中,48例肝癌晚期合并PVT患者接受了4次化疗,化疗方案为顺铂+5-FU,每次持续化疗5 d. 试验结果分为完全应答(complete response, CR)、部分应答(partial response, PR)以及无应答(nonresponders),总体1年、5年生存率分别为45%和11%. CR+PR的中位生存期为31.6 mo, 1年和5年生存率分别是100%和40%,无应答患者中位生存期为5.4 mo^[15]. 此外,另有研究表明,使用高剂量5-FU+顺铂,缩短化疗时间至每个疗程3 d, 4 wk为1个周期,同样有效并且安全的^[16]. 近来还有一些研究将HAIC合并使用局部RT,治疗病灶局限的肝癌晚期患者,结果显示合并疗法能够提高短期生存率^[17].

2.4 全身性药物的应用

2.4.1 分子靶向治疗(molecular targeted therapy): 现今肝癌分子靶向治疗已经成为肝癌治疗的新方向. 多激酶抑制剂索拉菲尼(Sorafenib)成为第一个被证实对晚期肝癌有改善生存的药物. 肿瘤生长与HCC的Raf激酶过度表达并被激活,以及RAF/MEK/ERK信号通路上调有关. 而索拉菲尼被证实能够抑制Raf激酶、血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)以及其他激酶,直接抑制肿瘤生长

和阻断肿瘤新生血管形成的双重抗肿瘤作用^[18]. SHARP(sorafenib HCC assessment randomized protocol)试验是一项随机、双盲、以安慰剂为对照的国际多中心Sorafenib III期临床试验研究,共纳入602例晚期PHC患者,随机给予入组患者安慰剂或Sorafenib治疗, Sorafenib治疗组患者的总体生存期(median overall survival, median OS)为10.7 mo, 而安慰剂组为7.9 mo(HR = 0.69, $P < 0.001$); 无症状仅影像检查发现的中位疾病进展时间(median time to radiologic progression)分别为5.5 mo、2.8 mo(HR = 0.58, $P < 0.001$); 对于Child-Pugh分级A或B的患者, Sorafenib均对其显示出良好的安全性和相同的疗效^[19]. 另一项亚太研究为随机、双盲、安慰剂对照的III期临床试验,其研究结果与SHARP试验相符,证明索拉菲尼对于以乙型肝炎为病因的亚太地区肝癌患者,同样有效^[20]. Sorafenib是第一个可以显著延长PHC总生存期的分子靶向药物,有望成为晚期肝癌一线的标准治疗药物.

抗血管内皮生成因子的药物有贝伐单抗(Bevacizumab),沙利度胺(Thalidomide)等. 有研究表明,贝伐单抗与吉西他滨-奥沙利铂联合使用(GEMOX-B)^[21],其临床试验的结果与SHARP相同,均证实对晚期肝癌患者有一定效果. 此外,分子靶向药物还包括表皮生长因子(endothelial growth factor receptor, EGFR)抑制剂,其包括吉非替尼(Gefitinib, Iressa)^[22],厄罗替尼(Erlotinib, Tarceva)^[23,24]西妥昔单抗(Cetuximalb, MC-C 225)^[25,26]等.

晚期HCC患者大多处于肝硬化肝功能失代偿状态,而现有的分子靶向治疗药物的临床试验多选择肝功能尚可(Child-Pugh A、B级)的患者,所以针对较差的身体状况、肝功Child-Pugh分级C的患者,分子靶向治疗药物的有效性和安全性仍需更多的临床试验进行评估.

2.4.2 生物治疗: 自从发现了生长抑素受体在HCC中的表达,奥曲肽作为一种人类生长抑素类似物也开始运用于晚期肝癌的试验性治疗中^[27]. 然而,近来关于奥曲肽对于晚期肝癌的治疗作用一直存有争议. 纳入患者标准不同是导致各种临床试验结果存在差异的主要原因. 一项关于长效奥曲肽对晚期HCC患者的随机对照研究中,纳入患者多合并肝炎病史,试验结果显示中位生存期只有2 mo^[28];而在另一项研究,纳入的晚期肝癌患者中,肝功能Child-Pugh A占83%, Child-Pugh B占17%. HCC的病因包括病毒性肝

炎(44%)、酒精性肝硬化(22%)、血色病(6%)。结果提示使用长效奥曲肽后的中位生存期为8 mo^[27]。鉴于各种临床试验结果的不一致性, 我们期望将来的试验能够有更加统一的纳入标准以及更多的样本量, 使试验结果更具说服力。

2.4.3 其他药物: 全身性的药物应用还包括化疗药物的应用, 由于晚期肝癌患者肝功能不佳或者处于失代偿状态, 化疗药物的不良反应可能超过了治疗本身能给患者带来的益处, 并且许多研究表明治疗存在化疗药物抵抗^[29]。另外, 许多研究显示, 多种化疗药物合并使用效果并不优于单用^[30]。激素类药物如他莫西芬的使用是基于1/3 HCC的肿瘤表面有雌激素受体, 但是许多前瞻性的随机对照研究显示, 使用雌激素并未取得治疗效果^[31]。此外在我国, 传统中药治疗晚期肝癌越来越受到认可。研究证实某些中药对晚期肝癌有一定的疗效^[32,33]。

3 结论

晚期肝癌的治疗一直是临床医生面临的棘手问题。现有的治疗主要以介入治疗辅助放疗为主。近来分子靶向治疗在一系列的临床试验中表现出了在肝癌晚期治疗上的优势。然而这些临床试验仍存在的问题: 不同国家或地区适用的肝癌分期不同, 而现有的肝癌分期或多或少存有缺陷, 使得这些临床试验结果的外推性受到了质疑。所谓“工欲善其事, 必先利其器”, 现应对所有的分期方法进行多中心、前瞻性的临床评估, 从而建立一个广泛认可的肝癌分期。此外, 单就试验本身而言, 治疗的非随机, 样本量过少, 这些都降低了试验的真实性。一些试验在患者入选时存在偏倚, 如前所述的分子靶向治疗药物多选择肝功能Child A、B级患者而未包括Child C级患者, 致使我们无法获得这类患者使用药物的信息, 未来在这类患者药物使用的有效性和安全性仍需更多的临床试验进行评估。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 3 Yang L, Parkin DM, Ferlay J, Li L, Chen Y. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 243-250
- 4 Takayasu K, Choi BI, Wang CK, Ikai I, Okita K, Chen RC, Lo HW, Chen PH. First international symposium of current issues for nationwide survey

- of primary liver cancer in Korea, Taiwan and Japan. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 233-240
- 5 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 上海: 人民卫生出版社, 2005: 2014
- 6 Limquaco JL, Wong GL, Wong VW, Lai PB, Chan HL. Evaluation of model for end stage liver disease (MELD)-based systems as prognostic index for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 63-69
- 7 Marrero JA. Staging systems for hepatocellular carcinoma: should we all use the BCLC system? *J Hepatol* 2006; 44: 630-632
- 8 Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004; 10: S115-S120
- 9 Wang JH, Changchien CS, Hu TH, Lee CM, Kee KM, Lin CY, Chen CL, Chen TY, Huang YJ, Lu SN. The efficacy of treatment schedules according to Barcelona Clinic Liver Cancer staging for hepatocellular carcinoma - Survival analysis of 3892 patients. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1000-1006
- 10 Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 1164-1171
- 11 Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1734-1739
- 12 Liapi E, Geschwind JF. Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. *J Clin Oncol* 2007; 25: 978-986
- 13 Cheng JC, Chuang VP, Cheng SH, Huang AT, Lin YM, Cheng TI, Yang PS, You DL, Jian JJ, Tsai SY, Sung JL, Horng CF. Local radiotherapy with or without transcatheter arterial chemoembolization for patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 435-442
- 14 Yeung YP, Lo CM, Liu CL, Wong BC, Fan ST, Wong J. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1995-2004
- 15 Ando E, Tanaka M, Yamashita F, Kuromatsu R, Yutani S, Fukumori K, Sumie S, Yano Y, Okuda K, Sata M. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: analysis of 48 cases. *Cancer* 2002; 95: 588-595
- 16 Park JY, Ahn SH, Yoon YJ, Kim JK, Lee HW, Lee do Y, Chon CY, Moon YM, Han KH. Repetitive short-course hepatic arterial infusion chemotherapy with high-dose 5-fluorouracil and cisplatin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 129-137
- 17 Ben-Josef E, Normolle D, Ensminger WD, Walker S, Tatro D, Ten Haken RK, Knol J, Dawson LA, Pan C, Lawrence TS. Phase II trial of high-dose conformal radiation therapy with concurrent hepatic artery floxuridine for unresectable intrahepatic malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8739-8747
- 18 Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figuer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Salt

■应用要点

晚期肝癌由于合并症较多, 其治疗一直是临床医师面临的棘手问题。本文提出了BCLC分期相比于其他分期的优越性, 并对现今针对晚期肝癌的几种主要治疗方法、适应症进行了综述, 对于指导晚期肝癌的临床诊疗具有一定意义。

■同行评价

本研究首先对肝癌的分期方法进行简单述评,而后对晚期肝癌目前的治疗方法进行了综述,对临床上晚期肝癌治疗方法的选择有一定的指导意义。

- LB. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-4300
- 19 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
 - 20 Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34
 - 21 Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, Sheehan S, Hale KE, Enzinger PC, Bhargava P, Stuart K. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1898-1903
 - 22 Giannelli G, Sgarra C, Porcelli L, Azzariti A, Antonaci S, Paradiso A. EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells. *Cancer Lett* 2008; 262: 257-264
 - 23 Huether A, Hopfner M, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. Signaling pathways involved in the inhibition of epidermal growth factor receptor by erlotinib in hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5160-5167
 - 24 Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, Rashid A, Dancy J, Abbruzzese JL. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 1059-1067
 - 25 Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, Muzikansky A, Reitberg DP, Clark JW, Enzinger PC, Bhargava P, Meyerhardt JA, Horgan K, Fuchs CS, Ryan DP. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 581-589
 - 26 Huether A, Höpfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1568-1578
 - 27 Cebon J, Findlay M, Hargreaves C, Stockler M, Thompson P, Boyer M, Roberts S, Poon A, Scott AM, Kalff V, Garas G, Dowling A, Crawford D, Ring J, Bassar R, Strickland A, Macdonald G, Green M, Nowak A, Dickman B, Dhillon H, GebSKI V. Somatostatin receptor expression, tumour response, and quality of life in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with long-acting octreotide. *Br J Cancer* 2006; 95: 853-861
 - 28 Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC. A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 36: 687-691
 - 29 Abou-Alfa GK. Hepatocellular carcinoma: molecular biology and therapy. *Semin Oncol* 2006; 33: S79-S83
 - 30 Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, Koh J, Mo FK, Yu SC, Chan AT, Hui P, Ma B, Lam KC, Ho WM, Wong HT, Tang A, Johnson PJ. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1532-1538
 - 31 Barbare JC, Bouché O, Bonnetain F, Raoul JL, Rougier P, Abergel A, Boige V, Denis B, Blanche A, Pariente A, Milan C, Bedenne L. Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4338-4346
 - 32 Yu Y, Lang QB, Chen Z, Li B, Yu CQ, Zhu DZ, Huang XQ, Zhai XF, Ling CQ. Prognostic analysis of transarterial chemoembolization combined with a traditional Chinese herbal medicine formula for treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1990-1995
 - 33 Oka H, Yamamoto S, Kuroki T, Harihara S, Marumo T, Kim SR, Monna T, Kobayashi K, Tango T. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-9). *Cancer* 1995; 76: 743-749

编辑 李军亮 电编 何基才

应用跨种属肿瘤基因筛选策略探寻肿瘤关键分子

史俊林, 李瑗

史俊林, 李瑗, 广西医科大学肿瘤医院 广西壮族自治区南宁市 530021
国家自然科学基金资助项目, No. 30560167, No. 30960428
广西壮族自治区自然科学基金资助项目, No. 桂科自0728195
作者贡献分布: 本文由史俊林综述, 李瑗审校.
通讯作者: 李瑗, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市河堤路 71号, 广西医科大学肿瘤医院. liyuangx@yahoo.com.cn
电话: 0771-5331100
收稿日期: 2010-01-19 修回日期: 2010-02-26
接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-28

A cross-species strategy to screen crucial molecules in carcinogenesis

Jun-Lin Shi, Yuan Li

Jun-Lin Shi, Yuan Li, Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 30560167 and 30960428; and the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0728195

Correspondence to: Professor Yuan Li, Cancer Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous, China. liyuangx@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-19 Revised: 2010-02-26

Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-28

Abstract

The advances in genomics and proteomics have led to identification of numerous differentially expressed cancer-related genes. The current challenge in the field of cancer research is to screen the crucial molecules in carcinogenesis from the vast amounts of data. These crucial molecules can be applied as the targets for cancer prevention and therapy. In addition, identification of these crucial molecules is helpful in understanding the mechanism of carcinogenesis. Cross-species strategy refers to identification of crucial molecules in carcinogenesis by exploring the similarity between cancer-related gene expression profiles of human beings and other species. This paper reviews the recent advances in the application of this new cancer research strategy.

Key Words: Tumor; Cross-species; Crucial molecules; Screen

Shi JL, Li Y. A cross-species strategy to screen crucial molecules in carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1255-1260

摘要

随着肿瘤基因组学和蛋白组学研究领域的快速深入发展, 与各种肿瘤相关的基因和蛋白已有大量报道, 如何从这些海量的数据中鉴定出相关肿瘤的关键分子以用作肿瘤的防治靶点或据此了解肿瘤的发生发展机制, 是肿瘤研究面临的挑战. 跨种属肿瘤基因筛选策略是指通过比较不同种属同种肿瘤的基因表达谱间的相似改变, 来探寻在该肿瘤发生发展中起关键作用的分子. 本文对跨种属肿瘤基因筛选策略的意义及其在肝癌、肠癌和其他几种肿瘤研究中的应用进展作一概述.

关键词: 肿瘤; 跨种属; 关键分子; 筛选

史俊林, 李瑗. 应用跨种属肿瘤基因筛选策略探寻肿瘤关键分子. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1255-1260
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1255.asp>

0 引言

虽然近几十年来世界各国在肿瘤研究方面投入了大量的人力和财力, 但恶性肿瘤在当前全球死因排行榜仍高居第三位, 在美国等发达国家则位列第二: 2006年美国死于恶性肿瘤的人数占15种主要疾病死亡总数的23.1%, 略低于排名第一心脏病的26.0%, 而远高于排名第三的脑血管疾病的5.7%^[1]. 最近的资料显示, 全球2007年恶性肿瘤的新发病例和死亡病例分别为1 200万和760万, 预计至2030年将倍增至2 600万和1 700万^[2]. 由此可见, 肿瘤对人类生命健康和智慧的严重挑战在今后一段时期内更将不断升级. 肿瘤的早期发现、早期诊断、早期治疗是影响其预后的关键, 因此探寻可应用于早期诊断和靶向防治的分子标志, 并由此探讨肿瘤发生发展的机制, 已成为近十年来肿瘤研究的热点. 在此期间, 基因芯片等高通量新技术的大量涌现和生物信息学的快速发展, 无疑对肿瘤标志物

■背景资料

迄今在那些由世界各地不同实验室报道的海量的肿瘤相关分子之中, 罕有被一致认可者. 肿瘤研究领域在经过耗时费力的全球共同努力后所面临的当前这种纷繁复杂的局面, 向人们提出了调整肿瘤研究策略的新课题.

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■ 研发前沿

跨种属筛选肿瘤关键基因这一新的肿瘤研究策略尚在起步阶段,国内除作者所在课题组外尚少见这方面的相关报道,但他很可能在人类战胜肿瘤的进程中有所作为,应当引起重视。

和防治靶点的筛选起到了重要的推动作用,但是,迄今在那些由世界各地不同实验室报道的巨量的肿瘤相关分子之中,却罕有被一致认可者. 肿瘤研究领域在经过耗时费力的全球共同努力后面临的当前这种纷繁复杂的局面,向人们提出了调整肿瘤研究策略的新课题.

肿瘤具有高度的基因异质性(heterogeneity)和由此导致的生物学行为多样性,肿瘤基因表达谱的异常复杂性阻碍了肿瘤关键基因的定位. 现认为各种肿瘤累及的基因改变可能高达数百个,其中既含有肿瘤形成所必需的关键性基因事件(又称“causal genomic events”或“driver mutations”),也含有仅因肿瘤基因组的不稳定性而产生的伴随性改变(又称“bystander genomic alterations”或“passenger mutations”)^[3],而如何将那些影响肿瘤发生发展的关键性分子改变从伴随性改变中识别出来,则是当前肿瘤研究领域面临的重要挑战. 近年来随着人类基因组和大鼠、小鼠等动物基因组测序工程的逐步完成,人们开始意识到那些跨种属(cross-species或interspecies)保守存在的共同基因改变,可能具有更重要的功能. 跨种属的肿瘤比较基因组学研究策略遂基于这一认识而产生. 美国冷泉港实验室Zender等^[4]2008年为此撰文,认为这种高性价比的研究策略极有希望加速发现人类肿瘤基因的进程. 该研究小组此前曾在国际生物学期刊《Cell》报道他们将小鼠肝癌模型应用于识别和鉴定人类肝癌基因的研究结果^[5],该杂志同期还刊登了另一篇关于应用小鼠黑色素瘤模型发现与人恶性黑色素瘤转移相关基因的报道^[6]以及针对这两项研究发表的专家评论^[7],随即《Cancer Cell》杂志也刊文对这两项以小鼠模型作为过滤器来识别人类肿瘤关键基因的研究发表了述评^[8],共同认为跨种属分析基因表达谱是发现肿瘤关键基因的强有力策略. Mattison等^[9]于2009年撰文讨论将跨种属肿瘤基因组学策略(cross-species oncogenomics approach)用于鉴定人和鼠的肿瘤基因的可能性,称由于基因编码区和调控元件这样的重要生物序列在物种进化中是保守的,即生物学功能重要的分子应当是在生物进化过程中的保守分子,因此这一研究策略可作为一过滤器用于鉴别在肿瘤形成中起关键作用或只是伴随作用的基因,并由此筛选出在人类肿瘤发生发展中起关键作用的分子. 随后,该组作者最近报道了他们用这一策略进行大规模筛选的结

果:他们将通过比较基因组杂交(CGH)技术分析598个人类肿瘤细胞株以及一千多个小鼠淋巴瘤获得的数据进行比较,获得一批候选的值得进一步做功能验证的目标基因,并推测其中一些与肿瘤细胞的自我更新有关;作者认为该研究结果证明跨种属肿瘤基因组学是鉴定肿瘤基因的有力工具^[10].

通过跨种属比较的方法来研究肿瘤基因是一较新的领域,至目前我国国内的相关报道不多,本文就这一新的肿瘤研究策略在肝癌、肠癌以及乳腺癌、前列腺癌等其他肿瘤研究中的应用进展作一概述,借以引起相关研究者的注意和兴趣.

1 跨种属筛选策略在肝癌研究中的应用

2007年全世界的肝癌死亡例数为680 000,在全球肿瘤死因中位列第三,其中80%以上发生在发展中国家,55%以上发生在中国^[2]. 发现和了解影响肝癌形成的关键分子对诠释肝癌发生发展机制和制定肝癌防治策略意义重大,但如上所述,肝癌基因相关研究领域近年获得的海量研究结果同样也呈现纷繁复杂的局面,即大量的已报道的肝癌相关基因^[11]中罕有达成共识者,甚至一些已经过多年研究而基本达成共识的分子也面临新研究结果提出的质疑,例如以往研究大都认为p53基因249密码子的突变热点是黄曲霉毒素B₁(AFB₁)诱发肝细胞癌形成的关键靶位^[12,13],但国际癌症研究会(IARC)Tong等^[14]报道的用人源化p53基因敲入小鼠模型(Hupki鼠)进行AFB₁诱发肝癌实验的结果,却动摇了将p53基因视为抑癌基因典范的传统认识. 随着人类和大鼠、小鼠基因组测序工程的完成,人们对不同种属之间的基因同源性有所了解,认识到对人和动物模型的基因表达数据进行综合比较分析以从中筛选关键调控分子在肝癌研究中的重要前景^[15]. 基于在多种属中共同表达的基因可能拥有更重要的保守功能这一认识, Fang等^[16]较早将跨种属肿瘤基因筛选策略应用于肝癌研究:他们通过基因芯片、生物信息学和一种新型的染色体可视化工具研究albumin-SV40转基因大鼠的肝肿瘤组织,结果发现大鼠肝癌基因表达谱、信号传导通路和染色体改变与人类肝癌有相似处. Lam等^[17]随后报道斑马鱼(zebrafish)的肝肿瘤和人类肝肿瘤在分子水平极其相似,认为那些跨种属地保守存在于鱼和人类肝肿瘤分子改变可能在肝肿瘤发生发展中具有重要功

能, 在作为诊治标志物方面可能有重要意义. 为了确定人类肝癌的驱动基因, Zender等^[5]2006年报道将他们建立的一种模型小鼠肝癌和人类肝癌进行全基因组比较, 发现位于与小鼠染色体9qA1同一位点的人染色体11q22上的凋亡抑制基因cIAP1和转录因子YAP共同在肝癌形成过程中起促进作用; 该组人员后来应用同一模型发现了肝癌抑制基因DLC1^[18]. 此外, 土拨鼠肝癌模型因与人类肝癌同样具有与肝炎病毒感染有关的特点而较多应用于肝癌研究, 在这一领域, 继Anderson等^[19]报道用人的基因芯片可用于检测土拨鼠肝癌样品之后, Wang等^[20]最近报道通过将土拨鼠肝癌标本分别与人、大鼠、小鼠的基因芯片进行跨种属杂交, 结果分别筛出281、107和78个肝癌差异表达基因, 其中三种芯片共同显示差异表达的基因有11个, 后者全部可以通过以土拨鼠特异性引物进行的定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)的验证试验, 作者认为联合应用三种芯片进行跨种属杂交可提供更多的重要信息.

应用低等灵长类动物树鼩的肝癌模型和基因微阵列技术, 本课题组在动态观察树鼩肝癌形成过程中的差异表达基因研究中, 发现肝癌形成过程中不同时期的差异表达基因谱有所不同^[21], 还发现一些差异表达基因为不同病因诱发的树鼩肝癌组织所共同拥有^[22], 由此我们提出了如下假设: 第一, 与某种肿瘤发生有关的关键性基因改变应当在所有的同类肿瘤中都能检出, 因此很可能在那些已报道的大批肝癌相关基因中, 绝大多数只与肝癌形成过程中的某一表象变化有关, 而在肝癌的发生发展过程中起关键作用的基因只是极少数; 第二, 无论何种致癌因素引起的人和动物的肝癌可能都遵循着一个共同的机制发生和发展, 或虽经不同的机制发生发展但其中存在着交叉或重叠的关键节点, 因此, 通过探索人和其他动物的肝癌形成过程中共同拥有的基因改变, 有可能筛选出影响肝癌发生发展的关键基因. 基于这一假设, 本课题组随后应用比较蛋白质组学技术对AFB₁诱发树鼩肝癌和二乙基亚硝基(DEN)诱发大鼠肝癌过程中的差异表达蛋白进行了研究, 发现了一批在树鼩和大鼠肝癌形成过程中差异表达的蛋白质^[23,24]; 结合数据库挖掘(data mining)的方法, 进一步对树鼩、大鼠和人类肝癌相关分子进行跨种属筛选的研究目前正在进行中.

2 跨种属筛选策略在肠癌研究中的应用

基于结直肠癌的癌胚抗原表达是由于胚胎抗原癌性激活的认识, Kaiser等^[25]2007年报道对100例人结直肠癌、39例来自4种模型的小鼠结肠肿瘤、胚胎10余天的小鼠结肠和正常成人结肠的基因表达谱进行比较, 发现了一组人和鼠结肠肿瘤共同差异表达的癌基因和抑癌基因, 认为这种跨种属、发育和模型的基因表达谱比较模式为识别肿瘤标志物及治疗靶点提供了一条新路径. 随后, 由于认为散发性结肠癌与肿瘤抑制基因APC的突变及其导致的信号通路Wnt/beta-catenin激活有关, Gaspar等^[26]对APC基因突变的遗传性人类结肠癌和APC基因失活的小鼠肠肿瘤基因表达谱进行比较, 发现两个种属间有166个相似的差异表达基因, 这些保守基因的功能多与癌细胞增殖和Wnt/beta-catenin信号通路的激活有关. 最近, Tang等^[27]对人和犬散发性结直肠癌的拷贝数异常基因进行比较, 以寻找两种属间的重叠改变, 认为在两个种属中共有改变的基因较仅在单种属变化的基因更有可能是肿瘤的启动基因; 而McManus等^[28]则通过筛选人结肠癌细胞与酵母中导致染色体不稳定的共有突变, 来定位肿瘤治疗靶点. 此外, Bandapalli等^[29]曾报道通过跨种属比较人和鼠的肠癌肝转移基因表达谱, 以寻找与肿瘤侵袭相关基因.

3 跨种属筛选策略在其他肿瘤研究中的应用

3.1 乳腺癌 Hu等^[30]2004年率先报道将跨种属比较策略应用于模型小鼠乳腺癌和人乳腺癌基因表达谱的研究, 发现两个种属乳腺癌的主要异常表达基因非常相似. Wardrop等^[31]随后用跨种属的比较基因组学分析乳腺癌易感基因BRCA1, 发现了两个在人类和小鼠BRCA1基因中共同存在的具有重要基因表达调节功能的非编码序列. Herschkowitz等^[32]用基因芯片技术分析了13种模型小鼠乳腺癌基因表达谱并与人类乳腺癌基因表达谱作比较, 发现一些已知的人类乳腺癌的特征性基因改变确实是保守存在于小鼠乳腺癌中. Bennett等^[33]近年对小鼠乳腺癌模型在人类乳腺癌中的应用进行回顾, 认为可以应用基因工程小鼠乳腺癌模型和人类乳腺癌相比较的方法来得到遗传进化上保守的参与肿瘤发生发展的基因, 即可通过跨种属肿瘤比较基因组学策略来筛选人、鼠乳腺癌中保守的基因改变, 以获得判断肿瘤转移和预后的生物标志以及药物靶点.

■创新盘点

国内目前在跨种属筛选肿瘤相关分子方面报道十分有限, 本文对这一研究策略的意义及其在肝癌、肠癌等肿瘤研究中的应用进展作一概述, 其中介绍了作者所在课题组近年来在这一领域进行的相关研究.

■应用要点

现有的相关研究结果表明,在人和动物的肿瘤发生过程中可能有保守存在的共同基因改变,后者更有可能有诱发或促进肿瘤的关键分子而非肿瘤发生过程中伴随的分子事件。

3.2 前列腺癌 前列腺癌为全球男性主要肿瘤死因之一,探索前列腺癌在侵袭过程中起关键作用的分子具有重要意义,但迄今报道的大量基因表达谱分析数据并没有确定哪个或哪些基因与侵袭性有关,为此, Kela等^[34]最近报道通过对人类和转基因小鼠的前列腺癌基因表达谱进行跨种属比较,筛选出一组在两个种属的前列腺癌共同改变的基因,发现其中一些属已知的与人类前列腺癌不良预后有关的基因,还发现一些已知与人类前列腺癌侵袭性有关的调节基因改变也存在于转基因小鼠前列腺癌的癌前病变和局限性肿瘤中,作者因此认为可以通过研究转基因小鼠的前列腺癌前病变来探寻人类前列腺癌的侵袭相关基因. 此前Schlicht等^[35]曾通过比较分析人类和大鼠前列腺癌细胞在化学预防物硒作用前后的基因表达变化,发现两个种属的前列腺癌细胞在硒干预前后的基因表达模式相似,认为此策略可用来研究硒在化学预防前列腺癌中的作用机制.

3.3 膀胱癌 膀胱癌的预后与肿瘤细胞是否浸润肌层有关. Williams等^[36]近年报道通过比较大鼠、小鼠和人类的膀胱癌基因表达谱,发现在啮齿类膀胱癌差异表达的基因大多参与人类膀胱癌的浸润过程,并从三个种属的共同差异表达基因中筛选出一组候选的膀胱癌关键基因. Sen等^[37]运用基因芯片技术检测暴露于不同剂量二甲基砷酸(DMA)的人膀胱细胞系UROtsa、大鼠膀胱细胞系MYP3和大鼠膀胱上皮组织的基因表达变化,观察到一些共同的信号传导通路和差异表达基因.

3.4 肺癌 Sweet-Cordero等^[38]应用跨种属比较策略对小鼠和人类的肺癌差异基因表达谱进行比较,发现KRAS2基因突变在人类肺癌发生中具有重要意义.

3.5 淋巴瘤 Maser等^[39]应用染色体不稳定的基因工程小鼠淋巴瘤模型来筛选在小鼠和人类淋巴瘤中共有的改变,发现与小鼠淋巴瘤有关的基因改变可见于人的急性T细胞白血病/淋巴瘤以及人的血液、间叶和上皮组织的肿瘤,认为人和鼠的肿瘤形成过程中可能经历了同样的由原始基因事件启动的生物过程.

3.6 黑色素细胞瘤和其他肿瘤 Kim等^[6]通过对基因工程小鼠黑色素细胞瘤转移细胞株与人类黑色素瘤比较,发现NEDD9基因的上调表达对黑色素瘤的进展和转移起促进作用. Jette等^[40]对斑马鱼和哺乳类的Bcl-2家族蛋白进行跨种属比

较,发现此蛋白在两物种间具有很高程度的保守性,因此认为斑马鱼模型可用于凋亡调节机制方面的研究. Gordon等^[41]对酵母、果蝇和人类的基因信息进行跨种属比较,由此定位出与人的生长抑制基因ING相互作用的蛋白.

4 结论

跨种属筛选肿瘤关键分子的策略应用于多种肿瘤的研究结果表明,在人和动物的肿瘤发生过程中可能有保守存在的共同基因改变,后者可能是诱发或促进肿瘤的关键分子. 如何整合庞大的数据是应用跨种属筛选肿瘤关键分子策略的重要环节之一,而用于跨种属比较的数据库于近年已有报道^[42]. 总之,这一新的肿瘤研究策略虽然尚在起步阶段,在我国国内至今尚罕见这方面的相关报道,但他很可能在人类战胜肿瘤的进程中有所作为,应当引起重视.

5 参考文献

- Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep* 2009; 57: 1-134
- Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 2010; 31: 100-110
- Zender L, Xue W, Zuber J, Semighini CP, Krasnitz A, Ma B, Zender P, Kubicka S, Luk JM, Schirmacher P, McCombie WR, Wigler M, Hicks J, Hannon GJ, Powers S, Lowe SW. An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* 2008; 135: 852-864
- Zender L, Lowe SW. Integrative oncogenomic approaches for accelerated cancer-gene discovery. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 72-76
- Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, Fan ST, Luk JM, Wigler M, Hannon GJ, Mu D, Lucito R, Powers S, Lowe SW. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 2006; 125: 1253-1267
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, Brennan C, Hahn WC, Cordon-Cardo C, Wagner SN, Flotte TJ, Duncan LM, Granter SR, Chin L. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 2006; 125: 1269-1281
- Peeper D, Berns A. Cross-species oncogenomics in cancer gene identification. *Cell* 2006; 125: 1230-1233
- Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Of mice and men: cancer gene discovery using comparative oncogenomics. *Cancer Cell* 2006; 10: 2-4
- Mattison J, van der Weyden L, Hubbard T, Adams DJ. Cancer gene discovery in mouse and man. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796: 140-161
- Mattison J, Kool J, Uren AG, de Ridder J, Wessels L, Jonkers J, Bignell GR, Butler A, Rust AG, Brosch M, Wilson CH, van der Weyden L, Largaespada DA, Stratton MR, Futreal PA, van Lohuizen M, Berns A, Collier LS, Hubbard T, Adams DJ. Novel

- candidate cancer genes identified by a large-scale cross-species comparative oncogenomics approach. *Cancer Res* 2010; 70: 883-895
- 11 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063
 - 12 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2166-2176
 - 13 Martin J, Dufour JF. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1720-1733
 - 14 Tong WM, Lee MK, Galendo D, Wang ZQ, Sabapathy K. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of Hupki (human p53 knock-in) mice. *Int J Cancer* 2006; 119: 745-749
 - 15 Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Functional genomics of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; 43: S145-S150
 - 16 Fang H, Tong W, Perkins R, Shi L, Hong H, Cao X, Xie Q, Yim SH, Ward JM, Pitot HC, Dragan YP. Bioinformatics approaches for cross-species liver cancer analysis based on microarray gene expression profiling. *BMC Bioinformatics* 2005; 6 Suppl 2: S6
 - 17 Lam SH, Gong Z. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle* 2006; 5: 573-577
 - 18 Xue W, Krasnitz A, Lucito R, Sordella R, Vanaelst L, Cordon-Cardo C, Singer S, Kuehnel F, Wigler M, Powers S, Zender L, Lowe SW. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 2008; 22: 1439-1444
 - 19 Anderson PW, Tennant BC, Lee Z. Cross-species hybridization of woodchuck hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma using human oligonucleotide microarrays. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4646-4651
 - 20 Wang F, Kuang Y, Salem N, Anderson PW, Lee Z. Cross-species hybridization of woodchuck hepatitis viral infection-induced woodchuck hepatocellular carcinoma using human, rat and mouse oligonucleotide microarrays. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 605-617
 - 21 Li Y, Wan D, Wei W, Su J, Cao J, Qiu X, Ou C, Ban K, Yang C, Yue H. Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Hepatol Res* 2008; 38: 85-95
 - 22 李瑗, 苏建家, 曹骥, 欧超, 仇效坤, 杨春, 班克臣, 岳惠芬, 韦薇, 欧胜敬, 张丽生, 万大方, 顾健人. 不同因素诱发的树鼯肝癌组织的基因表达差异. *癌症* 2003; 22: 1018-1022
 - 23 Li Y, Qin X, Cui J, Dai Z, Kang X, Yue H, Zhang Y, Su J, Cao J, Ou C, Yang C, Duan X, Yue H, Liu Y. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II. *Proteomics* 2008; 8: 1490-1501
 - 24 梁宏浩, 韦薇, 康晓楠, 郭坤, 曹骥, 苏建家, 杨春, 欧超, 李瑗, 刘银坤. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中癌前病变阶段差异表达蛋白的筛选. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 669-674
 - 25 Kaiser S, Park YK, Franklin JL, Halberg RB, Yu M, Jessen WJ, Freudenberg J, Chen X, Haigis K, Jegga AG, Kong S, Sakthivel B, Xu H, Reichling T, Azhar M, Boivin GP, Roberts RB, Bissahoyo AC, Gonzales F, Bloom GC, Eschrich S, Carter SL, Aronow JE, Kleimeyer J, Kleimeyer M, Ramaswamy V, Settle SH, Boone B, Levy S, Graff JM, Doetschman T, Groden J, Dove WF, Threadgill DW, Yeatman TJ, Coffey RJ Jr, Aronow BJ. Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol* 2007; 8: R131
 - 26 Gaspar C, Cardoso J, Franken P, Molenaar L, Morreau H, Möslein G, Sampson J, Boer JM, de Menezes RX, Fodde R. Cross-species comparison of human and mouse intestinal polyps reveals conserved mechanisms in adenomatous polyposis coli (APC)-driven tumorigenesis. *Am J Pathol* 2008; 172: 1363-1380
 - 27 Tang J, Le S, Sun L, Yan X, Zhang M, Macleod J, Leroy B, Northrup N, Ellis A, Yeatman TJ, Liang Y, Zwick ME, Zhao S. Copy number abnormalities in sporadic canine colorectal cancers. *Genome Res* 2010; 20: 341-350
 - 28 McManus KJ, Barrett IJ, Nouhi Y, Hieter P. Specific synthetic lethal killing of RAD54B-deficient human colorectal cancer cells by FEN1 silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3276-3281
 - 29 Bandapalli OR, Kahlert C, Hellstern V, Galindo L, Schirmacher P, Weitz J, Brand K. Cross-species comparison of biological themes and underlying genes on a global gene expression scale in a mouse model of colorectal liver metastasis and in clinical specimens. *BMC Genomics* 2008; 9: 448
 - 30 Hu Y, Sun H, Drake J, Kittrell F, Abba MC, Deng L, Gaddis S, Sahin A, Baggerly K, Medina D, Aldaz CM. From mice to humans: identification of commonly deregulated genes in mammary cancer via comparative SAGE studies. *Cancer Res* 2004; 64: 7748-7755
 - 31 Wardrop SL, Brown MA. Identification of two evolutionarily conserved and functional regulatory elements in intron 2 of the human BRCA1 gene. *Genomics* 2005; 86: 316-328
 - 32 Herschkowitz JL, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007; 8: R76
 - 33 Bennett CN, Green JE. Unlocking the power of cross-species genomic analyses: identification of evolutionarily conserved breast cancer networks and validation of preclinical models. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 213
 - 34 Kela I, Harmelin A, Waks T, Orr-Urtreger A, Domany E, Eshhar Z. Interspecies comparison of prostate cancer gene-expression profiles reveals genes associated with aggressive tumors. *Prostate* 2009; 69: 1034-1044
 - 35 Schlicht M, Matysiak B, Brodzeller T, Wen X, Liu H, Zhou G, Dhir R, Hessner MJ, Tonellato P, Suckow M, Pollard M, Datta MW. Cross-species global and

■ 名词解释

跨种属 (cross species) 肿瘤基因筛选策略: 指通过比较人和其他种属在同种肿瘤基因表达谱间的相似改变, 来探寻在该肿瘤发生发展中起关键作用的分子的研究策略。

■同行评价

本文选题较新,在已有研究的基础上,结合国外研究的成果,探讨了跨种属的肿瘤相关基因筛选策略的进展,内容丰富,数据详实,文笔流畅,具有一定的可读性。

- subset gene expression profiling identifies genes involved in prostate cancer response to selenium. *BMC Genomics* 2004; 5: 58
- 36 Williams PD, Lee JK, Theodorescu D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. *Neoplasia* 2008; 10: 838-846
- 37 Sen B, Wolf DC, Turpaz Y, Bugrim A, Retief J, Hester SD. Identification of interspecies concordance of mechanisms of arsenic-induced bladder cancer. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1513-1529
- 38 Sweet-Cordero A, Mukherjee S, Subramanian A, You H, Roix JJ, Ladd-Acosta C, Mesirov J, Golub TR, Jacks T. An oncogenic KRAS2 expression signature identified by cross-species gene-expression analysis. *Nat Genet* 2005; 37: 48-55
- 39 Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A, O'Neil J, Gutierrez A, Ivanova E, Perna I, Lin E, Mani V, Jiang S, McNamara K, Zaghul S, Edkins S, Stevens C, Brennan C, Martin ES, Wiedemeyer R, Kabbarah O, Nogueira C, Histen G, Aster J, Mansour M, Duke V, Foroni L, Fielding AK, Goldstone AH, Rowe JM, Wang YA, Look AT, Stratton MR, Chin L, Futreal PA, DePinho RA. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 2007; 447: 966-971
- 40 Jette CA, Flanagan AM, Ryan J, Pyati UJ, Carbonneau S, Stewart RA, Langenau DM, Look AT, Letai A. BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1063-1072
- 41 Gordon PM, Soliman MA, Bose P, Trinh Q, Sensen CW, Riabowol K. Interspecies data mining to predict novel ING-protein interactions in human. *BMC Genomics* 2008; 9: 426
- 42 Ogasawara O, Otsuji M, Watanabe K, Iizuka T, Tamura T, Hishiki T, Kawamoto S, Okubo K. BodyMap-Xs: anatomical breakdown of 17 million animal ESTs for cross-species comparison of gene expression. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D628-D631

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人,全部为副教授及副主任医师以上。*WCJD*编委会审稿费结算工作于每年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用,共计40 850,数据以稿件审回日期为准。*WCJD*共计审稿1 418篇,其中送审专家377位,共计送审次数2 094次,成功审回次数1 634,成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为:西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位,各17篇;南京医科大学附属第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位,16篇;中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位,各15篇。

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持,同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款,如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差,请各位编委与编辑部联系,联系电话:010-85381892,联系人:李军亮。(编辑部主任:李军亮 2010-04-20)

顺铂结合CIK细胞对裸鼠人胃癌模型体内的抗肿瘤作用

孙利兵, 杨光

孙利兵, 杨光, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科 江苏省苏州市 215001

苏州科技局基金资助项目, No. SS0524

作者贡献分布: 此课题由杨光设计; 研究过程由孙利兵操作完成; 本论文写作由孙利兵与杨光共同完成。

通讯作者: 杨光, 主任医师, 215001, 江苏省苏州市白塔西路16号, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科. libingmoma@gmail.com
电话: 0512-62364381

收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-02-04

接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-28

Antitumor effects of cisplatin and CIK cells against human gastric cancer in nude mice

Li-Bing Sun, Guang Yang

Li-Bing Sun, Guang Yang, Department of Oncology, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Suzhou Science and Technology Agency, No. SS0524

Correspondence to: Guang Yang, Department of Oncology, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 16 West Baita Road, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China. libingmoma@gmail.com

Received: 2009-12-18 Revised: 2010-02-04

Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the antitumor effects of cisplatin and cytokine-induced killer (CIK) cells, alone and in combination, against human gastric cancer in nude mice.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from healthy volunteers by Ficoll gradient centrifugation. CIK cells were induced by culturing PBMCs in the complete medium containing recombinant human interferon-g (rhIFN-g), anti-CD3 monoclonal antibody (mcAb), recombinant human interleukin-2 (rhIL-2), and recombinant human interleukin-1 (rhIL-1). Eighty Balb/c nude mice were subcutaneously transplanted with gastric cancer cells (SGC-7901) in the exponential growth phase. Ten days later, these mice were randomly divided into four groups: control group, cisplatin group, CIK cell group and cisplatin plus CIK cell group, which were given normal saline, cisplatin, CIK cells, and cisplatin plus CIK cells for five days,

respectively.

RESULTS: Compared with normal saline, cisplatin and CIK cells, alone and in combination, extended the survival time of nude mice bearing tumors and decreased tumor weight (all $P < 0.01$). The reduced rate of tumor growth was significantly higher in the cisplatin plus CIK cell group (57.8%) than in the control group ($P < 0.01$). The levels of erythrocyte C3b receptor significantly increased, and those of erythrocyte immune complex receptors significantly decreased in all treatment groups when compared to the control group (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Cisplatin and CIK cells in combination is better than alone in inhibiting the growth of human gastric cancer in nude mice.

Key Words: Cytokine-induced killer cell; Cisplatin; Gastric cancer; Nude mouse

Sun LB, Yang G. Antitumor effects of cisplatin and CIK cells against human gastric cancer in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1261-1263

摘要

目的: 探讨顺铂、CIK细胞以及顺铂联合CIK对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用, 为临床上联合应用顺铂和CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

方法: 应用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 给予多种细胞因子(rhIFN-g、CD3 mcAb、rhIL-1、rhIL-2), 诱导生成CIK细胞; 培养人胃癌细胞株SGC-7901, 接种至80只裸鼠右腋下, 10 d后取移植瘤直径基本一致的裸鼠随机分4组: NS对照组、顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组, 每组16只。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予相应注射治疗, 观察其对胃癌移植瘤模型的抗肿瘤疗效。

结果: 与NS对照组相比, 顺铂组、CIK细胞组、顺铂+CIK细胞组裸鼠人胃癌移植瘤模型治疗后肿块质量均减轻, 生存期均明显延长, 尤以顺铂+CIK组效果显著($P < 0.01$)。裸鼠体内

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 传统手术根治及化疗对进展期胃癌的疗效仍不理想。CIK其杀伤肿瘤细胞效应是非MHC限制性的, 具有强大的抗肿瘤活性, 而成为临床应用的一种理想效应细胞。顺铂是目前应用最广泛的抗肿瘤药物之一。本研究进一步探讨顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌细胞体内生长的抑制作用, 为进一步临床应用化疗联合CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

■同行评议者

许文燮, 教授, 上海交通大学生命科学院生物医学工程系

■ 研发前沿

顺铂与CIK细胞联合应用成为肿瘤免疫治疗与化疗研究的新领域。

实验表明, 顺铂+CIK细胞联合应用能够显著抑制胃癌细胞的生长, 其抑瘤率可达57.8%, 明显高于NS对照组($P<0.01$)。免疫功能检测显示红细胞C3b反应受体明显升高, 红细胞免疫复合物受体明显降低($P<0.01$)。

结论: 顺铂联合CIK细胞对人胃癌移植瘤生长的抑制作用大于单独应用顺铂或CIK细胞。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞; 顺铂; 胃癌; 裸鼠

孙利兵, 杨光. 顺铂结合CIK细胞对裸鼠人胃癌模型体内的抗肿瘤作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1261-1263
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1261.asp>

0 引言

胃癌是威胁人类健康和生命的主要恶性肿瘤之一, 在东亚的日本、韩国、中国、南美及中欧胃癌的发病率极高^[1]。最新调查报告显示, 我国目前胃癌的死亡率位列所有恶性肿瘤之首^[2]。临床早期发现胃癌的比例不足15%, 85%为进展期胃癌, 此时癌组织已经浸润达到肌层或浆膜层, 5年生存率仅为20%左右。生物治疗是继手术、化疗、放疗后肿瘤治疗的第4种模式, 适用于手术及放、化疗后的患者, 可望消除亚临床病灶及残留的肿瘤细胞。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)由人外周血单个核细胞在多种细胞因子的诱导下产生, 具有强大的抗肿瘤活性, 其杀伤肿瘤细胞效应是非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性的, 成为临床应用上一种理想效应细胞^[3]。顺铂是目前应用最广泛的抗肿瘤药物之一, 适用于治疗卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈部癌、肺癌、食管癌、肾癌、黑色素瘤、恶性淋巴瘤等^[4]。顺铂是通过损伤细胞DNA, 从而抑制细胞生长^[5]。本研究进一步探讨顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌细胞体内生长的抑制作用, 为进一步临床应用化疗联合CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c裸鼠40只, ♂, 6-8周龄, 体质量15-20 g(苏州大学动物实验中心提供), 于无菌恒温、恒湿屏障系统内饲养, 饮水均经灭菌处理; 人胃癌细胞株SGC-7901购于上海中国科学院细胞库; CD3McAb、rhINF- γ 、rhIL-1购于美国PeproTech公司; rhIL-2购于北京四环药业有限公司; 无血清培养基AIM-V购于北京天润善达

公司; Ficoll淋巴细胞分离液购于瑞典Amersham Biosciences公司; 鼠抗人CD3/CD56购于美国Coulter公司; 顺铂购于山东齐鲁制药厂。

1.2 方法

1.2.1 CIK细胞的分离、培养和鉴定: 将健康献血者抗凝外周血(苏州市中心血站提供)经Ficoll淋巴细胞分离液梯度离心, 取界面层单个核细胞, PBS洗涤3次后, 将细胞置于无血清培养基中, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, 加入rhIFN-g 1 000 U/mL, 置于37 °C、50 mL/L CO₂中培养。24 h后加入CD3McAb 100 μ g/L, rhIL-2 500 U/mL, rhIL-1 100 U/mL, 以后每3 d半量换液1次, 补加rhIL-2 500 U/mL。参照卫生部2003-03颁布的“人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则”。细胞培养到第10天, 取部分细胞进行细菌、霉菌的检测。培养14 d后, 台盼蓝计数, 收集培养的CIK细胞, 通过流式细胞仪检测其表面标志物。

1.2.2 动物实验: 将80只Balb/c裸鼠右腋下接种0.2 mL 1×10^6 /mL SGC-7901胃癌细胞后, 10 d后取移植瘤直径基本一致的裸鼠随机分4组: NS对照组、顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组, 每组16只。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予相应注射治疗, 每次0.2 mL。14 d后每组随机取8只裸鼠眼眶取血, 进行免疫功能检测, 颈椎脱臼处死剥离肿瘤块并称质量, 计算抑瘤率: 抑瘤率 = (对照组瘤质量 - 实验组瘤质量) / 对照组瘤质量 $\times 100\%$ 。各组剩余8只动物观察生存期。

统计学处理 所有数据均使用SPSS11.0软件包进行统计学分析。计量资料用mean \pm SD表示。各组间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CIK表型的鉴定 体外将PBMC经rhIFN-g、CD3 mcAb、rhIL-2、rhIL-1诱导培养14 d后, 可见细胞成团簇状生长, CIK细胞中CD3⁺、CD56⁺双阳性细胞(CD3⁺/CD56⁺)数量随培养时间的延长而增加。第0天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞占0.5% \pm 0.2%, 而经细胞因子刺激的T淋巴细胞第6、10、14天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞分别占: 18.1% \pm 2.9%、35.2% \pm 1.3%、44.7% \pm 2.8% ($P<0.01$)。

2.2 干预后14 d各组肿瘤生长情况及、抑瘤率及生存期 全部实验裸鼠于接种第7天时接种部位均有肿瘤形成, 10 d后肿瘤直径为0.5-1.0 cm。在顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组, 裸鼠在干预后14 d内肿瘤有所缩小, 对照组所有裸鼠的肿块均增大。NS对照组相比, 各组肿瘤湿质

■ 应用要点

文章重点对顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌动物模型的抗癌作用进行研究, 可以为临床应用化疗联合CIK细胞治疗提供更多的实验依据。

表 1 干预后14 d各组肿瘤湿质量、抑瘤率及生存周期 (n = 8, mean ± SD)

分组	肿瘤湿质量(g)	抑瘤率(%)	生存期(d)
NS对照组	2.36 ± 0.27	0	34 ± 3.2
顺铂组	1.15 ± 0.26 ^b	47.4 ^b	55 ± 1.6 ^b
CIK细胞组	1.23 ± 0.37 ^b	43.5 ^b	51 ± 2.1 ^b
顺铂+CIK细胞组	1.03 ± 0.18 ^b	57.8 ^b	60 ± 0.0 ^b

^bP<0.01 vs NS对照组.

表 2 各组对人胃癌裸鼠移植瘤模型免疫功能的影响 (n = 8, mean ± SD)

分组	剂量	红细胞C3b 反应受体(%)	红细胞免疫 复合物受体(%)
NS对照组	0.2 mL	5.08 ± 2.70	19.04 ± 3.12
顺铂组	2.5 mg/kg	8.32 ± 1.03 ^b	12.70 ± 1.46 ^b
CIK细胞组	0.2 mL	7.85 ± 0.48 ^b	13.80 ± 2.92 ^b
顺铂+CIK细胞组	0.2+0.2 mL	11.50 ± 1.34 ^b	9.82 ± 2.41 ^b

^bP<0.01 vs NS对照组.

量有不同程度下降, 顺铂+CIK细胞组尤为显著 (P<0.01, 表1). 与NS对照组相比, 顺铂+CIK细胞组对胃癌移植瘤生长的抑制作用明显, 抑瘤率可达57.8%(P<0.01). 以接种瘤细胞后生存60 d为治愈标准, 观察各组裸鼠的生存期(表1).

2.3 各组对人胃癌裸鼠移植瘤模型免疫功能的影响 与NS对照组比较, 各组红细胞C3b反应受体明显升高, 红细胞免疫复合物受体明显降低, 顺铂+CIK细胞组各项指标明显改善(P<0.01, 表2).

3 讨论

CIK细胞被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选, 成为临床应用上一种理想效应细胞. 他是以CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ T细胞为主的异质细胞群, 其功能特点是: 选择性地杀伤肿瘤细胞、体外增殖快、杀伤活性高、抗癌谱广、不良反应少^[6-8]. 顺铂是目前治疗实体瘤最常见、有效的抗肿瘤药物, 属于细胞周期非特异性药物, 可抑制癌细胞的DNA复制过程, 并损伤其细胞膜结构, 有较强的广谱抗癌作用, 并且与多种抗肿瘤药有协同作用, 且无交叉耐药等

特点, 为当前联合化疗中最常用的药物之一^[9]. 红细胞具有多种非特异性免疫受体和物质, 由于数量巨大, 他在机体非特异性免疫反应中及指导T淋巴细胞、B淋巴细胞特异免疫反应中都占有重要的地位^[10].

胃癌需进行综合治疗, 临床上以手术和化疗为主. 我们的实验结果表明, 顺铂联合CIK细胞具有明显抗肿瘤作用. 与NS对照组相比, 其余各组裸鼠的生存期明显延长, 肿瘤湿质量明显减轻, 红细胞C3b反应受体明显升高, 红细胞免疫复合物受体明显降低, 顺铂+CIK细胞组尤为显著(P<0.01).

总之, 本实验说明CIK细胞联合顺铂显著抑制肿瘤细胞的生长, 延长裸鼠生存期, 增强裸鼠免疫功能, 其抗肿瘤作用比单独化疗或单独应用CIK细胞的作用更强. 这为临床上应用顺铂联合CIK细胞以提高抗癌效果提供了依据.

4 参考文献

- 1 Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3: 118-124
- 2 Archie V, Kauh J, Jones DV Jr, Cruz V, Karpeh MS Jr, Thomas CR Jr. Gastric cancer: standards for the 21st century. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 123-131
- 3 Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1994; 153: 1687-1696
- 4 潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张涛. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2009-2013
- 5 孙俊. 铂类抗肿瘤药物及其临床研究进展. *中国药业* 2008; 17: 1-3
- 6 Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3⁺ CD56⁺ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol* 2003; 77: 175-179
- 7 Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 181-187
- 8 秦斌, 张筱茵. 胃癌分子免疫学研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 115-119
- 9 卢业才, 李启信, 束庆兵, 郭峰, 王光庆, 孙功平, 朱长进, 邱伟华. 丹参酮 II A磺酸钠联合顺铂腹腔化疗对胃癌生长的影响. *肿瘤基础与临床* 2009; 22: 121-124
- 10 马庆海, 索翠萍, 孙涛. 肝脏疾病患者红细胞免疫功能变化的临床研究. *医学检验与临床* 2007; 18: 74-76

■同行评价

本文的结果对临床顺铂和CIK细胞联合治疗胃癌的保守治疗、术后巩固治疗方面提供理论和实验依据.

编辑 李瑞敏 电编 何基才

无痛胃肠镜与常规胃肠镜临床应用1 800例

叶芬, 王红玲, 郑国荣, 韩洁, 王一鸣, 黄星, 黄梅芳, 施先艳, 夏冰

■背景资料

无痛胃肠镜术在发达国家已成为临床常规操作而普遍开展, 我国长期以来开展的是常规胃肠镜检查。近年来, 国内许多医院已经成功开展了无痛胃肠镜技术, 无痛内镜技术的兴起是否比常规内镜优越, 其优缺点如何, 至今仍然是国内外争论的焦点。

叶芬, 王红玲, 韩洁, 黄星, 黄梅芳, 施先艳, 夏冰, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省肠病医学临床研究中心 湖北省武汉市 430071

郑国荣, 王一鸣, 中国人民解放军广州军区武汉总医院消化内科 湖北省武汉市 430064

作者贡献分布: 此课题由夏冰、王红玲及叶芬设计; 问卷调查由叶芬完成, 王红玲、郑国荣、韩洁、王一鸣、黄星、黄梅芳、施先艳及夏冰协助; 数据分析由叶芬完成与夏冰修改; 论文写作由叶芬完成, 夏冰修改审核。

通讯作者: 夏冰, 教授, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院消化内科, 湖北省肠病医学临床研究中心。bingxiawh@gmail.com
收稿日期: 2010-01-15 修回日期: 2010-04-03

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-04-28

Clinical application of sedated gastrocolonoscopy versus conventional gastrocolonoscopy: an analysis of 1 800 cases

Fen Ye, Hong-Ling Wang, Guo-Rong Zheng, Jie Han, Yi-Ming Wang, Xing Huang, Mei-Fang Huang, Xian-Yan Shi, Bing Xia

Fen Ye, Hong-Ling Wang, Jie Han, Xing Huang, Mei-Fang Huang, Xian-Yan Shi, Bing Xia, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, the Research Center for Clinical Study of Intestinal & Colorectal Diseases of Hubei Province, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Guo-Rong Zheng, Yi-Ming Wang, Department of Gastroenterology, Wuhan General Hospital, Chinese PLA Guangzhou Military Command, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Bing Xia, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, the Research Center for Clinical Study of Intestinal & Colorectal Diseases of Hubei Province, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxiawh@gmail.com

Received: 2010-01-15 Revised: 2010-04-03

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To compare the clinical costs, safety and comfortableness as well as the satisfaction degree among examinees and examiners between sedated gastrocolonoscopy and conventional gastrocolonoscopy.

METHODS: One thousand and eight hundred patients undergoing gastrocolonoscopy and 11 physicians conducting such examinations at either Zhongnan Hospital of Wuhan University or

Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command from March 2009 to September 2009 were enrolled to fill out a questionnaire. Of all patients, 1 000 underwent conventional gastrocolonoscopy, and 800 underwent sedation gastrocolonoscopy.

RESULTS: The two groups of patients had significant differences in occupation, educational background, income level and the source of costs (all $P < 0.01$). There was no statistical difference in the number of patients intolerant of the examinations between the two groups ($P > 0.05$). Significant differences were also noted in the comfortableness and safety between the two groups ($P < 0.01$). Although there was no significant difference in patient's satisfaction degree between the two groups ($P > 0.05$), the physicians believed that conventional gastrocolonoscopy was safer than sedated gastrocolonoscopy.

CONCLUSION: Conventional gastrocolonoscopy is economic, effective and safe, and is accepted by the majority of patients. Though sedated gastrocolonoscopy is more comfortable and less painful, it has a higher price and risk. Therefore, sedated gastrocolonoscopy is suitable for patients who are unwilling to or cannot undergo conventional endoscopy. Patients who previously underwent colonoscopy prefer to accept sedated examination.

Key Words: Sedation gastrocolonoscopy; Conventional gastrocolonoscopy; Comparative questionnaire investigation

Ye F, Wang HL, Zheng GR, Han J, Wang YM, Huang X, Huang MF, Shi XY, Xia B. Clinical application of sedated gastrocolonoscopy versus conventional gastrocolonoscopy: an analysis of 1 800 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1264-1269

摘要

目的: 调查无痛胃肠镜与常规胃肠镜的临床经济情况、安全舒适度及检查者和被检查者满意度等, 为无痛胃肠镜在我国临床的选择应用提供依据。

■同行评议者

唐志鹏, 研究员, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科

方法: 2009-03/2009-09在武汉大学中南医院及中国人民解放军广州军区武汉总医院随机抽取胃肠镜检查的1 800例患者和11名进行内镜操作的医生, 阅读调查须知及填写问卷调查表. 其中常规胃肠镜检查患者1 000例, 无痛胃肠镜患者800例.

结果: 常规组与无痛组患者在职业、学历、收入水平、费用来源等方面有显著性差异($P < 0.01$). 两组不能耐受检查的比例无统计学差异($P > 0.05$). 两组舒适性和安全性比较, 差异均有显著性($P < 0.01$). 两组患者满意度无显著性差异($P > 0.05$). 医师认为常规胃肠镜更安全.

结论: 常规胃肠镜经济、安全、效果好, 目前仍为大多数患者所接受. 无痛胃肠镜痛苦小, 但是价格较高, 有一定风险, 适用于不宜或不愿接受常规内镜检查的患者. 进行结肠镜检查的患者更愿意接受无痛检查.

关键词: 无痛胃肠镜; 常规胃肠镜; 对比问卷调查

叶芬, 王红玲, 郑国荣, 韩洁, 王一鸣, 黄星, 黄梅芳, 施先艳, 夏冰. 无痛胃肠镜与常规胃肠镜临床应用1 800例. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1264-1269

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1264.asp>

0 引言

无痛胃肠镜术在许多发达国家已经成为临床常规操作而普遍开展, 美国每年大约有2亿人接受镇静剂内镜检查^[1,2]. 近年来, 随着胃肠疾病诊断及筛查工作量的日益增加、镇静药物并发症的发生等诸多问题的出现, 这些国家逐渐开展选择性对部分患者实施非镇静内镜检查的临床研究^[3-5]. 在我国, 随着人民生活水平和质量的提高、无痛内镜技术的不断完善以及患者对无痛医疗认知程度的不断提高, 越来越多消化内科患者就诊时选择无痛内镜检查. 近年来, 国内许多医院已经成功开展了无痛内镜技术. 以丙泊酚为基础的麻醉方案作为无痛内镜诊治术经临床实践证实是安全有效的^[6,7]. 然而, 由于我国长期以来开展的是常规内镜检查, 无痛内镜技术的兴起是否比常规内镜优越, 其优缺点如何, 至今仍然是国内外争论的焦点. 本研究由武汉大学中南医院消化内科、湖北省肠病医学临床研究中心参考目前国内外关于无痛胃肠镜术临床应用的相关研究^[8-12], 结合目前我国消化内镜临床应用现状制定问卷调查表, 分胃肠镜被检查者(患者)问卷表和内镜医师调查表, 在无痛胃肠

镜与常规胃肠镜检查的临床经济情况、安全舒适度及检查者和被检查者满意度等方面开展问卷调查, 为调查无痛胃肠镜在我国的临床应用与选择提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学中南医院消化内科及中国人民解放军广州军区武汉总医院消化内科提供病例, 协助调查. 盐酸利多卡因胶浆; 丙泊酚注射液(10 g/L); 奥林巴斯电子胃、肠镜; 多功能监护仪; 麻醉机备用.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准和排除标准: (1)因胃肠道不适症状来院就诊的患者, 需行消化内镜检查辅助诊疗, 术前患者评估按照美国麻醉医师协会(ASA)的分级标准, 标准为 I - II 级; (2)年龄选择14-85岁, 男女不限; (3)有小学以上文化水平, 可独立阅读填写问卷调查表; (4)签署知情同意书. 排除标准: 凡有常规内镜或无痛内镜检查禁忌证者.

1.2.2 病例选择: 2009-03/2009-09在武汉大学中南医院及中国人民解放军广州军区武汉总医院消化内镜中心进行胃肠镜检查的1 800例患者, 其中常规胃肠镜检查组(常规组)患者1 000例, 男584例, 女416例, 平均年龄48.9岁±15.3岁; 无痛胃肠镜组(无痛组)患者800例, 男425例, 女375例, 平均年龄46.9岁±14.3岁.

1.2.3 检查: 所有胃肠镜检查均于门诊消化内镜中心进行. 常规胃镜检查术前10 min含服盐酸利多卡因胶浆10 mL, 常规结肠镜术前予以硫酸镁清洁肠道, 给患者做思想工作, 安慰患者, 减轻患者紧张心理, 待患者情绪稳定后开始检查. 无痛内镜检查前建立静脉通路, 检查过程采用多功能监护仪监测血压、呼吸、心率、指脉血氧饱和度. 准备工作完成后, 由麻醉医师给予丙泊酚1-2 mg/kg剂量, 4 mg/s速度静脉推注, 待患者不能应答, 睫毛反射消失, 全身肌肉松弛时, 内镜医师进行插镜检查.

1.2.4 研究步骤: 每次内镜由1名经验丰富、技术熟练、具有副主任医师以上职称的消化内镜医师完成, 麻醉科主治以上医师负责无痛内镜麻醉镇静工作, 11位消化内镜医师参与本研究调查. 内镜检查完成后(无痛组待恢复正常意识后), 由研究者(叶芬)认真询问检查医师和被检查患者, 完整地填写问卷调查表. 所有问卷完成后进行统计分析.

统计学处理 采用SPSS17.0软件包统计分

■ 研发前沿

目前我国, 普通胃肠镜经济、安全、效果好, 仍为大多数患者所接受. 无痛胃肠镜痛苦小, 但是价格较高, 有一定风险, 适用于不宜或不愿接受常规内镜检查的患者. 进行结肠镜检查的患者更愿意接受无痛检查.

■相关报道

黄增相等报道以丙泊酚为基础的麻醉方案作为无痛内镜诊治术经临床实践证实是安全有效的。柴伟等报道检查时适当给予镇静药物可以提高患者的耐受性,降低应激反应,从而消除患者的恐惧心理和不适。

表 1 无痛组与常规组患者的职业构成 $n(\%)$

	无痛组	常规组
机关及事业单位	234(29.3) ^b	153(15.3)
医院	35(4.4)	30(3.0)
学校及科研单位	121(15.1)	121(12.1)
会计律师	3(0.4)	4(0.4)
私企和合资企业	72(9.0)	114(11.4)
个体	67(8.4)	74(7.4)
国企	87(10.9)	133(13.3)
学生	52(6.5)	64(6.4)
无业或自由职业	129(16.1) ^b	307(30.7)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

表 2 无痛组与常规组患者的学历构成 $n(\%)$

	无痛组	常规组
小学及以下	63(7.9) ^b	215(21.5)
中学或高职	342(42.7)	482(48.2)
大学及以上	395(49.4) ^b	303(30.3)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

表 3 无痛组与常规组患者的收入水平构成 $n(\%)$

收入水平(元/月)	无痛组	常规组
<1 000	52(6.5) ^b	279(27.9)
1 000-3 000	339(42.4)	519(51.9)
>3 000	409(51.1) ^b	202(20.2)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

析, 各组计数资料采用卡方检验, $P\leq 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 无痛胃肠镜与常规胃肠镜接受度情况 2009-03/2009-09在两所医疗机构总共有13 747人进行胃肠镜检查, 其中选择无痛检查2 033人, 占总人数的14.8%, 常规检查11 714人, 占总人数的85.2%; 共有11 545人进行胃镜检查, 其中无痛胃镜1 571人, 占有所有胃镜检查人数的13.6%; 共有2 202人进行肠镜检查, 其中无痛肠镜462人, 占有所有肠镜人数的21.0%.

2.2 患者学历及职业构成 2组患者职业在机关及事业单位、无业或自由职业方面存在显著性差异($P<0.01$, 表1). 学历在大学以上及小学以下学历, 差异有显著性意义($P<0.01$, 表2).

表 4 无痛组与常规组患者的检查费用构成 $n(\%)$

收入水平(元/月)	无痛组	常规组
自费	493(61.6) ^b	764(76.4)
公费或保险报销	307(38.4) ^b	236(23.6)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

表 5 无痛组与常规组患者选择胃肠镜方式的原因 (多项选择) $n(\%)$

收入水平(元/月)	无痛组	常规组
效果好	117(14.6)	602(60.2)
价格低	7(0.9)	394(39.4)
无痛苦	713(89.1)	52(5.2)
安全性高	112(14.0)	362(36.2)
时间消耗少	4(0.5)	36(3.6)

表 6 两组患者检查前心理反应 $n(\%)$

检查前心理反应	无痛组	常规组
完全不紧张	276(34.5) ^b	278(27.8)
有点紧张	403(50.4)	552(55.2)
很紧张	121(15.1)	170(17.0)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

2.3 两组患者收入水平及检查费用来源分布 两组患者在高低经济收入水平方面差异有显著性($P<0.01$, 表3). 两组患者间费用构成在自费和公费医疗保险报销方面差异也有显著性意义($P<0.01$, 表4).

2.4 两组患者选择胃肠镜方式的原因 无痛组与常规组患者选择胃肠镜方式的原因见表5, 无痛组患者选择无痛检查的主要原因为: 无痛苦(89.1%)、效果好(14.7%)(效果好: 检查结果准确、能反映机体及胃肠道的真实状态、能了解检查过程)、安全性高(14.0%); 常规组患者选择常规检查的主要因为效果好(60.2%)、价格低(39.4%)、安全性高(36.2%).

2.5 两组患者检查前心理状况 两组在完全不紧张方面差异有显著性意义($P<0.01$, 表6).

2.6 两组患者对胃肠镜的耐受 两组患者在可以耐受、基本可以耐受方面差异有显著性意义($P<0.01$), 在不能耐受检查方面无统计学意义(表7).

2.7 两组患者胃肠镜检查不适感和不良反应 两组患者在检查过程中有不适感方面差异有显著

表 7 两组患者对胃肠镜的耐受情况 $n(\%)$

检查前心理反应	无痛组	常规组
可以	739(92.4) ^b	655(65.5)
基本可以	60(7.5) ^b	341(34.1)
不能	1(0.1)	4(0.4)

^b $P<0.01$ vs 常规组.表 8 两组患者对胃肠镜检查的优缺点评价(可多选) $n(\%)$

	无痛组	常规组
优点		
能了解整个检查过程	3(0.4)	550(55.0)
安全	154(19.3)	513(51.3)
减少检查后留观时间	4(0.5)	304(30.4)
能立即恢复正常活动	42(5.3)	686(68.6)
经济	2(0.3)	316(31.6)
感觉舒适	750(93.8)	6(0.6)
缺点		
费用过高	324(40.5)	74(7.4)
不良反应	33(4.2)	30(3.0)
效果差	15(1.9)	15(1.5)
难以忍受	7(0.9)	723(72.3)
无	421(52.6)	158(15.8)

性意义(3.1% vs 81.4%, $P<0.01$). 两组患者在检查后有不良反应方面差异无显著性意义(21.8% vs 19.2%, $P>0.05$).

2.8 两组患者对胃肠镜检查的优缺点评价 无痛组认为无痛胃肠镜的优点为感觉舒适(93.8%)、安全(19.3%), 缺点是费用过高(40.5%); 常规组认为常规胃肠镜的优点为能立即恢复正常活动(68.6%)、能了解整个检查过程(55.0%)、安全(51.3%)、经济(31.6%)、检查后留院观察时间少(30.4%), 缺点是检查过程难受(72.3%), 见表8.

2.9 两组患者的总体评价 两组患者在总体感受及复查选择方面差异有显著意义($P<0.01$), 在满意度方面差异无显著意义($P>0.05$, 表9).

2.10 内镜医师对胃肠镜检查安全性的总体评价 无痛组与常规组患者完成胃肠镜检查后, 由内镜医师对所做检查进行安全性评价, 在很安全($P<0.01$)、有一定风险($P<0.01$)方面差异有显著性意义(表10).

3 讨论

无痛胃肠镜术为许多不宜或不愿进行常规胃肠镜的患者创造了安全、有效的检查条件^[13]. 有报

表 9 两组患者对其胃肠镜检查的总体评价 $n(\%)$

	无痛组	常规组	P 值
总体感受			
不愉快	16(2.0)	581(58.1)	0.000
良好	241(30.1)	411(41.1)	
无术中记忆, 术后感觉欣快	543(67.9)	8(0.8)	
满意度			
满意	795(99.4)	988(98.8)	0.210
不满意	5(0.6)	12(1.2)	
复查选择			
常规胃肠镜	36(4.5)	721(72.1)	0.000
无痛胃肠镜	764(95.5)	279(27.9)	

表 10 内镜医师对胃肠镜检查的安全性评价 $n(\%)$

安全评价	无痛组	常规组
很安全	73(9.1) ^b	545(54.5)
比较安全	509(63.6)	455(45.5)
有一定风险	218(27.3) ^b	0(0.0)

^b $P<0.01$ vs 常规组.

道表明在高危患者(ASAIII、IV)的胃镜检查及治疗中应用镇静麻醉是安全可行的^[14].

统计同期内两家大型医疗机构完成胃肠镜检查数量, 我们发现: 所有胃肠镜检查患者中, 仅14.8%患者选择无痛检查, 表明目前常规检查仍占据主导地位. 无痛胃镜检查人数占总胃镜检查人数的13.6%; 无痛肠镜检查人数占总肠镜检查人数的21.0%. 众所周知, 常规肠镜检查比常规胃镜检查更会导致患者不适, 而且费时更久, 所以在临床上需要接受肠镜检查的患者比胃镜检查的患者更多地选择无痛方式.

通过研究两组患者基本情况可知: (1)无痛组绝大多数患者经济收入处于中、高水平, 而常规组大多数患者经济处于低、中水平; (2)两组大多数患者胃肠镜检查费用为自费, 少数为公费报销或保险报销, 但无痛组非自费患者比例明显高于常规组; (3)无痛组来自机关及事业单位者较多, 常规组中无业或自由职业者较多, 两组其他患者职业构成比例近似; (4)无痛组高学历患者比例明显高于常规组, 而低学历患者比例显著低于常规组. 经卡方检验, 两组患者在经济收入、检查费用来源、职业、学历构成方面均有显著性统计学意义($P<0.01$). 总之, 无痛组学历水平较高, 拥有好职业和高收入的可能

■创新盘点

近年来, 关于无痛胃肠镜术的报道以临床应用方案为主, 本文首次从社会经济学角度, 采用流行病学方法调查, 对患者接受无痛或常规胃肠镜检查的接受度和满意度等内容作了较全面的归纳和系统的阐述.

室传导阻滞患者不宜进行该项麻醉. 本研究中所有无痛胃肠镜检查均由经验丰富的专业麻醉师配合完成, 检查前严格筛选患者并严格掌握麻醉适应证, 检查中严密监测生命体征并严格掌握镇静药品剂量. 多数患者检查中出现不同程度呼吸抑制、心率减慢或血压下降等, 但均为一过性, 大多数在正常范围无需特殊处理, 术后可迅速恢复. 极少数患者检查中出现心动过缓, 给予阿托品0.5-1.0 mg后迅速恢复, 另外检查全程鼻导管给氧有效防治了轻度低氧血症. 检查后所有患者留观10-30 min均安全离院.

总之, 在现阶段的中国, 普通胃肠镜经济、安全、效果好, 仍为大多数患者所接受. 无痛胃肠镜痛苦小, 但是价格较高, 工作量大, 有一定风险, 适用于不宜或不愿接受常规内镜检查的患者. 需要接受肠镜检查的患者比胃镜检查的患者更多地选择无痛方式. 消化内镜中心应配备技术熟练、经验丰富的内镜医师和麻醉师; 完善的抢救设备及药品. 随着人民生活水平的不断提高, 医疗保险、合作医疗事业的全面铺开, 以及现代麻醉方案的发展和不断完善, 无痛胃肠镜是今后的发展方向.

4 参考文献

- 1 Waring JP, Baron TH, Hirota WK, Goldstein JL, Jacobson BC, Leighton JA, Mallory JS, Faigel DO. Guidelines for conscious sedation and monitoring during gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 317-322
- 2 Karan SB, Bailey PL. Update and review of moderate and deep sedation. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2004; 14: 289-312
- 3 Rex DK, Imperiale TF, Portish V. Patients willing to try colonoscopy without sedation: associated clinical factors and results of a randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 554-559
- 4 Knox L, Hahn RG, Lane C. A comparison of unsedated colonoscopy and flexible sigmoidoscopy in the family medicine setting: an LA Net study. *J Am Board Fam Med* 2007; 20: 444-450
- 5 Leung FW, Mann SK, Salera R, Toomsen L, Cabrera H, Prather D, Gutierrez R, Leung JW. Options for screening colonoscopy without sedation: sequel to a pilot study in U.S. veterans. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 712-717
- 6 宋华如. 无痛胃肠镜临床应用观察. *实用医技杂志* 2007; 14: 50-51
- 7 黄增相, 吴建胜, 付美英, 陈先亲. 丙泊酚静脉麻醉于无痛胃肠镜中的临床价值. *实用医学杂志* 2007; 23: 386-387
- 8 Leung FW. Promoting informed choice of unsedated colonoscopy: patient-centered care for a subgroup of US Veterans. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2955-2959
- 9 Lichtenstein DR, Jagannath S, Baron TH, Anderson MA, Banerjee S, Dominitz JA, Fanelli RD, Gan SI, Harrison ME, Ikenberry SO, Shen B, Stewart L, Khan K, Vargo JJ. Sedation and anesthesia in GI endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 815-826
- 10 Vargo J, Howard K, Petrillo J, Scott J, Revicki DA. Development and validation of the patient and clinician sedation satisfaction index for colonoscopy and upper endoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 156-162
- 11 Leung FW, Aharonian HS, Leung JW, Guth PH, Jackson G. Impact of a novel water method on scheduled unsedated colonoscopy in U.S. veterans. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 546-550
- 12 Leung FW. The case of unsedated screening colonoscopy in the United States. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 1354-1356
- 13 徐贵森, 吴晓玲, 刘合年. 无痛内镜术在胃肠道疾病诊治中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1890-1896
- 14 陈亚红, 杨国玲, 曹东航. 无痛胃肠镜在高风险患者中的应用. *中国内镜杂志* 2006; 12: 653-655
- 15 中华人民共和国国家统计局. 中华人民共和国2008年国民经济和社会发展统计公报. 2009-02-26, cited 2010-04-28. Available from: URL: http://www.stats.gov.cn/tjgb/ndtjgb/qgndtjgb/t20090226_402540710.htm
- 16 柴伟, 张惠, 高昌俊, 张贵和, 杨永慧, 孙绪德. 异丙酚联合小剂量咪唑安定在无痛胃肠镜检查中的应用. *中国误诊学杂志* 2004; 4: 167-169
- 17 Yusoff IF, Raymond G, Sahai AV. Endoscopist administered propofol for upper-GI EUS is safe and effective: a prospective study in 500 patients. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 356-360
- 18 周少丽, 马武华, 陈秉学. 异丙酚对心血管系统的影响. *国外医学·麻醉学与复苏分册* 2002; 23: 329-331
- 19 Horiuchi A, Nakayama Y, Tanaka N, Ichise Y, Katsuyama Y, Ohmori S. Propofol sedation for endoscopic procedures in patients 90 years of age and older. *Digestion* 2008; 78: 20-23

■同行评价
本研究选题实用, 对临床意义较大.

编辑 李军亮 电编 何基才

CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性的Meta分析

曹伟军, 张振玉, 岳巧艳

■背景资料

胃癌是人类常见的恶性肿瘤, 其病因及发病机制尚不明确。环境与饮食习惯、幽门螺杆菌感染等与胃癌密切相关, 基因遗传易感性在胃癌中的作用也引起人们的重视。寻找与胃癌相关的遗传位点对胃癌的防治有重要意义。

曹伟军, 张振玉, 岳巧艳, 南京医科大学附属南京第一医院消化内科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 张振玉与曹伟军对此文所作贡献均等; 课题由张振玉与曹伟军共同设计; 研究过程在张振玉指导下由曹伟军操作完成; 数据分析由曹伟军与岳巧艳完成; 本论文写作由曹伟军完成, 张振玉审阅改正。

通讯作者: 张振玉, 教授, 210006, 江苏省南京医科大学附属南京第一医院消化内科. ahwangzhibing776@163.com
电话: 025-52271261

收稿日期: 2010-01-02 修回日期: 2010-03-10

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-28

CDH1 C-160A promoter polymorphism and genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis

Wei-Jun Cao, Zhen-Yu Zhang, Qiao-Yan Yue

Wei-Jun Cao, Zhen-Yu Zhang, Qiao-Yan Yue, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. ahwangzhibing776@163.com

Received: 2010-01-02 Revised: 2010-03-10

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between E-cadherin (CDH1) gene C-160A promoter polymorphism and genetic susceptibility to gastric cancer.

METHODS: Chinese biomedicine disc (CBM), Wanfang database, China National Knowledge Infrastructure (CNKI) and PubMed were searched for published case-control studies investigating the association between CDH1 C-160A promoter polymorphism and susceptibility to gastric cancer. The odds ratio was calculated to evaluate the genotypes of gastric cancer patients and control subjects. Fixed or random effect models were selected for pooled odds ratio calculation. Publication bias was assessed. All statistical analyses were conducted with Stata 10.0 software.

RESULTS: A total of 14 case-control studies

involving 3 144 gastric cancer patients and 4 221 controls were analyzed in the study. Compared with the wild-type genotype (homozygote CC), the pooled odds ratio [and 95% confidence interval (CI)] for CA and AA genotypes was 0.98 (0.84-1.15). In the population subgroup analysis, the odds ratios for Asian and Caucasian populations were 0.92 (0.81-1.04) and 1.21 (0.88-1.67), respectively.

CONCLUSION: CDH1 C-160A promoter polymorphism is not associated with genetic susceptibility to gastric cancer.

Key Words: CDH1; Gastric cancer; Gene polymorphism; Meta-analysis

Cao WJ, Zhang ZY, Yue QY. CDH1 C-160A promoter polymorphism and genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1270-1274

摘要

目的: 探讨CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性的关系。

方法: 检索中国生物医学文献数据库、万方数据库、中国期刊网和PubMed, 获取CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性的病例-对照研究。以胃癌组与对照组人群基因型分布的OR值为效应指标, 采用固定或随机效应模型进行合并分析, 并进行偏倚评估。应用STATA 10.0软件进行统计学处理。

结果: 共纳入文献13篇, 研究14项, 累计胃癌病例3 144例, 对照4 221例。与野生基因型CC相比, (CA+AA)合并的OR值(95%CI)为0.98(0.84-1.15)。按人群进行分层分析, 亚洲人群OR值为0.92(0.81-1.04), 高加索人群OR值为1.21(0.88-1.67)。

结论: CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性无关。

关键词: CDH1; 胃癌; 基因多态性; Meta分析

曹伟军, 张振玉, 岳巧艳. CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感

■同行评议者

刘云鹏, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科; 王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

性的Meta分析. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1270-1274
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1270.asp

0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤, 多种环境因素, 如幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染, 高盐饮食, 维生素C摄入不足, 吸烟等被认为与胃癌的发生密切相关^[1-3]. 近年来, 基因遗传易感性在胃癌的发生发展过程中的作用逐渐受到关注^[4,5]. 上皮钙黏蛋白(E-cadherin)的编码基因CDH1是一种肿瘤抑制基因和肿瘤转移抑制基因, 与多种上皮来源的恶性肿瘤的发生、发展、侵袭转移密切相关^[6]. 有研究表明, CDH1启动子上游第160位核苷酸存在C→A单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 该SNP可改变基因转录活性^[7], 从而可能改变上皮性肿瘤发病风险和侵袭转移能力. CDH1 C-160A基因多态性与胃癌发病风险的研究较多, 但结果不一致. 本文对相关的病例对照研究进行Meta分析, 定量评价CDH1 C-160A基因多态与胃癌发病风险的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 在中国生物医学文献数据库(CBM)、万方数据库、中国期刊网(CNKI)中检索中文文献, 检索词为胃癌, 胃肿瘤, CDH1, E-cadherin, E-钙黏蛋白, 基因多态. 在PubMed数据库中检索英文文献, 检索词为gastric cancer, stomach cancer, stomach neoplasms, CDH1, E-cadherin, polymorphism, 并辅以文献追溯法查找相关文献.

1.2 方法

1.2.1 文献纳入标准: (1)2010-01-01以前公开发表的关于CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性关系的独立的病例对照研究; (2)文中报告数据完整, 能直接或间接提供统计指标OR及95%CI.

1.2.2 文献排除标准: (1)报告数据不完整, 无法提取相关数据; (2)重复发表的文献.

1.2.3 数据提取: 对于纳入的文章, 我们均按照作者、发表年份、试验人群的来源、对照人群的来源, 以及肿瘤组和对照组各基因型携带者的数量进行整理.

统计学处理 通过计算Q检验统计量进行异质性检验, 若 $P > 0.10$, 认为各合并的数据无显著的异质性, 采用固定效应模型, 否则采用随机效应模型进行分析. 计算各研究及合并数据的OR值及其95%CI, 绘制森林图, 展示各研究结果及

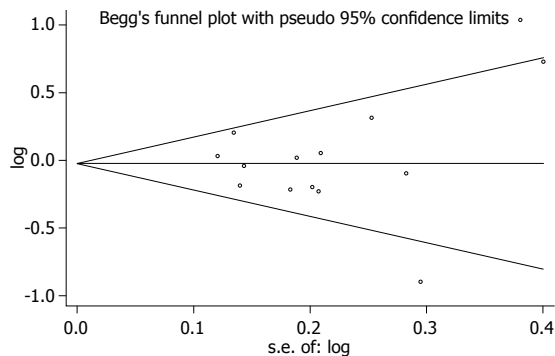


图1 Begg漏斗图.

其特征. 以各研究OR自然对数值的标准误为横坐标, OR值的自然对数为纵坐标, 绘制漏斗图(Begg's funnel plot)描述发表偏倚, STATA 10.0软件的线性回归模型(Egger法)检验漏斗图的对称性, 评估发表偏倚.

2 结果

2.1 文献概况 符合标准的文献共13篇^[8-20], 除1篇为中文文献^[13]外, 另12篇均为英文文献, 其中研究中国人群的文献5篇^[8,13,14,17,19]. Zhang等^[19]的文献报道了对两个不同人群的研究结果, 因此共有14项研究被纳入到Meta分析. 累计胃癌病例3 144例, 对照4 221例(表1).

2.2 Meta分析结果 对14项研究进行异质性检验, 各研究之间存在明显的异质性($\chi^2 = 29.35$, $P = 0.006$), 采用随机效应模型, 结果显示合并OR值为0.98, 95%CI为0.84-1.15(表2). 根据研究人群进行分层分析结果显示, 亚洲人群的9个研究之间无明显异质性($\chi^2 = 13.08$, $P = 0.109$), 采用固定效应模型, 合并OR值为0.92, 95%CI为0.81-1.04; 高加索人群的5个研究之间存在明显异质性($\chi^2 = 14.10$, $P = 0.007$), 采用随机效应模型, 合并OR值为1.21, 95%CI为0.88-1.67(表3).

2.3 发表偏倚评估 Begg漏斗图显示, 各点分别均匀, 基本对称, 绝大部分点都在95%可信区间内(图1). Egger检验显示, 偏倚系数(Coef.)为0.70, 95%CI: -2.05-3.45, 可信区间包含0, 且 $P = 0.59 > 0.05$, 故不能认为有显著性发表偏倚.

3 讨论

CDH1基因位于16q22.1, 其产物上皮钙黏蛋白E-cadherin是一种介导细胞间黏附的钙依赖跨膜糖蛋白, 在维持细胞间黏附完整性和细胞极性、参与胞间信号传导、调节组织发生和形态变化等方面发挥着关键作用^[6]. E-cadherin功能

■ 研发前沿

单核苷酸多态性(SNP)与肿瘤易感性的关系是近年研究的热点. 目前研究较多的, 与胃癌相关的SNP位点主要有: GSTT1 Null, TNF-A G-308A, MTHFR C667T, IL-1B C-511T等.

■相关报道

Pittman等的1项研究纳入了5 679名结肠癌患者,结果显示CDH1 C-160A显著增加结肠癌的发病风险,与野生基因型CC相比,(CA+AA)合并的OR值(95%CI)为1.11(1.05-1.17).

表 1 纳入研究的基本特征

作者	年份	人群	对照来源	肿瘤组			对照组		
				CC	CA	AA	CC	CA	AA
Wu等 ^[8]	2002	亚洲	医院 ^a	95	102	4	83	94	19
Pharoah等 ^[9]	2002	高加索	医院	181	214	38	218	210	38
Humar等 ^[10]	2002	高加索	医院	17	26	10	40	27	3
Kuraoka等 ^[11]	2003	亚洲	医院	61	34	11	32	52	6
Park等 ^[12]	2003	亚洲	医院	186	92	14	85	55	6
Song等 ^[13]	2005	亚洲	医院	58	38	6	55	41	5
Lu等 ^[14]	2005	亚洲	人群 ^b	119	75	12	152	91	18
Medina-Franco等 ^[15]	2007	高加索	医院	15	16	8	44	30	4
Yamada等 ^[16]	2007	亚洲	医院	93	51	4	187	93	12
Zhang等 ^[17]	2008	亚洲	医院	170	62	7	228	96	19
Jenab等 ^[18]	2008	高加索	人群	119	101	25	451	408	90
Zhang等 ^[19] (Beijing)	2008	亚洲	医院	365	173	34	403	194	28
Zhang等 ^[19] (Linqu)	2008	亚洲	医院	53	38	5	123	65	8
Corso等 ^[20]	2009	高加索	医院	206	163	43	185	185	38

^a基于医院的病例对照研究; ^b基于人群的病例对照研究.

表 2 CDH1 C-160A基因多态性与胃癌易感性的Meta分析

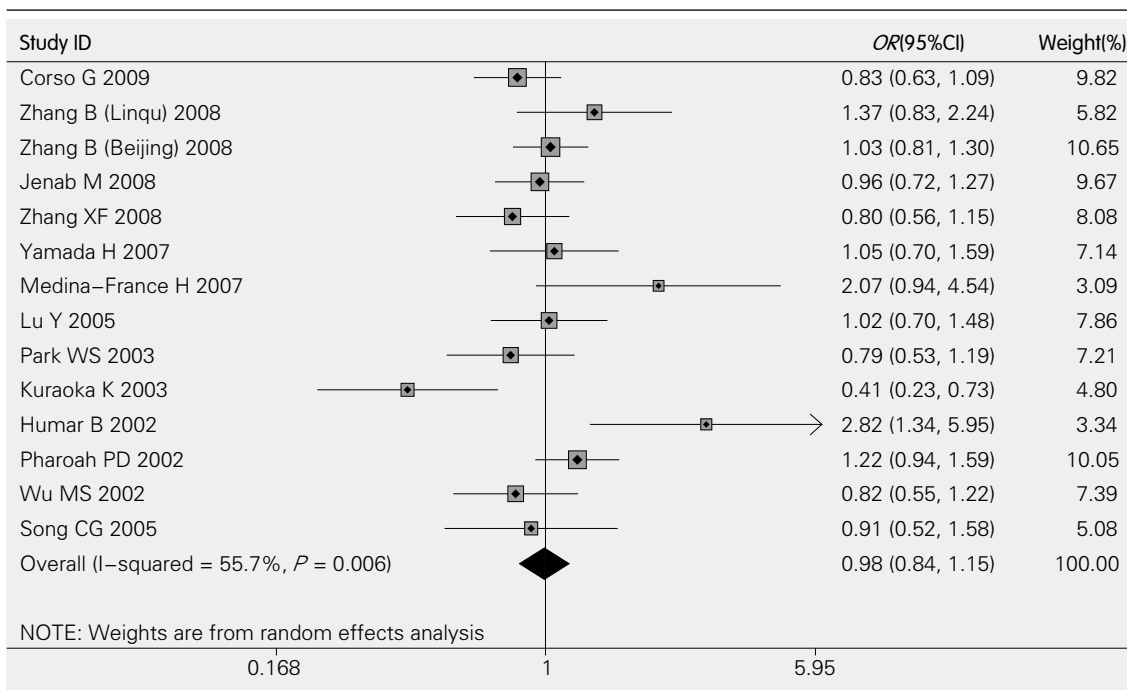


表 3 分层分析结果

人群	研究个数	分析模型	OR	95%CI	P值	χ ² 值
亚洲	9	固定效应	0.92	0.81-1.04	0.109	13.08
高加索	5	随机效应	1.21	0.88-1.67	0.007	14.10

的缺失是上皮细胞向恶性表型转化的关键步骤.

Li等^[21]在体外研究中发现CDH1 C-160A

多态性改变了基因的转录活性,其A等位基因可以使基因的转录活性下降68%.这可能致

E-cadherin表达水平降低, 从而增加上皮性肿瘤的发病风险. 近期的研究发现, CDH1 C-160A基因多态性是结肠癌和前列腺癌的危险因素^[22,23].

我们对14项研究的Meta分析结果显示, 合并OR值为0.98, 95%CI为0.84-1.15, 提示CDH1 C-160A基因多态性与胃癌的易感性无关. 对人群的分层分析显示, 虽均无统计学意义, 但CDH1 C-160A多态性在亚洲人群中降低胃癌发生的趋势, 在高加索人群中增加胃癌发生的趋势. 这种现象可能与不同人群之间的遗传背景不同有关. 另外, 胃癌的发生是个多因素、多步骤发展的过程, 可能涉及基因-基因交互作用, 基因-环境交互作用等多种因素的作用, 而这些因素可能会影响CDH1 C-160A基因多态性与胃癌的发病风险.

我们对纳入文献进行了H-W遗传平衡检验, 除其中1篇文献^[11]外其余研究均符合H-W遗传平衡定律, 而剔除该研究后, 本文结果并无明显的改变. 我们采用Begg漏斗图和Egger检验分别定性和定量地评估了发表偏倚, 提示本文并无显著的发表偏倚, 说明结论较可靠.

本研究也存在一定的局限性: (1)由于收集的资料均为在正式刊物上发表的文献, 因此不能完全排除发表偏倚的影响; (2)对照的来源大部分为医院对照, 可能存在一定的选择性偏倚; (3)由于文献提供的资料有限, 本研究未考虑到基因-基因、基因-环境的交互作用. 因此, CDH1 C-160A基因多态性与胃癌的易感性的研究有必要进一步深入, 为阐明易感基因在胃癌发病中的作用提供依据.

4 参考文献

- Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insights into the effects of Helicobacter pylori infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2713-2720
- Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci* 2005; 96: 1-6
- Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9
- González CA, Sala N, Capellá G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 100: 249-260
- Roberts-Thomson IC, Butler WJ. Polymorphism and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 793-794
- Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001; 439: 725-751
- Cattaneo F, Venesio T, Molatore S, Russo A, Fiocca R, Frattini M, Scovassi AI, Ottini L, Bertario L, Ranzani GN. Functional analysis and case-control study of -160C/A polymorphism in the E-cadherin gene promoter: association with cancer risk. *Anticancer Res* 2006; 26: 4627-4632
- Wu MS, Huang SP, Chang YT, Lin MT, Shun CT, Chang MC, Wang HP, Chen CJ, Lin JT. Association of the -160 C --> a promoter polymorphism of E-cadherin gene with gastric carcinoma risk. *Cancer* 2002; 94: 1443-1448
- Pharoah PD, Oliveira C, Machado JC, Keller G, Vogelsang H, Laux H, Becker KF, Hahn H, Paproski SM, Brown LA, Caldas C, Huntsman D. CDH1 c-160a promoter polymorphism is not associated with risk of stomach cancer. *Int J Cancer* 2002; 101: 196-197
- Humar B, Graziano F, Cascinu S, Catalano V, Ruzzo AM, Magnani M, Toro T, Burchill T, Futschik ME, Merriman T, Guilford P. Association of CDH1 haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. *Oncogene* 2002; 21: 8192-8195
- Kuraoka K, Oue N, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Nakayama H, Yasui W. Correlation of a single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter with tumorigenesis and progression of gastric carcinoma in Japan. *Int J Oncol* 2003; 23: 421-427
- Park WS, Cho YG, Park JY, Kim CJ, Lee JH, Kim HS, Lee JW, Song YH, Park CH, Park YK, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter-160 is not associated with risk of Korean gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 501-504
- Song CG, Huang CM, Liu X, Lu HS, Zhang XF, Huang W. [Association of -160(C-->A) polymorphism in CDH1 gene with gastric cancer risk in Fujian Chinese population] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2005; 22: 557-559
- Lu Y, Xu YC, Shen J, Yu RB, Niu JY, Guo JT, Hu X, Shen HB. E-cadherin gene C-160A promoter polymorphism and risk of non-cardia gastric cancer in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 56-60
- Medina-Franco H, Ramos-De la Medina A, Vizcaino G, Medina-Franco JL. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the E-cadherin gene in gastric cancer: case-control study in a young Mexican population. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2246-2249
- Yamada H, Shinmura K, Ikeda S, Tao H, Otani T, Hanaoka T, Tsuneyoshi T, Tsugane S, Sugimura H. Association between CDH1 haplotypes and gastric cancer risk in a Japanese population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1479-1485
- Zhang XF, Wang YM, Ge H, Cao YY, Chen ZF, Wen DG, Guo W, Wang N, Li Y, Zhang JH. Association of CDH1 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to esophageal squamous cell carcinomas and gastric cardia carcinomas. *Dis Esophagus* 2008; 21: 21-29
- Jenab M, McKay JD, Ferrari P, Biessy C, Laing S, Munar GM, Sala N, Peña S, Crusius JB, Overvad K, Jensen MK, Olsen A, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Bergmann MM, Trichopoulos A, Georgila C, Psaltopoulou T, Mattiello A, Vineis P, Pala V, Palli D, Tumino R, Numans ME, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Ardanaz E, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Sanchez CN, Quirós JR, Hallmans G, Stenling R, Manjer J, Régnier S, Key T, Bingham S, Khaw KT,

■同行评价

本研究选题较有意义, 设计合理, 思路清晰, 数据可靠, 统计分析方法适当, 结果分析较透彻, 对人群胃癌危险度评估和防治提供了有意义的结果.

- Slimani N, Rinaldi S, Boffetta P, Carneiro F, Riboli E, Gonzalez C. CDH1 gene polymorphisms, smoking, Helicobacter pylori infection and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Eur J Cancer* 2008; 44: 774-780
- 19 Zhang B, Pan K, Liu Z, Zhou J, Gu L, Ji J, Ma J, You WC, Deng D. Genetic polymorphisms of the E-cadherin promoter and risk of sporadic gastric carcinoma in Chinese populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2402-2408
- 20 Corso G, Berardi A, Marrelli D, Pedrazzani C, Garosi L, Pinto E, Roviello F. CDH1 C-160A promoter polymorphism and gastric cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 2009; 18: 46-49
- 21 Li LC, Chui RM, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au HC, Nojima D, Carroll P, Dahiya R. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res* 2000; 60: 873-876
- 22 Pittman AM, Twiss P, Broderick P, Lubbe S, Chandler I, Penegar S, Houlston RS. The CDH1-160C>A polymorphism is a risk factor for colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 1622-1625
- 23 Qiu LX, Li RT, Zhang JB, Zhong WZ, Bai JL, Liu BR, Zheng MH, Qian XP. The E-cadherin (CDH1)-160 C/A polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 244-249

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如 $37.6\text{ }^\circ\text{C} \pm 1.2\text{ }^\circ\text{C}$, $45.6\text{ 岁} \pm 24\text{ 岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$. $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素 B_1 、维生素 B_2 、维生素 B_6 、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素 B_{12} 用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

APE1 D148E、PARP1 V762A、XRCC1 R399Q的多态性与结直肠癌的易患性

叶慈慈, 黄智铭, 周春燕

叶慈慈, 黄智铭, 周春燕, 温州医学院附属第一医院消化内科 浙江省温州市 325000

作者贡献分布: 此课题由黄智铭与叶慈慈设计; 研究过程由叶慈慈与周春燕操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由黄智铭提供; 数据分析与论文写作由叶慈慈完成。

通讯作者: 黄智铭, 教授, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一医院消化内科. eunice.ycc@gmail.com
电话: 0577-88839324

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-02-26

接受日期: 2010-03-02 在线出版日期: 2010-04-28

APE1 D148E, PARP1 V762A and XRCC1 R399Q polymorphisms and genetic susceptibility to colorectal cancer

Ci-Ci Ye, Zhi-Ming Huang, Chun-Yan Zhou

Ci-Ci Ye, Zhi-Ming Huang, Chun-Yan Zhou, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Professor Zhi-Ming Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. eunice.ycc@gmail.com

Received: 2010-01-07 Revised: 2010-02-26

Accepted: 2010-03-02 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To evaluate the possible effects of APE1 D148E, PARP1 V762A and XRCC1 R399Q single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the risk of colorectal cancer (CRC).

METHODS: The APE1 D148E, PARP1 V762A and XRCC1 R399Q polymorphisms were analyzed in 123 patients with primary CRC and in 158 healthy controls using the matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) method. After matching for potential confounding variables, the genotypes of each SNP site and combined genotypes of all included SNP sites were compared between case and control groups by the chi-square test.

RESULTS: All three SNPs detected in the study

met the Hardy-Weinberg equilibrium. Only the frequency of XRCC1 R399Q GA/AA genotype was statistically higher in the case group than in the control group [odds ratio (OR): 1.633; 95% confidence interval: 1.011-2.640; $P = 0.045$]. APE1 D148E and PARP1 V762A polymorphisms did not yield any significant effects on the risk of CRC ($P > 0.05$). The combined genotype APE1 (V)-PARP1 (W)-XRCC1 (V) conferred a 2.604-fold increased risk of CRC compared with all other combined genotypes (95% confidence interval: 1.066-6.361; $P = 0.031$). No other combined genotypes yielded any significant effects on the risk of CRC.

CONCLUSION: XRCC1 R399Q GA/AA genotype may be a risk factor for CRC. There might be interactions among the SNPs of excision repair genes. APE1 (V)-PARP1 (W)-XRCC1 (V) carriers may have a higher risk of CRC.

Key Words: DNA repair gene; Colorectal cancer; Single nucleotide polymorphism; Base excision repair

Ye CC, Huang ZM, Zhou CY. APE1 D148E, PARP1 V762A and XRCC1 R399Q polymorphisms and genetic susceptibility to colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1275-1279

摘要

目的: 探讨APE1 D148E、PARP1 V762A及XRCC1 R399Q的碱基切除修复基因单核苷酸多态位点对结直肠癌发病风险的修饰作用。

方法: 选取158例健康对照与123例原发性结直肠癌患者, 提取外周血基因组DNA, 用基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术对SNP位点进行基因分型, 在各混杂因素配比下, 采用 χ^2 检验比较病例组与对照组中各SNP的基因型分布差异以及多SNP的联合基因型分布差异, 从而分析他们对结直肠癌发病风险的修饰程度OR值。

结果: 3个SNP在本研究中均符合Hardy-

背景资料

在结直肠癌高风险家族中已经发现一小群基因高外显度的突变与该病有确定关系。然而, 对散发性结直肠癌的认识有限得多, 直到近年有了多中心协作的基因组研究, 在共同表型背后的复杂基因结构才得以揭示。DNA修复基因曾被假设亦经实验证明其变异与肿瘤有关。人群中的多态性研究将进一步验证这些基因的变异与结直肠癌发病的关系。

同行评议者

杜祥, 教授, 复旦大学附属肿瘤医院病理科

■ 研究前沿

国外以不同人群为对象的多项研究提示, DNA修复基因对人群的结肠直肠癌发病影响结果不甚一致, 而其多态与该疾病关系的研究在国内多为尝试性研究, 尚需大规模的验证。

Weinberg平衡, 其中只有XRCC1 R399Q的GA/AA变异(V)型与结肠直肠癌发病有正相关性, *OR*值为1.633(95%CI: 1.011-2.640, *P* = 0.045); 而APE1 D148E、PARP1 V762A的SNP变异单独对结肠直肠癌风险未见明显影响(*P* > 0.05)。联合基因型在两组比较显示, 携带APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)者, 结肠直肠癌发病风险是其他联合基因型携带者的2.604倍(95%CI: 1.066-6.361, *P* = 0.031); 而其他联合基因型对结肠直肠癌风险的修饰作用则不明显。

结论: XRCC1 rs25487的GA/AA变异型是结肠直肠癌的危险因素; BER和SNP存在交互作用; 携带联合基因型APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)者患结肠直肠癌的风险可能较高。

关键词: DNA修复基因; 结肠直肠癌; 单核苷酸多态; 碱基切除修复

叶慈慈, 黄智铭, 周春燕. APE1 D148E、PARP1 V762A、XRCC1 R399Q的多态性与结肠直肠癌的易感性. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1275-1279
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1275.asp>

0 引言

肿瘤是一种复杂的多因素疾病. 传统的致癌机制假说中, 在个体遗传易感背景下, 各种暴露因素直接或间接作用于人体, 在机体内代谢为遗传毒性因子后, 损害DNA等遗传物质, 使细胞增殖、分化、死亡的过程发生改变. 一旦细胞增殖失控, 即发展为肿瘤. 在这一过程中, DNA修复扮演着维护遗传物质完整性的重要角色, 其有效执行有赖于一群功能活跃的DNA修复蛋白, DNA修复缺陷在肿瘤包括结肠直肠癌发病中的作用已成为研究热点^[1].

DNA修复能力在个体间有相当大的差异. 证据显示, DNA修复能力较弱者, 肿瘤风险较高^[2-4]. DNA修复基因的多态性则可能导致这种个体间DNA修复能力的强弱差异^[5]. 碱基切除修复(base excision repair, BER)途径是一条重要的DNA修复途径^[6]. 本研究选取此通路上APE1 D148E、PARP1 V762A、XRCC1 R399Q等3个热门单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点, 以探求其多态性是否可修饰结肠直肠癌的易感性.

1 材料和方法

1.1 材料 本组为2009-01/2009-07在本院收治的123例结肠直肠癌患者, 其中男78例, 女45例, 年龄

29-81(平均60.9±11.1)岁. 对照组为158名为同一时间在本院体检的健康成人. 病例组与对照组的性别、民族、籍贯分布相似, 无血缘关系.

1.2 方法

1.2.1 纳入和排除标准: (1)病例组对象纳入标准包括: 汉族; 组织病理学诊断为原发性结肠直肠癌; 未经放疗、化疗等治疗; (2)剔除标准为家族性腺瘤性息肉病和遗传性非腺瘤性结肠直肠癌、有其他肿瘤病史者. 现吸烟或曾吸烟每天5支以上并持续1年或以上者定义为吸烟个体. 现在或曾经有每周酒精摄入30 g以上(按各种酒的酒精度折算)的饮酒习惯者持续1年或以上定义为饮酒个体. 以问卷调查和病历记录方法取得所有研究对象的有关资料.

1.2.2 DNA提取: 病例组与对照组各取静脉血1-2 mL置EDTA-Na₂抗凝管. 4 °C保存, 1 wk内按Fermentas试剂盒法提取全血基因组DNA, 经紫外光检测, 留取合格DNA标本(纯度A_{260/280}为1.6-1.8, 浓度≥10 mg/L)用于后续SNP位点检测.

1.2.3 SNP分型: 采用美国Sequenom公司的MassARRAY™ Analyzer技术平台进行SNP检测. PCR引物和单碱基延伸引物均由Assay Designer (Sequenom)软件包设计. 引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成. 所有DNA样本稀释到5 mg/L后, 取1 μL, 将其与0.95 μL水、0.625 μL PCR缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂)、1 μL的2.5 mmol/L dNTP、0.325 μL的25 mmol/L MgCl₂、1 μL PCR引物以及0.1 μL HotStar Taq酶(Qiagen)混合在一起. PCR反应条件: 94 °C, 15 min; 94 °C, 20 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 共45个循环; 最终72 °C 3 min. PCR扩增后, 剩余的dNTP将被去磷酸消化掉, 反应体系包括1.53 μL水、0.17 μL SAP缓冲液、0.3 U碱性磷酸酶. 该反应在37 °C进行40 min, 然后85 °C, 5 min使酶失活. 碱性磷酸酶处理后, 针对SNP的单碱基延伸引物在下列反应体系中进行: 0.755 μL水、0.2 μL 10×iPLEX缓冲液、0.2 μL终止混合物、0.041 μL iPLEX酶、0.804 μL的10 μmol/L延伸引物. 单碱基延伸反应在下列条件下进行: 94 °C, 30 s; 94 °C, 5 s; 52 °C, 5 s; 80 °C, 5 s; 5个循环, 共40个循环; 最后72 °C, 3 min. 在终止反应物中加入6 mg阳离子交换树脂脱盐, 混合后加入25 μL水悬浮. 使用MassARRAY Nanodispenser将最终的分型产物点样到一块384孔的spectroCHIP (Sequenom)上, 并用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪进行分析. 最终结果由MassARRAY

表 1 各SNP对CRC风险的独立影响

SNP ID	基因型V/W	对照组F(%)	病例组F(%)	OR值(95%CI)	P值
APE1	GT/GG	106(67.1)	86(69.9)	1.140(0.686-1.896)	0.613
D148E(rs1130409)	TT	52(32.9)	37(30.1)	1.000	
PARP1	TC/CC	105(66.9)	82(67.2)	1.021(0.612-1.683)	0.953
V762A(rs1136410)	TT	52(33.1)	40(32.8)	1.000	
XRCC1	GA/AA	57(36.1)	59(48.0)	1.633(1.011-2.640)	0.045
R399Q(rs25487)	GG	101(63.9)	64(52.0)	1.000	

F: Frequency, 即频数.

■应用要点

本文探讨了APE1 D148E、PARP1 V762A、XRCC1 R399Q三个SNP与结直肠癌遗传易感性的相关性, 研究结论对既往的相关性研究内容有新的补充和新的见解.

表 2 联合基因型对CRC风险的修饰作用

联合基因型	Y/N	病例组F	对照组F	OR值(95%CI)	P值
APE1(V)-PARP1(V)-XRCC1(V)	Y	27	26	1.428(0.784-2.600)	0.243
	N	96	132	1.000	
APE1(V)-PARP1(V)-XRCC1(W)	Y	31	43	0.901(0.527-1.542)	0.704
	N	92	115	1.000	
APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)	Y	15	8	2.604(1.066-6.361)	0.031
	N	108	150	1.000	
APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(W)	Y	13	28	0.549(0.271-1.111)	0.092
	N	110	130	1.000	
APE1(W)-PARP1(V)-XRCC1(V)	Y	12	18	0.771(0.357-1.666)	0.508
	N	121	140	1.000	
APE1(W)-PARP1(V)-XRCC1(W)	Y	12	18	0.771(0.357-1.666)	0.508
	N	121	140	1.000	
APE1(W)-PARP1(W)-XRCC1(V)	Y	5	5	1.297(0.367-4.583)	0.686
	N	118	153	1.000	
APE1(W)-PARP1(W)-XRCC1(W)	Y	7	11	0.806(0.303-2.145)	0.666
	N	116	147	1.000	

以是否携带某联合基因型为因素分组, 记为Y/N, 比较Y与N各自的频数在对照与病例中的分布, 理论上可反映携带该联合基因型相较于不携带该联合基因型, CRC风险的增加程度.

RT软件系统(版本号3.0.0.4)实时读取, 并由MassARRAY Typer软件系统(版本号3.4)完成基因分型分析. 10%的样本接受重复检测, 以验证检测的准确度.

统计学处理 采用SPSS11.5版软件包进行. 经 χ^2 检验比较病例组与对照组的基因型频率的观察值与预期值, 对各SNP进行Hardy-Weinberg平衡分析. 病例组与对照组的性别、吸烟、饮酒和体块指数等群体属性及各SNP的等位基因频率及基因型分布以哑变量法赋值进行比较, 采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 群体特征 病例组和对照组人群的性别、吸烟、饮酒和体块指数等构成无显著差异($P > 0.05$).

Hardy-Weinberg平衡检验结果显示: APE1 D148E(rs1130409)、PARP1 V762A(rs1136410)、XRCC1 R399Q(rs25487)3个位点的基因型在对照人群中分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$).

2.2 SNP与CRC的关联性 APE1 D148E、PARP1 V762A在病例组与对照组中基因型分布差异没有统计学意义, 唯独XRCC1 R399Q的变异型相较其野生型可增加CRC风险, OR值为1.633(95%CI: 1.011-2.640, $P < 0.05$, 表1).

2.3 联合基因型对CRC的风险预测 携带APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)者, 结直肠癌发病风险是其他联合基因型携带者的2.604倍(95%CI: 1.067-6.36, $P = 0.031$, 表2); 而其他联合基因型对结直肠癌风险的修饰作用则不明显($P > 0.05$).

■同行评价

本研究设计严谨,方法全面,结果可靠,有参考价值。

3 讨论

肠上皮细胞是不稳定细胞,极易受到各种有毒物质的刺激造成DNA损伤,后者若得不到及时修复,突变积累易发生恶性转化。在这一过程中,DNA修复系统扮演着维护DNA完整性的重要角色。DNA修复基因与结直肠癌的发生潜在某些联系^[4]。

基因的多态性可影响基因转录效率、mRNA稳定性,或相应蛋白的表达量与活性。多态性基因的某等位基因可能与一些疾病的易感性和严重性有关。由此,DNA修复基因在普通群体中的变异或突变可影响DNA修复能力,从而修饰结直肠癌在人群的发病风险。APE1、PARP1、XRCC1是BER通路上的3个重要基因,目前研究发现,他们的表达异常与多种肿瘤相关,如黑色素瘤、慢性粒细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、星形细胞瘤和食管癌^[7]。本研究发现,在3个目的SNP中,唯独XRCC1 R399Q变异型与CRC风险增高呈统计学显著的正相关,*OR*值为1.633,其余SNP变异单独对CRC风险均未见修饰作用。

XRCC1的主要功能是作为分子支架招募其他修复蛋白,执行DNA单链断裂处碱基的切除修复^[8]。XRCC1基因上位于第28 152个核苷酸的G→A变异使该蛋白BRCT-1域399位氨基酸发生Arg(R)→Gln(Q)的改变,而BRCT-1域是其与PARP1结合的部位。功能学研究证实,XRCC1 399R→Q的替代导致BRCT-1域多处构象显著改变,因此可影响BER功能,从而可能影响个体对癌症的易感性^[9]。Shen等认为携带XRCC1 R399Q的变异基因型GA/AA可提高胃癌发病危险达1.53倍^[10],该结果与本次对CRC的研究结果有相似性。但Kasahara等研究发现XRCC1 R399与CRC无明显相关性^[8]。

APE1的功能是在碱基缺口处DNA单链上进行切割,PARP1则是一重要的酶,可暂时性结合于DNA单链断裂处,起到保护与招募其他修复蛋白的作用^[11]。有大规模的荟萃分析显示,APE1 D148的GT/GG基因型与多种肿瘤有微弱的正相关性,*OR*值为1.08,提示变异型APE1 D148E是低外显度的肿瘤易感基因^[12],本研究显示,APE1 D148E的GT/GG基因型*OR*值为1.14,*P*>0.05,加大样本量可能会有更显著的统计学意义。至于PARP1 V762A,尚无他与CRC关联研究的报道,但在一项肺癌研究中显示其纯合变异型与肺癌正相关^[13]。本研究中这两个SNP在CRC

病例组与对照组中基因型分布差异没有统计学意义,可能是低外显度的易感基因,亦可能对CRC风险无修饰作用。

族群不同,遗传背景、生活方式以及致癌物接触等情况不同,都可能造成这些基因的SNP与CRC关联分析结果迥异。由于肿瘤是多因素疾病,近年SNP研究多倾向于采用高通量基因分型,分析出联合基因或基因环境因素叠加模型来预测肿瘤风险。笔者也在单个SNP对CRC影响分析的基础上尝试联合基因型与CRC的关联分析。每个SNP有野生(W)和变异(V)两种基因型,携带APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)者,结直肠癌发病风险是其他联合基因型携带者的2.604倍;而其他联合基因型对结直肠癌风险的修饰作用则不明显。仅从*OR*值来看,风险值最明显增高的并非APE1(V)-PARP1(V)-XRCC1(V)组,而是APE1(V)-PARP1(W)-XRCC1(V)组。这些结果提示,基因之间存在明显的交互作用,显然,同一条BER通路,他们所编码的蛋白之间本来就有内在复杂的联系,因此实验的结果似乎合理。本研究初步用频数比较法,探讨联合基因型与CRC风险的相关性,有研究用多因子降维法比较出预测肿瘤风险最佳的危险因子组合^[14],本研究的样本量还偏小,可能存在着一定的选择偏倚,如进一步扩大样本量,可进一步做此分析,研究意义将更大。

总之,CRC是最有预防潜能的肿瘤之一,他在普通大龄人群的筛查已被美国癌症协会2008新指南^[15]推荐。然而,如能找到有效的肿瘤预测风险模型并在高危人群中重点筛查,无疑可节约医疗资源,对肿瘤的防治固然是有裨益的。

4 参考文献

- 1 Silva SN, Tomar M, Paulo C, Gomes BC, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, Gaspar JF. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 85-92
- 2 Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 874-897
- 3 Wu X, Zhao H, Suk R, Christiani DC. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6500-6523
- 4 Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 689-698
- 5 Mohrenweiser HW, Wilson DM 3rd, Jones IM. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated

- with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res* 2003; 526: 93-125
- 6 Baute J, Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2008; 43: 239-276
- 7 Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, Somma P, Mascolo M, Argenziano G, Scalvenzi M, Salvatore G, Fabbrocini G, Molea G, Bianco AR, Carlomagno C, De Rosa G. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol* 2005; 36: 724-731
- 8 Kasahara M, Osawa K, Yoshida K, Miyaishi A, Osawa Y, Inoue N, Tsutou A, Tabuchi Y, Tanaka K, Yamamoto M, Shimada E, Takahashi J. Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 49
- 9 Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein. *Protein J* 2007; 26: 541-546
- 10 Shen H, Xu Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2000; 88: 601-606
- 11 Matsumoto Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 68: 129-138
- 12 Gu D, Wang M, Wang M, Zhang Z, Chen J. The DNA repair gene APE1 T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. *Mutagenesis* 2009; 24: 507-512
- 13 Zhang X, Miao X, Liang G, Hao B, Wang Y, Tan W, Li Y, Guo Y, He F, Wei Q, Lin D. Polymorphisms in DNA base excision repair genes ADPRT and XRCC1 and risk of lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 722-726
- 14 Huang M, Dinney CP, Lin X, Lin J, Grossman HB, Wu X. High-order interactions among genetic variants in DNA base excision repair pathway genes and smoking in bladder cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 84-91
- 15 Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134: 1570-1595

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, 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_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

直肠后囊肿23例

段小亮, 李晓霞, 李鑫

■背景资料

直肠后囊肿临床较为少见, 位置较深、周围毗邻关系复杂, 不易早期发现, 且手术难度较大。为提高对此类疾病的认识, 本文将本院病例临床特点及处理体会总结报告, 供同仁参考。

段小亮, 李晓霞, 李鑫, 中国医科大学附属第四医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110032

作者贡献分布: 段小亮、李晓霞及李鑫对本文所作贡献均等; 此课题由李晓霞与段小亮共同设计; 研究过程由李晓霞与段小亮操作完成; 数据分析由段小亮与李鑫完成; 本论文写作由段小亮、李晓霞及李鑫共同完成。

通讯作者: 李晓霞, 教授, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院胃肠外科. lxx555999@yahoo.com.cn

电话: 024-62043191

收稿日期: 2009-09-29 修回日期: 2010-02-26

接受日期: 2010-03-09 在线出版日期: 2010-04-28

Diagnosis and treatment of retrorectal cyst: a report of 23 cases

Xiao-Liang Duan, Xiao-Xia Li, Xin Li

Xiao-Liang Duan, Xiao-Xia Li, Xin Li, Department of Gastrointestinal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Xia Li, Department of Gastrointestinal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. lxx555999@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-29 Revised: 2010-02-26

Accepted: 2010-03-09 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To explore the clinical characteristics, diagnosis and therapy of retrorectal cyst.

METHODS: The clinical data for 23 patients with retrorectal cyst treated at our hospital from September 1995 to July 2007 were retrospectively analyzed.

RESULTS: Of all patients, 17 presented varying degrees of symptoms of oppression, and 6 were asymptomatic on routine anal examination or ultrasound examination; 13 were treated via a single abdominal approach, 6 via a single posterior approach, and 4 via a combination of the abdominal and posterior approaches; 19 underwent total cyst resection, and 4 underwent partial resection; 4 had massive bleeding, and 3 had rectal injury during operation. None of them died during operation.

CONCLUSION: Digital rectal examination and

imaging examination are important for the diagnosis of retrorectal cyst and the choice of surgical approach. Adequate preoperative preparation and suitable surgical approach is essential for successful surgery.

Key Words: Retrorectal cyst; Diagnosis; Surgical treatment

Duan XL, Li XX, Li X. Diagnosis and treatment of retrorectal cyst: a report of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1280-1283

摘要

目的: 探讨直肠后囊肿的临床特点及外科治疗方法。

方法: 对1995-09/2007-07我院收治的23位患者的临床资料进行回顾性分析。

结果: 17例患者均有不同程度的压迫症状, 6例患者无明显症状, 经盆腔彩超或肛诊发现; 经腹部进路手术13例, 经骶尾部入路6例, 腹骶联合入路手术4例。囊肿完整切除者19例, 部分切除者4例; 术中大出血4例, 直肠损伤3例; 手术均获成功, 无死亡病例。

结论: 直肠指诊及影像学检查对直肠后囊肿的诊断及手术入路选择有重要意义; 充分的术前准备及合适的手术入路是手术成功的重要条件。

关键词: 直肠后囊肿; 诊断; 外科治疗

段小亮, 李晓霞, 李鑫. 直肠后囊肿23例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1280-1283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1280.asp>

0 引言

直肠后囊肿临床较为少见, 早期多无明显症状, 常因肿物逐渐增大出现局部压迫症状或相关并发症而就诊。我院1995-09/2007-07共收治直肠后囊肿23例, 现结合文献分析, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者23例, 女20例, 男3例, 年龄

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

8-70(平均39±11)岁, 25-45岁占73.9%(17/23), 病程1 mo至20年不等. 其中囊肿手术复发2例, 复发时间分别为6 mo、2年. 首诊17例有不同程度临近脏器压迫症状(排便、排尿困难、骶尾部或肛门胀痛), 其中3例伴有阴道流血, 1例伴双下肢麻木; 体检发现无明显症状6例(26.1%). 直肠指诊提示直肠后壁外肿物16例, 检出率94.1%(16/17); 彩超检查19例, CT检查16例, MRI检查6例, 均提示盆腔囊性占位性病变, 其中3例CT检查提示肿物临近结构呈受压推移改变.

1.2 方法 本组23例均行手术治疗. 全部患者术前均行肠道准备, 手术经腹部进路者13例, 经骶尾部入路者6例, 经腹骶联合入路者4例.

2 结果

术中见囊肿大小2-21 cm不等, 23例中行囊肿刺破减压12例, 囊肿完整切除者19例, 部分切除者4例, 残余囊肿壁以石碳酸烧灼. 直肠损伤3例, 修补后行预防性乙状结肠造瘘2例, 1例因为复发行二次手术且囊肿与直肠粘连较多, 分离面较大, 行预防性回肠造瘘, 此3例分别于术后3-6 mo行乙状结肠还漏术、回肠还瘘术, 术后排便功能恢复良好; 术中出血>800 mL者5例, 2例行髂内动脉结扎、3例行纱垫填塞压迫. 手术均获成功, 无死亡病例, 术后并发短期排尿障碍1例, 余无手术并发症出现. 术后病理回报骶尾部皮样囊肿9例, 表皮样囊肿11例, 浆液性囊肿1例, 尾肠囊肿2例. 随访14例, 随访时间1.5-11年, 其中表皮样囊肿5例, 表皮样囊肿8例, 尾肠囊肿1例; 其中2例表皮样囊肿及1例皮样囊肿分别与术后1年、3年及1.5年囊肿复发, 经再次手术治疗后治愈; 其余随访病例未发现复发或恶变(图1, 2).

3 讨论

直肠后间隙为直肠与骶骨之间潜在的间隙, 其上界为腹膜反折, 下界为肛提肌和尾骨肌, 两侧为输尿管及髂血管. 此间隙的肿物可起源于不同的组织和器官, 分为先天性、神经源性、炎症性、骨性或混合性, 其中55%-70%起源于先天残留组织^[1]. 常见先天性肿瘤包括发育性囊肿、脊索瘤、畸胎瘤和脊膜膨出等. 发育性囊肿为该间隙中最常见的良性肿瘤, 据囊肿的来源与组织病理学可分为表皮样囊肿、皮样囊肿、肠源性囊肿(包括尾肠囊肿、囊性直肠重叠), 神经管原肠囊肿. 直肠后囊肿恶变较少, 主要见于肠源性囊肿(包括尾肠囊肿、囊性直肠

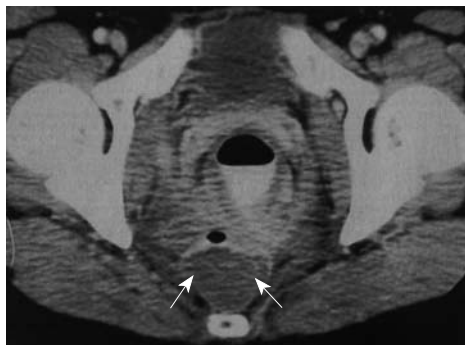


图1 直肠后囊肿CT显像. 箭头所示囊肿为单腔, 占据直肠后间隙.

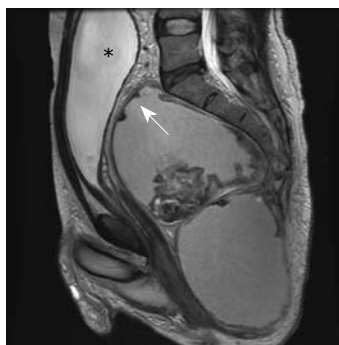


图2 直肠后囊肿MRI成像. 箭头所示巨大囊肿压迫直肠.

重叠), 约7%会恶变为类癌或腺癌^[2,3]. Liang等^[4]报道尾肠囊肿的上皮细胞与类癌瘤细胞均对雌激素受体表现强阳性, 认为雌激素可能在发生恶变的过程中起重要作用. 直肠后囊肿临床较为少见, 可发生在任何年龄, 以中年女性多见^[5], 本组病例女性占87.0%(20/23). 下面就直肠后囊肿的诊断和外科治疗的问题作初步讨论. (1)诊断: 直肠后囊肿的临床症状随囊肿位置、大小、是否并发感染以及临近器官受压或累及的程度有关, 直肠后囊肿约50%无症状^[6], 多经彩超或指诊发现. 本组26.1%患者体检未发现明显症状, 表明体检时行盆腔彩超或肛诊可利于本病的早期诊断及治疗. 囊肿逐渐发展可压迫临近器官出现症状如便秘, 排便排尿困难, 下腹痛、骶尾部疼痛等^[7]; 本组病例中有74.9%(17/23)因出现压迫症状而就诊. 直肠指诊是最简便易行、无创伤、阳性率高的检查方法. 文献报道约90%的直肠后肿物可通过直肠指诊发现, 本组指诊检出率为94.1%, 且可通过指检初步判断肿物的部位、性质(囊性、囊实性)与骶骨、直肠的关系. 此外, 如囊肿感染破溃可经指诊触及异常隐窝或窦道. (2)辅助检查: 影像学检查对直肠后囊肿的诊断与手术路径选择至关重要^[8,9]. B超检查具有简便快速、廉价实用、阳性率高的优点, 可明确肿物性质(囊或实性)、大小与

■**研发前沿**
骶前直肠肿瘤的
诊断与治疗仍面
临挑战, 各种影像
学检查可为手术
切除提供帮助, 但
不能明确诊断.

■创新盘点

本文将影像学与临床诊断探讨,为进一步明确诊断提供依据。

周围脏器关系等。本组19例经B超检查均发现盆腔或直肠后区囊性肿物。在对囊肿行精确定位与明确其累及周围脏器、血管、输尿管程度方面,CT、MRI有非常重要的价值^[10]。Yang等^[11]认为MRI在判断囊肿组织学类型方面优于CT,若MRI显示囊肿多房或一个囊肿周围伴随小囊肿应该考虑尾肠囊肿。骨盆X片若显示骶尾部骨质缺损常提示囊肿为皮样囊肿、尾肠囊肿、或神经管源囊肿^[12]。此外,钡剂灌肠和泌尿系造影有助于了解直肠、乙状结肠、膀胱、输尿管受压移位情况,便于术前采取相应措施以防术中损伤上述器官。(3)外科治疗:由于直肠后囊肿位置特殊,且可逐渐增大压迫临近器官,故完整的外科切除是其首选治疗方法^[13]。术前行肠道准备,备取充足的血源,必要时放置一侧或双侧输尿管导管,以防邻近器官损伤及其所引起的并发症。手术途径的选择,主要根据肿瘤的部位、大小及手术难度的估计决定。(1)一般认为位于第4骶椎下方的小型囊肿(<8 cm)选择经由骶尾部入路切除较为合适,本组经骶尾入路6例,均采用倒“V”切口,术野暴露满意,囊肿与骶尾部粘连紧密者切除粘连的骶骨(必要时切除第4-5骶骨),术中常需手指放入直肠作指引防止直肠损伤。(2)对于囊肿较大,位于第4尾椎上方选择经腹路径较为适宜,可以充分暴露并探查腹腔及骨盆上段,辨认重要脏器、血管、神经及输尿管,避免副损伤,此入路对于血运丰富的囊肿,较利于髂内动脉的暂时阻断或结扎,对正确估计肿瘤切除难度有一定价值。本组13例采用经腹入路,囊肿均得以顺利切除。(3)对于囊肿较大、位置较深或复发性囊肿,可选择腹骶尾部联合进路,先经腹部探查分离囊肿,后改侧卧位联合骶尾部切口完成手术。本组4例囊肿较大者(d>15 cm)循此入路,手术顺利。

对于囊肿较大,位置较深,切除有困难时可先行囊肿刺破减压,减小囊肿体积,这样既可防止囊肿破溃污染术野,又有利于其与周围组织分离和摘除。本组11例患者循此原则,均顺利完整切除。手术完整切除囊肿、避免囊壁残留是减少术后复发的关键,若无法完整切除者可行石碳酸烧灼或电凝适当烧灼。本组3例因肿物与直肠关系密切,将大部分囊壁切除后用石碳酸烧灼残壁,术后恢复良好。

直肠后囊肿手术切除最危险的并发症是术中大出血和副损伤,如处理不当,可造成严重后果。术中出血多因直肠后血管损伤出血或创面

渗血。我们的体会是:(1)锐性分离囊肿,避免钳夹髂骨面;(2)囊肿与血管关系不明确时,主动减压后切除部分囊肿充分暴露视野,再行切除残余囊壁;(3)对创面渗血行凡士林、油纱垫填压止血,效果良好;(4)对髂血管损伤出血止血困难时,可暂时阻断髂总动脉利于寻找出血点,或结扎同侧髂内动脉。本组术中大出血5例,循此法均获成功。术中直肠、输尿管、骶丛神经损伤也为手术严重并发症,充分术前准备,如输尿管置留双“J”管对于术中辨认直肠与输尿管有很大帮助;(5)充分的肠道准备,可为直肠损伤后行预防性造瘘提供条件;(6)处理盆腔深处时定要紧靠囊肿,避免损伤骶丛神经。我们认为直肠后间隙局部结构复杂,位置较深,手术容易出现大出血、输尿管、神经损伤或直肠、肛门括约肌损伤等严重并发症,故直肠后囊肿手术需要对盆腔解剖熟悉的、有经验的医生操作。

4 参考文献

- Zoller S, Joos A, Dinter D, Back W, Horisberger K, Post S, Palma P. Retrorectal tumors: excision by transanal endoscopic microsurgery. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 547-550
- Gunkova P, Martinek L, Dostalík J, Gunka I, Vavra P, Mazur M. Laparoscopic approach to retrorectal cyst. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6581-6583
- Tampi C, Lotwala V, Lakdawala M, Coelho K. Retrorectal cyst hamartoma (tailgut cyst) with malignant transformation. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 266-268
- Liang JJ, Alrawi S, Fuller GN, Tan D. Carcinoid tumors arising in tailgut cysts may be associated with estrogen receptor status: case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 539-543
- Killingsworth C, Gadacz TR. Tailgut cyst (retrorectal cystic hamartoma): report of a case and review of the literature. *Am Surg* 2005; 71: 666-673
- Jang SH, Jang KS, Song YS, Min KW, Han HX, Lee KG, Paik SS. Unusual prerectal location of a tailgut cyst: a case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5081-5083
- Krivokapic Z, Dimitrijevic I, Barisic G, Markovic V, Krstic M. Adenosquamous carcinoma arising within a retrorectal tailgut cyst: report of a case. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6225-6227
- Chen ML, Su JM, Cheng YM, Chou CY, Kuo PL. Presacral epidermoid cyst with right hydronephrosis. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45: 155-158
- 刘金林. 成人骶前囊肿的临床特点及外科处理. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 749-750
- Au E, Anderson O, Morgan B, Alarcon L, George ML. Tailgut cysts: report of two cases. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 345-350
- Yang DM, Park CH, Jin W, Chang SK, Kim JE, Choi SJ, Jung DH. Tailgut cyst: MRI evaluation. *AJR Am J*

12 *Roentgenol* 2005; 184: 1519-1523
 Dahan H, Arrivé L, Wendum D, Docou le Pointe H, Djouhri H, Tubiana JM. Retrorectal developmental cysts in adults: clinical and radiologic-histopathologic review, differential diagnosis, and

13 treatment. *Radiographics* 2001; 21: 575-584
 Menteş BB, Kurukahvecioğlu O, Ege B, Karamercan A, Leventoğlu S, Yazicioğlu O, Oğuz M. Retrorectal tumors: a case series. *Turk J Gastroenterol* 2008; 19: 40-44

■同行评价
 本研究选题先进, 手术方法叙述全面, 有临床实用性。

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 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	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病学杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

胃癌伴黑棘皮病1例

何立丽, 张培彤, 孙桂芝

■背景资料

恶性黑棘皮病是指并发体内恶性肿瘤的皮肤损害, 是一种少见的副瘤性皮肤病。恶性肿瘤大多数为腺癌, 其中胃癌最多见。

何立丽, 张培彤, 孙桂芝, 中国中医科学院广安门医院肿瘤科 北京市 100053

通讯作者: 张培彤, 主任医师, 100053, 北京市, 中国中医科学院广安门医院肿瘤科, zhangpeitong@sohu.com

电话: 010-88001192

收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-03-08

接受日期: 2010-03-08 在线出版日期: 2010-04-28

Gastric carcinoma with acanthosis nigricans: a report of one case

Li-Li He, Pei-Tong Zhang, Gui-Zhi Sun

Li-Li He, Pei-Tong Zhang, Gui-Zhi Sun, Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Correspondence to: Pei-Tong Zhang, Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China. zhangpeitong@sohu.com

Received: 2009-12-17 Revised: 2010-03-08

Accepted: 2010-03-08 Published online: 2010-04-28

Abstract

We report a case of acanthosis nigricans associated with gastric adenocarcinoma with liver metastasis in the present study. Furthermore, we analyzed 71 cases of acanthosis nigricans reported in China and explored the relationship between acanthosis nigricans and internal organ diseases. We found that skin symptoms might be signs of the presence of malignant tumors. Malignant acanthosis nigricans is a rare paraneoplastic dermatosis. The neoplasms associated with malignant acanthosis nigricans are typically aggressive in nature, mandating an extensive search for the underlying malignancy once the diagnosis of malignant acanthosis nigricans is suspected.

Key Words: Acanthosis nigricans; Gastric carcinoma; Prognosis

He LL, Zhang PT, Sun GZ. Gastric carcinoma with acanthosis nigricans: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1284-1286

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

摘要

本文报道黑棘皮病伴发胃中分化腺癌、肝转

移1例, 并结合国内已报道的黑棘皮病71例, 探讨其与内脏疾病的关系, 指出皮肤症状是恶性肿瘤存在的信号, 认为恶性黑棘皮病是一种少见的副瘤性皮肤病, 与恶性黑棘皮病相关的肿瘤侵袭性强, 一旦怀疑诊断此病一定要全面检查寻找原发灶。

关键词: 黑棘皮病; 胃癌; 预后

何立丽, 张培彤, 孙桂芝. 胃癌伴黑棘皮病1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1284-1286

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1284.asp>

0 引言

黑棘皮病(acanthosis nigricans disease, AN)是好发于面、颈、腹股沟和腋下等身体皱襞部位, 以色素沉着、过度角化、疣状增生、天鹅绒样增厚为特点的少见皮肤科疾病, 迄今病因不明。如果同时伴有消化系统或者其他系统的恶性肿瘤则称为恶性黑棘皮病^[1], 国内报道少见^[2]。现将我院收治的胃癌伴恶性AN 1例报道如下, 并结合本文收集的国内已报道的病例, 探讨其与内脏疾病的关系。

1 病例报告

男, 78岁, 2年前无明显诱因出现全身皮肤进行性颜色加深、色素沉着、双手背散发疣状肿物(图1), 于多处皮肤科就诊, 未能明确诊断。随于2008-09主因“上腹部不适1年余, 进食梗噎1 mo”于北京肿瘤医院就诊。胃镜示: 距门齿22 cm始, 见食管四壁多发结节, 表面不平, 色白, 0.2-0.5 cm, 贲门前壁小弯侧始见1隆起性肿物, 向下延伸, 侵及胃底、胃体小弯、后壁及胃窦大弯侧, 活检组织韧, 触碰易出血; 病理示: 贲门、胃体窦中分化腺癌。因同时确诊肝转移, 故未能手术切除。后就诊于我院, 行颈部皮肤活检病理提示黑棘皮病(图2), 明确诊断: 胃癌晚期伴黑棘皮病。先予以单药口服希罗达4个周期, 病变进展, 随于2008-07/11在我科采用草酸铂+5-FU+CF方案化疗6个周期, 配合中药健脾



图1 恶性黑棘皮病患者双手背部皮损. 双手背部见黑色色素沉着, 呈天鹅绒样增厚, 角化过度.

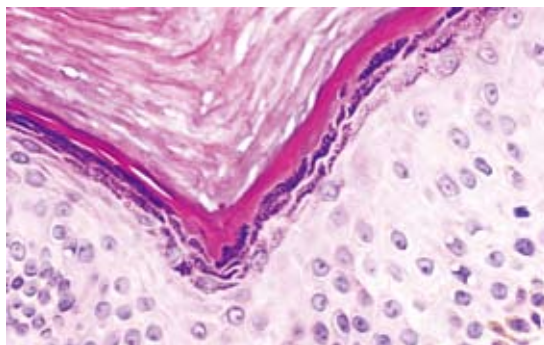


图2 恶性黑棘皮病患者颈部皮损组织病理(HE × 100). 表皮曲折, 乳头状瘤样改变和角化亢进.

■应用要点

本文报道黑棘皮病伴发胃中分化腺癌、肝转移1例, 认为皮肤病变的病程及表现可作为恶性肿瘤存在的讯号或治疗好转的标志.

益气、降逆止呕, 减毒增效, 疗效评价为稳定. 2009-06复查, 腹部CT示: 胃及贲门癌并肝转移, 其中贲门胃底近胃体部及肝内病变较前均进展; 肝胃之间新增结节影, 考虑淋巴结转移. 遂调整方案为口服替吉奥胶囊(80 mg/m²), 分2次口服, d₁₋₁₄. 治疗1疗程后患者症状未见改善, 后经随访患者于2009-11死亡.

2 讨论

早在1876年Mitchell就发现这种皮肤病变, 随后1890年由Pollitzer和Janvosky分别报道2例并命名为黑棘皮病. 我国将其分为五型: 良性型、恶性型、药物型、假性型及综合征型^[3].

我们通过“中国知网(www.epub.cnki.net)”中国期刊全文数据库, 对1994/2009国内公开报道的关于黑棘皮的病例进行关键词检索, 加上本报道1例, 共得71例, 其中49例为恶性型: 年龄17-80(平均55.9)岁, 男39人, 女10人. 可见恶性黑棘皮病好发于中老年人, 常合并恶性肿瘤, 特别是消化系肿瘤, 胃癌占87.7%, 其中4例伴有食管受累. 大多数病理为腺癌, 低分化腺癌占42.9%, 印戒细胞癌6.1%. 在49例恶性黑棘皮病患者中, 发病3年以内得到确诊的有91.8%, 病程最长者达25年. 先表现有内脏疾病症状者占20.4%, 先出现皮肤症状者67.3%, 同时有皮肤及内脏疾病症状者占12.2%. 可见大多数患者最早是以皮肤症状出现, 临床表现为皮肤变黑、粗糙、疣状或乳头瘤状增生, 患者常就诊于皮肤科, 经长期对症治疗未愈, 或逐渐出现内脏疾病症状后才就诊于内科, 延误了诊治. 在49例恶性型患者的治疗中我们发现, 单纯行手术者占24.5%, 单纯化疗者16.3%, 手术+化疗者24.5%, 未行抗肿瘤治疗者达12.2%. 由此可见, 目前对恶性黑棘皮病的治疗尚无公认有效的特异性治疗手段, 此

病预后较差, 患者最短在确诊3 mo死亡, 最长在确诊3年后死亡. 研究发现^[4]患者皮损会随肿瘤的控制而好转, 亦随肿瘤的恶化而加重, 故肿瘤决定了AN的最终预后. 相应的, 也有研究发现^[5], 皮损严重时则说明肿瘤在进展, 肿瘤切除后皮损可逐渐消退. 不过, 伴皮损的肿瘤其预后较差, 常早期转移, 患者生存期较同种肿瘤但不伴皮损者为短.

恶性AN的病因及发病机制尚不明确, 研究表明可能与肿瘤细胞大量分泌TGF- α 有关. TGF- α 能够通过内分泌途径刺激角质形成细胞的生长, 其表达和肿瘤的发展呈正相关^[6]. 另外肿瘤细胞产生的溶解因子能降低皮肤细胞外基质, 对恶性AN的发病有促进作用^[7].

本例患者属恶性AN合并胃腺癌, 皮疹先于胃癌发生, 按照皮肤病治疗达2年而无效, 随后因出现上腹不适行胃镜检查明确诊断胃腺癌. 理论上, 如通过皮损能早期对胃癌进行诊断和治疗, 则随着肿瘤得到有效控制, 黑棘皮病也会好转, 患者预后较好; 对于本例患者而言, 切除胃部肿瘤是最佳治疗选择, 且术前可行1-2周期的化疗, 以缩小病灶, 为手术及患者术后恢复提供有利条件, 但因发现较晚, 已错过胃部肿瘤手术治疗的最佳时机. 本例的治疗亦给我们留下警示, 即: 恶性黑棘皮病对肿瘤的诊断有较高价值, 临床医生如能及早识别皮损, 尤其是多次就诊皮损无改善且逐渐加重或出现进行性消瘦者, 即应及时进行全面的体检, 以期对伴发的恶性肿瘤早诊断、早治疗, 获得最佳疗效. 本患者提示我们应重视专科情况以外的特殊表现, 对少见疾病注意密切随访观察、早期诊断、及时治疗、改善预后.

3 参考文献

- 1 Verbov JL. Dermatoglyphics of malignant

■同行评价

本病例较为罕见,病理组织图片和大体图片效果最佳,通过文献分析较为合理的统计了该种病例的发病的临床表现情况,结论科学.

- acanthosis nigricans. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 302-303
- 2 朱健伟, 骆丹, 范志莘. 黑棘皮病合并胃低分化腺癌1例. *中国皮肤性病杂志* 2007; 21: 428-429
- 3 孙淑明, 马涛. 黑棘皮病临床分析. *广东医学* 1997; 18: 178-180
- 4 Kebria MM, Belinson J, Kim R, Mekhail TM. Malignant acanthosis nigricans, tripe palms and the sign of Leser-Tre'lat, a hint to the diagnosis of early stage ovarian cancer: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2006; 101: 353-355
- 5 Yoshino N, Yamagishi S, Kubokura H, Mikami I, Hirata T, Koizumi K, Okano T, Futagami A, Kawamoto M, Shimizu K. Mediastinal lymph node metastasis of lung cancer with an unknown primary lesion having concurrent endocrine abnormality and acanthosis nigricans: report of a case. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15: 397-400
- 6 Longshore SJ, Taylor JS, Kennedy A, Nurko S. Malignant acanthosis nigricans and endometrioid adenocarcinoma of the parametrium: the search for malignancy. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 541-543
- 7 Haase I, Hunzelmann N. Activation of epidermal growth factor receptor/ERK signaling correlates with suppressed differentiation in malignant acanthosis nigricans. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 891-893

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函.内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突;(3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核核稿;(5)列出作者贡献分布;(6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(7)愿将印刷版和电子版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内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理.

3 版权

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

肝淀粉样变1例

郝礼森, 郭剑, 郑力博, 朱芳丽, 刘小娟, 张晓岚, 秦玉彩

郝礼森, 郭剑, 郑力博, 朱芳丽, 刘小娟, 张晓岚, 秦玉彩, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
郝礼森, 华北煤炭医学院附属医院消化内科 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 资料分析和论文撰写由郝礼森完成; 临床资料的收集由郝礼森、郭剑、郑力博及秦玉彩完成; 文献检索由刘小娟与朱芳丽完成; 审校由张晓岚完成。

通讯作者: 张晓岚, 教授, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科. xiaolanzh@126.com

收稿日期: 2009-12-23 修回日期: 2010-03-07

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-28

Hepatic amyloidosis: a case report and literature review

Li-Sen Hao, Jian Guo, Li-Bo Zheng, Fang-Li Zhu, Xiao-Juan Liu, Xiao-Lan Zhang, Yu-Cai Qin

Li-Sen Hao, Jian Guo, Li-Bo Zheng, Fang-Li Zhu, Xiao-Juan Liu, Xiao-Lan Zhang, Yu-Cai Qin, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Li-Sen Hao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2009-12-23 Revised: 2010-03-07

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-28

Abstract

A 58-year-old male patient was admitted due to the presence of a mass in the upper abdomen, deep yellow urine and weight loss for half a year. Physical examination revealed that he had liver enlargement, mild liver function abnormalities, proteinuria, and increased alkaline phosphatase level. He was diagnosed as hepatic amyloidosis by liver biopsy. Hepatic amyloidosis is a rare clinical entity that is difficult to diagnose and has poor prognosis.

Key Words: Hepatic amyloidosis; Liver enlargement; Liver biopsy

Hao LS, Guo J, Zheng LB, Zhu FL, Liu XJ, Zhang XL, Qin YC. Hepatic amyloidosis: a case report and literature review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1287-1289

摘要

患者, 男, 58岁, 因发现上腹部包块、尿色深黄、体质量下降半年入院。入院后检查发现患者肝脏肿大、肝功能轻度异常, 伴有蛋白尿及碱性磷酸酶增高, 经肝穿刺活检确诊为肝淀粉样变。肝淀粉样变临床少见, 诊断困难, 预后较差。

关键词: 肝淀粉样变; 肝肿大; 肝穿刺活检

郝礼森, 郭剑, 郑力博, 朱芳丽, 刘小娟, 张晓岚, 秦玉彩. 肝淀粉样变1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1287-1289

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1287.asp>

0 引言

淀粉样变, 为多种原因所诱导的以特异性糖蛋白纤维即淀粉样物质在血管壁及器官、组织细胞外沉积为特征的一种进行性、预后不良性疾病^[1,2]。淀粉样物质可沉积于局部或全身, 主要累及心、肝、肾、脾、胃肠、肌肉及皮肤等组织, 淀粉样物侵及肝脏, 浸润于肝细胞之间或沉积于网状纤维支架时称为肝淀粉样变^[2]。肝淀粉样变临床少见, 诊断困难, 预后较差。现将我们遇到的1例典型病例并复习文献报道如下。

1 病例报告

男, 58岁, 主因发现上腹部包块、尿色深黄、体质量下降半年入院。患者于半年前无明显诱因发现上腹部逐渐隆起, 可自行触及包块, 质硬, 伴尿色深黄、体质量下降, 无发热、腹痛、呕吐及黑便等症状。曾就诊于当地医院, 查肝功能示总胆红素(TBIL)23 $\mu\text{mol/L}$ 、丙氨酸氨基转移酶(ALT)61 U/L、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)93 U/L; 肝炎筛查示乙型肝炎五项、丙型肝炎抗体、甲型肝炎抗体、丁型肝炎抗体及戊型肝炎抗体均阴性; 腹部B超示肝脾肿大、少量腹水、胆囊增大壁毛糙。给予护肝及利胆药物治疗后上腹部包块无缩小, 遂转入我院诊治。门诊以“肝肿大原因待查”收住院。既往12年前因“急性阑尾炎”行阑尾切除术, 无“肝炎”和

■背景资料

淀粉样物质可沉积于局部或全身, 主要累及心、肝、肾、脾、胃肠、肌肉及皮肤等组织, 淀粉样物侵及肝脏, 浸润于肝细胞之间或沉积于网状纤维支架时称为肝淀粉样变。肝淀粉样变临床少见, 诊断困难, 预后较差。

■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

■相关报道

有文献报道, 95%的淀粉样变患者尸体解剖时有肝脏淀粉样物质沉积。

“血吸虫”病史, 无“高血压病及高脂血症”病史. 无家族性淀粉样变病史. 2年前曾在纺织厂工作1年, 接触过棉纺织物. 无饮酒嗜好. 查体: 体温36.8℃, 脉搏60次/分, 呼吸16次/分, 血压100/70 mmHg, 神志清, 皮肤巩膜无黄染, 无肝掌, 可见蜘蛛痣, 浅表淋巴结无肿大. 面颊发红, 舌无肿大. 甲状腺无肿大, 胸廓无畸形, 双肺未闻及干湿性啰音. 心界在正常范围内, 心率60次/分, 律齐. 上腹膨隆, 无腹壁静脉曲张, 无压痛, 肝右肋下8 cm, 剑突下15 cm, 边缘欠规则, 质硬, 无触痛, 脾肋下未触及. 肝上界第五肋间, 腹部移动性浊音阴性, 肝区及双肾区无叩击痛, 双下肢无水肿. 辅助检查: 血常规示白细胞 $7.1 \times 10^9/L$ 、嗜中性粒细胞54.2%、淋巴细胞35.9%、嗜酸性粒细胞1.3%、嗜碱性粒细胞1.2%、红细胞 $5.90 \times 10^{12}/L$ 、血红蛋白186 g/L、血小板 $257 \times 10^9/L$; 尿蛋白3+; 尿蛋白定量4.53 g/24 h; 大便常规正常. 肝功能示总胆红素 $22.7 \mu\text{mol}/L$ 、直接胆红素 $7.6 \mu\text{mol}/L$ 、间接胆红素 $15.1 \mu\text{mol}/L$ 、ALT 46 U/L、AST 67 IU/L、谷氨酰胺转氨酶(GGT)249 U/L、碱性磷酸酶(ALP)275 U/L、总蛋白(TP)59 g/L、白蛋白(ALB)31.00 U/L、球蛋白(G)28.00 U/L; 蛋白电泳, 白蛋白55.9%、 α_1 球蛋白4.6%、 α_2 球蛋白11.9%、 β 球蛋白13.0%、 γ 球蛋白14.6%; 肾功能及电解质正常; 血糖、血脂正常; 乳酸脱氢酶313 IU/L, 肌酸激酶59 IU/L, 总胆汁酸 $11.80 \mu\text{mol}/L$, 胆碱酯酶250 U/L, 腺苷脱氨酶13 U/L, 单胺氧化酶7 U/L; 尿酸 $200.80 \mu\text{mol}/L$; 凝血酶原时间、凝血酶原活动度、部分凝血活酶时间均正常; 血沉17 mm/h; 肝炎病原学甲、乙、丙、丁、戊均阴性; 人类免疫缺陷病毒抗体(Anti-HIV)阴性; 甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原199(CA199)、糖类抗原125(CA125)均在正常范围; 平滑肌抗体、抗线粒体抗体均阴性. 免疫球蛋白G 11.20 g/L, 免疫球蛋白A 2.08 g/L, 免疫球蛋白M 0.73 g/L, 补体C3 1.81 g/L, 补体C4 0.29 g/L. 心电图示交界性心律. 骨髓检测提示红、巨两系增生减低. 电子胃镜检查提示反流性食管炎(I级)、食管静脉曲张(轻度)、胆汁反流性全胃炎、十二指肠炎. 胃体黏膜活组织病理检查显示胃体黏膜弥漫性炎症. 胸部X线片示右侧胸膜顶胸膜增厚, 心脏形态大小正常. 上腹部CT提示: 肝外形不规整, 体积明显增大, 肝左缘深入脾脏后方, 前缘向前膨隆, 肝脏边缘光滑, 肝质密度不均匀, 密度普遍减低, 强化程度明显减弱, 以肝右叶为

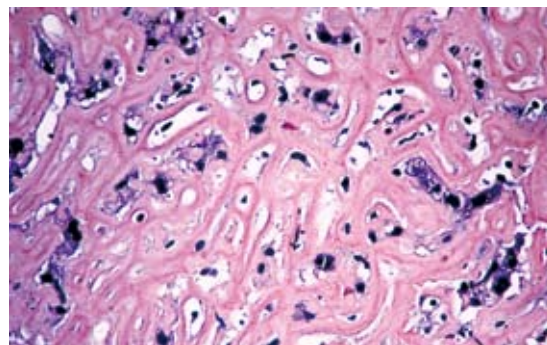


图1 肝组织刚果红染色($\times 200$). 可见肝组织正常结构破坏, 肝细胞间有大量条索状均质砖红色淀粉样物沉着。

著; 脾体积稍增大, 密度明显减低; 胰腺外形基本正常, 胰头部稍受压; 腹腔内胃及肠管略受压向下移位; 双肾外形正常, 其内未见异常密度影. 上腹部MRI提示: 肝外形不规则, 肝体积增大, 表面不光滑, 边缘稍往外突起, 第VI及第VIII肝段肝囊肿(3个), 不均匀脂肪肝, 慢性胆囊炎, 少量腹水, 脾脏强化不均匀. 肝穿刺肝组织刚果红染色光镜下观察: 肝小叶间肝细胞索严重萎缩, 被大量砖红色的淀粉样物质取代, 肝实质萎缩, 见图1. 诊断为肝淀粉样变.

2 讨论

淀粉样变是由可溶性血清淀粉样物质以不溶性纤维形式沉积于细胞外间质中引起的一组疾病^[1]. 其临床表现变化较大、多种多样, 常累及肝、肾、脾、心脏、胃肠、肌肉及皮肤等多个组织器官. 淀粉样物质主要由非纤维性糖蛋白-血清淀粉样蛋白P成分(serum amyloid P component, SAP)、葡糖聚氨酶(黏多糖)及各种纤维样蛋白组成, 其中SAP是构成淀粉样沉积的主要成分. 淀粉样沉积物用刚果红染色后在光镜下观察为砖红色的无定形物质, 在偏振光镜下呈苹果绿色双折射现象^[1]. 根据发病原因, 淀粉样变可分为原发性、继发性、家族遗传性、老年性、血液透析伴发的淀粉样变等类型^[3,4]. 临床上最常见的是继发性和原发性淀粉样变. 继发性淀粉样变又称淀粉样A蛋白型(AA型), 其主要病因为结缔组织病、肿瘤或结核等慢性感染, 淀粉样蛋白前体为淀粉样物质A(amyloid A); 原发性淀粉样变即淀粉样轻链型(AL型), 临床少见, 由于其临床表现复杂多样且无特异性, 常常被延误诊断. AL型淀粉样变主要累及肝、脾和肾脏. 肝脏是淀粉样变常累及的部位^[3,5]. 有文献报道, 95%的淀粉样变患者尸体解剖时有肝脏

淀粉样物质沉积^[6]. 肝受累的临床特征为体质量下降和肝肿大, 可有肝功能和生化异常, 其他可有蛋白尿、碱性磷酸酶增高等^[5]. 本病例以肝肿大、体质量下降为突出表现、伴有肝功能轻度异常、碱性磷酸酶升高及蛋白尿, 与AL淀粉样变完全一致, 可能为此类型.

肝淀粉样变在临床上并不多见, 临床上常由于其缺乏认识而导致无法确诊甚至误诊误治, 早期诊断治疗有助于延长患者生存期. 结合本例我们有如下体会: (1)临床发现体质量减轻、肝肿大、肝功能轻度异常的患者(特别是肝大与肝酶学异常不相符), 如伴有蛋白尿及碱性磷酸酶增高等, 要考虑肝淀粉样变的可能. (2)肝淀粉样变患者可有肝功能轻度异常, 如本例表现为ALT、AST轻度升高, 但这些变化均为非特异性, 与淀粉样物质在肝脏沉积的程度无关. (3)B超或CT等影像学检查对肝淀粉样变诊断虽不具有特异性, 但可提示病变, 如本例腹部CT提示肝脏弥漫性增大、密度普遍减低. (4)由于实验室检查缺乏特异性指标, 病理检查成为确诊的依据, 肝穿刺活检在诊断上具有突出地位. 本病例在当地医院虽经系列检查, 但因未行肝活组织病理检查, 故未能明确诊断. 入住我科后作为疑难病例进行讨论, 予肝组织活检而获明确诊断, 这为以后类似疾病的诊断与鉴别诊断提供了有益的经验. 另外, 肝肿大并不意味着

一定有肝淀粉样物质沉积, 在诊断本病时, 应注意与脂肪肝、肝糖原累积症和原发性肝细胞癌等相鉴别. 肝淀粉样变预后较差, 大多死于心肾衰竭和肺炎等继发感染. Park等^[5]分析了98例肝淀粉样变患者的临床特征和自然史, 结果显示平均生存时间是8.5 mo. 该病目前尚无有效治疗, 支持治疗和对症治疗有助于延长存活期. 经典的治疗方案为联合应用MP方案(马法兰+泼尼松), 也可应用多种抗癌药物联合化疗, 有条件者可进行肝脏移植. 本例患者确诊后自动出院, 放弃了进一步治疗.

3 参考文献

- Bestard Matamoros O, Poveda Monje R, Ibernón Vilaró M, Carrera Plans M, Grinyó Boira JM. [Systemic AA amyloidosis induced by benign neoplasms] *Nefrologia* 2008; 28: 93-98
- Gillmore JD, Lovat LB, Hawkins PN. Amyloidosis and the liver. *J Hepatol* 1999; 30 Suppl 1: 17-33
- Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal manifestations of amyloidosis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 776-787
- Ikeda S. [Diagnosis and treatment in systemic amyloidosis] *Rinsho Byori* 2008; 56: 121-129
- Park MA, Mueller PS, Kyle RA, Larson DR, Plevak MF, Gertz MA. Primary (AL) hepatic amyloidosis: clinical features and natural history in 98 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 291-298
- Monzawa S, Tsukamoto T, Omata K, Hosoda K, Araki T, Sugimura K. A case with primary amyloidosis of the liver and spleen: radiologic findings. *Eur J Radiol* 2002; 41: 237-241

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价
本研究选题密切
联系临床, 值得临
床医生阅读.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

肝脏孤立性坏死结节2例

王红群, 吴正升

■背景资料

肝脏孤立性坏死结节是一种少见的良性疾病, 1983年由Shepherd和Lee首先描述, 国内外文献中报道较少, 临床上没有潜在的并发症, 对身体健康没有较大的影响, 多是无意中发现, 具体病因尚在研究中。

王红群, 吴正升, 合肥市第三人民医院病理科 安徽省合肥市 230022

作者贡献分布: 王红群与吴正升对此文所作贡献均等, 此课题由王红群与吴正升共同设计, 研究过程由王红群与吴正升共同完成, 研究使用新试剂及分析工具由吴正升提供, 论文写作由王红群完成。

通讯作者: 吴正升, 副教授, 230032, 安徽省合肥市梅山路69号, 安徽医科大学病理学教研室. wozson@126.com

电话: 0551-5161130 传真: 0551-5161130

收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-03-15

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-28

Solitary necrotic nodule of the liver: a report of two cases and review of the literature

Hong-Qun Wang, Zheng-Sheng Wu

Hong-Qun Wang, Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, the Third People's Hospital of Hefei, Hefei 230022, Anhui Province, China

Correspondence to: Associate professor Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, 69 Meishan Road, Hefei 230032, Anhui Province, China. wozson@126.com

Received: 2010-01-06 Revised: 2010-03-15

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

In this report, we present two cases of solitary necrotic nodule (SNN) of the liver. The clinical, pathological and immunohistochemical datas of these two patients are analyzed and a review of relevant literature is conducted to investigate the clinical and pathological characteristics and possible causes of SNN.

Key Words: Solitary necrotic nodule; Etiopathogenesis; Immunohistochemistry

Wang HQ, Wu ZS. Solitary necrotic nodule of the liver: a report of two cases and review of the literature. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1290-1293

摘要

本文复习2例肝脏孤立性坏死结节的临床及病理资料, 并行免疫组织化学标记和特殊染色。结合文献探讨肝脏孤立性坏死结节的临床、病理特点及可能的病因。

关键词: 孤立性坏死结节; 病因; 免疫组织化学

王红群, 吴正升. 肝脏孤立性坏死结节2例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(12): 1290-1293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1290.asp>

0 引言

肝脏孤立性坏死结节(solitary necrotic nodule, SNN)是一种少见的良性疾病, 1983年由Shepherd和Lee首先描述^[1], 文献中报道较少。2006-2009年安徽医科大学第一附属医院及合肥市第三人民医院病理科在外检中遇到2例SNN, 现结合文献复习, 探讨其临床病理特征及可能的病因。

1 病例报告

病例1, 女, 35岁, 平常无不适症状, 于2006年体检偶然发现, 实验室检查包括血常规、电解质、肝功能和肿瘤十二项检验结果等均无异常, HAV、HBV及HCV均为阴性。CT提示肝右叶多发性小血管瘤及肝右叶被膜下见一低密度病变(图1), B超示肝右叶低回声病变, 内部回声欠均匀。大体送检为部分肝组织, 大小约5 cm×5 cm×3 cm, 切面见一4 cm×3 cm×3 cm大小的灰白结节, 结节境界清楚, 其周围见充血出血带(图2)。另送部分肝组织, 大小分别为1.2 cm×0.8 cm及0.5 cm×0.5 cm, 切面呈紫褐色(镜下为海绵状血管瘤)。光镜下: 结节中央为嗜伊红凝固性坏死灶, 可见少量残存的肝细胞及少量多核巨细胞残影, 局部可见小灶炎细胞聚集灶(见大量炎细胞, 包括淋巴细胞、组织细胞、中性粒细胞、浆细胞等), 坏死区周围纤维组织包裹, 纤维组织增生伴玻璃样变性及少量到中等量的淋巴细胞浸润, 并可见少量嗜酸性粒细胞、浆细胞、单核细胞及多核巨细胞等炎细胞浸润(图3A)。周围肝组织轻度淤胆、脂肪变性、水肿, 肝窦内充满血液, 汇管区纤维组织轻度增生伴少量淋巴细胞浸润, 小叶间静脉及小叶下静脉明显扩张。另送肝组织见2处海绵状血管瘤, 直径0.5-1.2 cm。石蜡切片做免疫组织化学检查及特殊染色, PAS染色阴性, 抗酸染色阴性, 铁染色阴性, Ag+VG

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

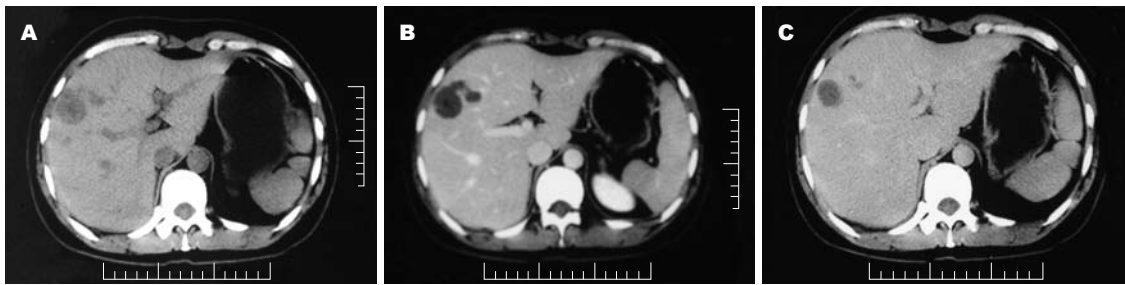


图 1 例1 CT示肝右叶被膜下一低密度病变. A: 平扫; B: 增强; C: 延迟.

■ 研发前沿
 该疾病的典型图像已为大家熟悉, 其病因成为研究热点, SNN可能潜在代表各种良性疾病演化的过程, 部分作者认为是血管瘤演变而来.



图 2 大体示界限清楚的结节.

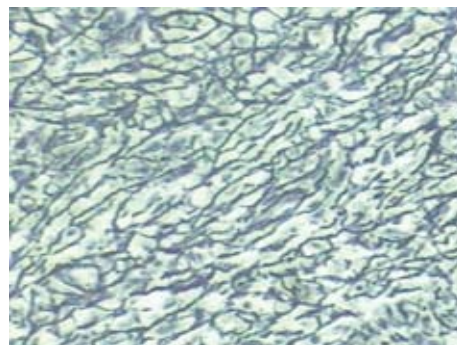


图 4 网状纤维完好(Ag+VG染色 × 100).

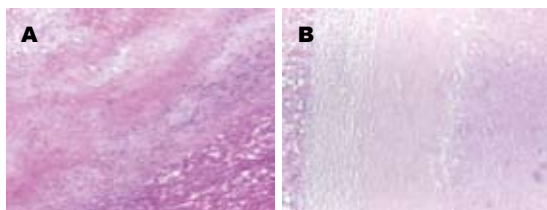


图 3 2例患者的镜下典型图像(H&E × 40). A: 例1; B: 例2.

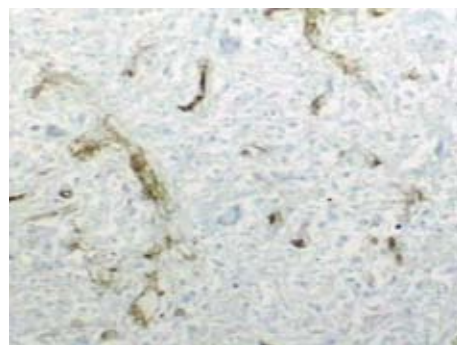


图 5 CD34的表达(MaxVision法 × 100).

显示网状纤维及胶原的轮廓保存完好(图4), Vim坏死组织及周边纤维组织阳性. CD34见较多小血管残影阳性(图5), CD68弥漫性阳性, CK少量残存细胞阳性. 患者因为CT显示低密度病变, 怀疑是恶性肿瘤, 术中冰冻切片, 冰冻结果描写为凝固性坏死灶, HE常规诊断为肝脏孤立性坏死结节. 该例患者术后恢复较好, 随访36 mo均未复发.

病例2, 男, 46岁, 2008年因外伤致右侧肋骨骨折行CT及超声检查, 发现肝左叶实质一低密度病变, 实验室检查示血常规、电解质及肝功能正常, 肿瘤十二项检验结果均阴性, HAV、HBV及HCV均为阴性, HbsAb弱阳性. 患者血脂高, 三酰甘油: 4.24 mmol/L(正常值0.4-2.00 mmol/L), 总胆固醇7.48 mmol/L(正常值3.00-5.70 mmol/L), 低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白均高于正常值(分别为4.59及1.93 mmol/L). 患者患有2型糖尿病多年. CT平扫示肝实质密度弥漫性减

低. 增强后动脉期肝左叶见一明显强化影, 境界清楚, 强化欠均, 静脉期病灶强化程度明显减退, 余肝实质内未见明显强化(图6). 彩色多普勒超声显示: 肝左外叶探及大小约1.6 cm × 1.5 cm偏低回声包块, 边界清楚, 后方回声增强, 内部回声欠均匀; 脂肪肝. 手术中见肝左叶稍肥厚, 肝左叶见一直径约2 cm的包块, 表面凹陷, 大体送检为灰红色不规则组织, 大小约4.5 cm × 3.0 cm × 2.5 cm, 切面见一直径1.8 cm的灰白色结节, 与周围组织界限清楚, 质韧. 光镜下: 结节中央为淡红色凝固性坏死区, 可见脂肪空泡残影及胆固醇结晶, 周围见纤维组织增生伴玻璃样变性, 纤维组织内中等量的淋巴细胞及少量浆细胞、嗜酸性粒细胞浸润, 纤维组织与坏死区有狭窄的均质的玻璃样变性带(图3B). 周围肝组织轻度

■应用要点

本文具有实用价值, CT平扫示低密度病变, 少数病例增强后可见强化影. 超声示低回声病变, 病理有典型的图像, 对临床医师的诊断及治疗有一定的指导作用, 尽量避免手术治疗以减少不必要的创伤, 最好的治疗方法就是保守治疗及随访.

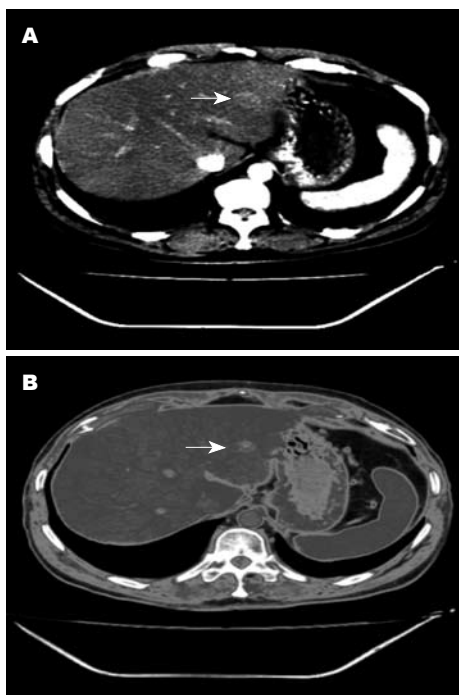


图 6 例2 CT示肝左叶有一病变(箭头). A: 增强; B: 延迟.

肝细胞水肿、淤胆及明显脂肪变性, 汇管区纤维组织轻度增生伴淋巴细胞浸润, 小叶间静脉及小叶下静脉明显扩张. 石蜡切片做免疫组织化学检查及特殊染色, PAS染色阴性, 抗酸染色阴性, 铁染色阴性, Ag+VG显示网状纤维及胶原的轮廓保存完好, Vim坏死组织及周边纤维组织阳性. CD68散在阳性, CK阴性, CD34染色小灶性阳性. 患者因为CT提示肝左叶有一病变灶, 怀疑是恶性肿瘤, 术中冰冻切片, 冰冻结果也描写为凝固性坏死灶, HE常规诊断为肝脏孤立性坏死结节. 患者术后恢复较好, 顺利出院, 随访7 mo未复发.

2 讨论

肝孤立性坏死结节是一种不常见的病变, 经常被诊断为恶性转移病灶, 大部分患者没有明显的症状, 多是因为其他疾病到医院检查无意中发现, 或是体检中发现. 文献报道SNN大部分位于包膜下, 少数位于肝实质中; 且大部分位于右叶, 少数位于左叶; 绝大部分患者为单结节, 少数为多结节, 平均直径为2-3 cm左右; 血清中CA-19及CEA等肿瘤标志物检验结果是正常的^[2-4]. 在本组病例中, 1例位于肝左叶实质中, 1例位于肝右叶肝被膜下, 结节直径分别为1.8 cm及4 cm. 2例患者血液中肿瘤标志物检验结果正常, 与文献相符. 且2例患者肝功能正常, 没有肝炎病毒感染.

显微镜下, 所有患者均有SNN的典型图像: 由中心凝固性坏死部分及周围的纤维膜组成, 纤维膜伴炎细胞浸润, 炎细胞包括组织细胞、淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞等, PAS染色、Grocott及抗酸染色显示没有细菌、真菌及寄生虫感染^[1-4]. 本文2例SNN均有上述的典型图像, PAS染色及抗酸染色也为阴性.

SNN的病因是多种的: SNN可能潜在代表各种良性疾病演化的过程, 如感染性脓肿、寄生虫性肉芽肿、血管瘤(或血管源性病变)、良性肿瘤、血肿、外伤等良性疾病发展而来; 约50%的病例能找到伴随的肿瘤^[1-6]. 本文2例患者免疫组织化学及特染显示有保留完整的网状纤维, Vim阳性, CD68阳性, 提示在坏死过程中有巨噬细胞吞噬坏死组织, 同时伴有纤维组织产生. 且结节周围肝组织均有轻度水肿、淤胆及不同程度的脂肪变性, 汇管区纤维组织均有轻度增生伴淋巴细胞浸润, 小叶间静脉及小叶下静脉明显扩张, 也提示病变区及周围肝组织缺血并伴有不同程度的炎症反应.

本组病例中, 例1合并多发性肝血管瘤, 病变周围肝窦扩张且充满血液, 坏死结节中, 有较多的小血管残影(CD34阳性), 灶性大量炎细胞聚集, CD68弥漫性阳性. 推测该例患者SNN的发生与血管瘤密切相关, 与Berry^[5]报道相同. 可能是血管瘤硬化、退变、缺血坏死, 同时反应性引起炎细胞浸润并吞噬包裹坏死组织, 周围纤维组织增生, 形成特征性的坏死结节.

本文例2中, 超声检查示患者脂肪肝, 患者血脂明显升高, 病变周围肝细胞明显脂肪变性, 在坏死结节中, 有脂肪空泡残影及胆固醇结晶, 同时病变周围小叶间静脉及小叶下静脉均明显扩张, 可能与脂肪肝及缺血有关, 在文献中尚未见相关报导, 尚需在大样本病例中进一步观察, 该例患者没有血管瘤, 也侧面说明SNN的病因是多方面的.

影像学中, 2例CT平扫显示低密度病灶, 其中例2增强后见强化影, 2例超声示低回声病变. 文献报导, 超声检查显示绝大部分患者为低回声病变, 或伴有轻微的高回声边缘, 所有患者均为非均质性回声^[2,4,7]; CT平扫SNN为低密度病灶, 少数病例延迟像显示边缘有轻度强化^[7].

SNN是少见病变, 没有明显的症状及潜在的并发症, 此疾病对身体健康没有较大的影响^[2], 临床医师结合影像学检查及实验检查结果综合判断, 尽量避免手术治疗以减少不必要的创伤,

最好的治疗方法就是保守治疗及随访.

3 参考文献

- 1 Shepherd NA, Lee G. Solitary necrotic nodules of the liver simulating hepatic metastases. *J Clin Pathol* 1983; 36: 1181-1183
- 2 Zhou YM, Li B, Xu F, Wang B, Li DQ, Liu P, Yang JM. Clinical features of solitary necrotic nodule of the liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 485-489
- 3 Kondi-Pafiti AI, Grapsa DS, Kairi-Vasilatou ED, Voros DK, Smyrniotis VE. "Solitary" necrotic nodule of the liver: an enigmatic entity mimicking malignancy. *Int J Gastrointest Cancer* 2006; 37: 74-78
- 4 De Luca M, Luigi B, Formisano C, Formato A, De Werra C, Cappuccio M, Loffredo A, Forestieri P. Solitary necrotic nodule of the liver misinterpreted as malignant lesion: considerations on two cases. *J Surg Oncol* 2000; 74: 219-222
- 5 Berry CL. Solitary "necrotic nodule" of the liver: a probable pathogenesis. *J Clin Pathol* 1985; 38: 1278-1280
- 6 Tsui WM, Yuen RW, Chow LT, Tse CC. Solitary necrotic nodule of the liver: parasitic origin? *J Clin Pathol* 1992; 45: 975-978
- 7 陆建平, 王一, 王飞, 王莉, 张秀忠, 刘崎, 田建明. 肝脏孤立性坏死结节的影像和病理对照. *中华放射学杂志* 1998; 32: 406-409

■同行评价
本文立意尚可, 内容有一定参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)》是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册,免费获取PDF等格式的全文,切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具,编委、作者和读者利益的最大化的目标,努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元,全年2016.00元,邮发代号82-262,由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章,具体内容涉及:食管疾病,如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等;胃部疾病,胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等;肠道疾病,如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等;肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等;胰腺疾病,如胰腺炎和胰腺癌等;全身性疾病涉及消化系统,如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等;以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等);除以上外,本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480,位居内科学类41种期刊的第6位;影响因子为0.547,位居内科学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059,他引率0.79,地区分布数29,基金论文比0.340,国际论文比0.00,学科影响指标0.59,综合评价总分49.5,位居内科学类41种期刊的第8位。

1.2 栏目 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。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式,GB6447文摘编写规则,GB7714文后参考文献著录规则,GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求;同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax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ln-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 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+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M明确的体内物质以nmol/L或mmol/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 × 6 cm × 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、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊文小写 ν ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 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 mmol/L±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6347意指6000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±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g±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 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±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→23.5→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≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1000, 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1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

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.

作者 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”.

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

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

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

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300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).

3.11 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. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 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.

1 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.

2 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.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 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

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID和DOI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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在

线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

5 修回稿须知

5.1 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、职称、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出版权转让给本刊编辑部。

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

5.3 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。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-8538-1901
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-05-01/05

美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国, 新奥尔良

联系方式: <http://www.ddw.org/wmspage.cfm?parm1=679>

2010-05-13/16

第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15

第五届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 南京市

联系方式: office@cnsld.org

2010-05-14/16

2010第四届中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma_spd@yahoo.com

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: yjliu@cma.org.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

志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!

裴新明 教授

西安交通大学医学院第一附属医院消化内科

陈进宏 副主任医师

复旦大学附属华山医院外科

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

迟宝荣 教授

吉林大学第一医院消化内科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

杜祥 教授

复旦大学附属肿瘤医院病理科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

高泽立 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

谷俊朝 主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院普外科

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

刘云鹏 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

孙明军 教授

中国医科大学附属第一医院内镜中心

唐世刚 教授

大连大学附属中山医院内科

唐志鹏 研究员

上海中医药大学附属龙华医院消化内科

汪思应 教授

安徽医科大学实验动物中心

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

王德盛 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王健生 教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王晓艳 副教授

湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王娅兰 教授

重庆医科大学基础医学院病理教研室

王正康 教授

北京中日友好医院普外科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

许文燮 教授

上海交通大学生命科学院生物医学工程系

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

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

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科