

# 环氧合酶-2与肝脏疾病的研究进展

陈晶, 杜雅菊

陈晶, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
杜雅菊, 教授, 医学博士, 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究, 黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2010-048  
作者贡献分布: 本文综述由陈晶与杜雅菊完成; 杜雅菊审校。  
通讯作者: 杜雅菊, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科, duyaju@medmail.com.cn  
电话: 0451-86605143 传真: 0451-86605980  
收稿日期: 2011-02-28 修回日期: 2011-04-20  
接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Advances in understanding the role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of liver diseases

Jing Chen, Ya-Ju Du

Jing Chen, Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Supported by: the Health Research Funds of Heilongjiang Province, No. 2010-048  
Correspondence to: Professor Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com.cn  
Received: 2011-02-28 Revised: 2011-04-20  
Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

### Abstract

Cyclooxygenase (COX) enzymes catalyze the rate limiting steps in prostaglandin synthesis and play an important role in inflammation, cell proliferation and apoptosis that are involved in the pathogenesis of many diseases. In recent years, great advances have been made in understanding the role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of liver diseases. The use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors provides a new avenue for clinical therapy of liver diseases. In this article, we will review recent advances in understanding the role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of liver diseases.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Alcoholic liver disease; Non-alcoholic liver disease; Viral hepatitis; Hepatoma

Chen J, Du YJ. Advances in understanding the role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1321-1325

### 摘要

环氧合酶-2是人体合成前列腺素的关键酶, 参与炎症反应、细胞增殖与凋亡, 在多种疾病中发挥作用. 近年来研究发现, 环氧合酶-2与肝脏疾病发生发展密切相关, 选择性环氧合酶-2抑制剂有望成为临床治疗肝病的有效药物. 本文就环氧合酶-2与肝脏疾病的研究进展作一综述.

关键词: 环氧合酶-2; 酒精性脂肪性肝病; 非酒精性脂肪性肝病; 病毒性肝炎; 肝癌

陈晶, 杜雅菊. 环氧合酶-2与肝脏疾病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1321-1325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1321.asp>

### 0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是体内催化花生四烯酸合成前列腺素(prostaglandin, PG)的关键酶, 哺乳动物细胞表达2个亚型的COX, 即COX-1和COX-2. 其中COX-1为结构型酶, 参与维持机体的正常功能; COX-2属诱导型酶, 参与炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等多种病理过程. 研究发现, COX-2在正常肝组织中仅有极少量表达, 在肝脏疾病中表达则明显增强, 因此, COX-2在各种肝脏疾病中的作用越来越受重视<sup>[1,2]</sup>. 为此, 本文将对COX-2在各种肝脏疾病发病机制中的作用进行综述.

### 1 酒精性脂肪性肝病

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮酒所致的肝脏疾病, 初期通常表现为脂肪肝, 进而可发展成酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化. 虽然此病多见于西方国家, 但近年来在我国发病呈上升趋势, 严重危害人民健康. ALD的发病机制仍未完全明确, 研究热点集中在酒精和其代谢产物的毒性作用, 氧应激和脂质过氧化, 以及炎症介质和细胞因子的作用. COX-2就是其中一个重要的炎症因子. 酒精性肝损伤时, 肝组织中多种细胞, 如库普弗

### ■背景资料

前列腺素广泛存在于人体许多组织中, 其生理作用极其广泛, 在内分泌、生殖、消化、血液、呼吸、心血管、泌尿、神经等多种系统中发挥病理生理作用. 研究发现, 前列腺素参与多种肝脏疾病的发生发展, 而环氧合酶-2作为前列腺素合成中的限速酶, 在肝脏疾病中具有重要的作用.

### ■同行评议者

朴云峰, 教授, 吉林大学第一医院消化科

## ■ 研发前沿

目前研究证实COX-2的过度表达可能参与人类多种肿瘤的发生、发展过程,其在肝癌中的作用正成为研究热点.

细胞、肝细胞和肝星状细胞等, COX-2表达明显增高,且库普弗细胞是COX-2的主要来源<sup>[3]</sup>. 氯化钆(GdCl<sub>3</sub>)灭活库普弗细胞后, COX-2表达明显下降,酒精诱导的肝脂肪变性减轻<sup>[4]</sup>. 实验性大鼠酒精性肝损伤时,除COX-2基因表达增强外,血浆内毒素、肝内TNF- $\alpha$  mRNA和脂质过氧化均增高,故推测乙醇所致的脂质过氧化和内毒素在酒精性肝损伤时可能起协同作用,即共同作用于库普弗细胞致TNF- $\alpha$ 、COX-2合成增加,COX-2和TNF- $\alpha$ 共同介导LPS的肝细胞毒性而损伤肝脏. COX-2被认为是这一系列复杂环节中的关键最后通路<sup>[3]</sup>.

有研究表明,在酒精性肝损伤时,内毒素血症和氧化应激激活NF- $\kappa$ B,且NF- $\kappa$ B的活化与大鼠肝脏坏死性炎症的进展有关. NF- $\kappa$ B活化后,COX-2随后表达增强,起到促炎症作用<sup>[5,6]</sup>. 乙醇在肝脏代谢过程中产生大量的活性氧与肝细胞膜性结构中的非饱和脂肪酸反应,生成以丙二醛(malondialdehyde, MDA)为主的脂质过氧化物,MDA通过G蛋白及丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)介导的信号通路激活NF- $\kappa$ B抑制物 $\alpha$ (inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ )激酶,使NF- $\kappa$ B活化发生核移位. 因COX-2启动子上含有2个NF- $\kappa$ B的结合位点, NF- $\kappa$ B与该位点结合后诱导COX-2的转录<sup>[7]</sup>.

COX-2表达增强后发挥促炎症作用,可能与诱导PG系统表达改变有关. 氧应激激活PLA<sub>2</sub>,使细胞内游离的氨基酸增多,大量的氨基酸在高表达的COX-2作用下,产生PG,导致肝损伤进一步加重. Enomoto等<sup>[8]</sup>对酒精喂养的动物模型进行研究时证实被激活的库普弗细胞表达COX-2增高, PGE<sub>2</sub>水平升高, PGE<sub>2</sub>与肝细胞膜上EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>受体结合后活化腺苷酸环化酶,使肝细胞内cAMP增多,引起三酰甘油在肝细胞中堆积,参与肝细胞中的脂肪蓄积过程. Ganey等<sup>[9]</sup>报道,使用酒精处理大鼠,在ALT和AST升高的同时,肝脏COX-2表达也明显增高,血浆PGD<sub>2</sub>升高,而使用COX-2抑制剂NS2398可以降低血浆PGD<sub>2</sub>浓度,同时使ALT和AST水平下降. 但此观点尚存在学术争议,相反的观点认为, PGE<sub>2</sub>水平升高起到抑制脂肪肝的作用. 长期小剂量的选择性COX-2抑制剂,可促进酒精诱导的脂肪性肝炎的进展及肝脏炎症,可能与其减少COX-2产物PGE<sub>2</sub>从而消除其他前列腺素的内源性保护作用有关<sup>[10]</sup>.

## 2 非酒精性脂肪性肝病

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver

disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤,其病理学改变与ALD相似,但患者无过量饮酒史,疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌<sup>[11]</sup>. NAFLD是21世纪全球重要的公共健康问题之一,亦是我国愈来愈重视的慢性肝病问题.

目前认为, NASH与酒精性肝炎有着相似的肝组织病理改变, Day等<sup>[12-14]</sup>提出的“二次打击”学说可能为他们共同的发病机制. 该学说认为各种原因引起的肝细胞脂肪积聚和脂肪变性作为“初次打击”,使肝细胞对各种损伤的易感性增高,氧应激、脂质过氧化、炎性细胞因子释放、线粒体功能异常等形成“二次打击”,诱导肝脏的炎症反应,肝细胞发生变性坏死、肝纤维化,最终导致肝硬化. 有关COX-2在NASH中的作用机制报道较少. 研究表明<sup>[15]</sup>,胆碱缺乏饮食诱导的大鼠NASH模型中,肝脏表达COX-2明显增高,且其高表达与NF- $\kappa$ B激活有关. 高表达的COX-2诱导TNF- $\alpha$ 、IL-6、细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1),同时这些因子反过来又可诱导COX-2进一步持续高表达. 使用选择性COX-2抑制剂NS2398和塞来昔布可减轻NASH大鼠肝脏的脂肪变及炎症反应,证实COX-2在NASH发病中起重要作用.

## 3 病毒性肝炎

慢性HBV、HCV感染常常发展为肝硬化及肝癌,威胁着我国人民的生命和健康. 近年研究表明, COX-2在慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎的进展中发挥着重要的作用. Cheng等<sup>[16]</sup>研究了COX-2在病毒性肝炎所致肝纤维化患者肝脏中的表达情况,发现随着肝纤维化程度的加重, COX-2的表达逐渐增强. 我国学者邵建国等<sup>[17]</sup>研究发现, COX-2在慢性乙型肝炎患者肝组织中表达增强,且其表达随肝脏炎症程度的加重而增强,但COX-2增高水平与HBV DNA水平无关,提示可作为反映肝脏炎症程度的一项指标. 但也有不同的观点认为<sup>[18]</sup>,虽然慢性乙型肝炎患者肝脏COX-2表达较正常肝组织明显升高,但在炎症坏死程度不同的HBeAg阳性和阴性组, COX-2表达并无显著差异,说明COX-2的高低不能作为反映肝脏炎症程度的指标. 在有效抗病

毒治疗后, COX-2仍持续处于高水平状态而无明显下降. COX-2在慢乙型肝炎患者肝脏中升高的机制, 可能由于COX-2与HBx之间存在交互协同作用, HBx诱导COX-2表达有助于病毒逃避免疫系统, 且与HBV慢性感染进展到肝硬化及肝细胞癌有关<sup>[19]</sup>.

HCV感染可以上调COX-2 mRNA和蛋白, 阿司匹林可以通过激活MEK1/2/p38 MAPK通路, 抑制COX-2表达, 从而发挥抑制HCV-RNA复制的作用<sup>[20]</sup>. 学者们对HCV致COX-2表达增强的机制进行了相关的研究. 在慢性丙型肝炎患者肝脏中, COX-2和MMP-9表达增强, 且其表达增强与HCV核心蛋白和NS5A蛋白的作用有关<sup>[21]</sup>. 这可能与HCV核心蛋白和NS5A蛋白能够激活NF- $\kappa$ B基因的转录有关<sup>[22]</sup>. 研究发现<sup>[23]</sup>, HCV可以诱导活性氧族的升高, 进而激活NF- $\kappa$ B, 促进COX-2和PGE2的表达, COX-2和PGE2在HCV复制中发挥着重要的调控作用. 此外, 人体对HCV感染的易感性及感染HCV后患者肝脏的炎症程度, 均与COX-2启动子的基因多态性有关<sup>[24]</sup>.

#### 4 肝癌

肿瘤的发生、发展是一个多因素多步骤的相互协同过程, 由多种因素参与. 目前研究证实COX-2的过度表达可能参与人类多种肿瘤的发生、发展过程, 其在肝癌中的作用正成为研究热点<sup>[25,26]</sup>. COX-2在肝细胞癌中的阳性表达不仅是一个早期事件, 而且参与了肝细胞癌的发生、发展、侵袭转移的全过程<sup>[27]</sup>. 目前认为其可能的机制为影响肿瘤细胞的增殖及凋亡、促进肿瘤血管的形成, 并参与肿瘤的转移和复发<sup>[28,29]</sup>.

**4.1 COX-2 调节肿瘤细胞的增殖和凋亡** 正常的p53基因产物可抑制COX-2表达, p53或ras基因突变可使COX-2表达增强. COX-2可催化一系列异位氧化反应, 包括致癌物产生的氧化胺与DNA作用从而抑制抑癌基因导致肿瘤产生, 在抑癌基因突变为癌基因的过程中起重要的作用.

HBx能够激活被P53抑制的抗凋亡蛋白Mcl-1, 从而阻断P53诱导的肿瘤细胞凋亡. 这一过程可以被COX-2抑制剂所阻断, 说明上述过程是通过活化COX-2/PGE2而实现的<sup>[30]</sup>. Leng等<sup>[31]</sup>研究发现, 将COX-2基因的质粒转染至多种肝细胞癌细胞株, 能明显促进肿瘤细胞的增殖; 将反义COX-2质粒转染上述肿瘤细胞则可抑制细胞增殖. 使用塞来昔布处理肝癌细胞株后细胞出现明显的凋亡征象, 且这一过程可能通过线粒

体-细胞色素c/caspase-9/caspase-3通路完成. 选择性COX-2抑制剂能够促进肝癌细胞凋亡、抑制肝癌细胞增殖而发挥抗癌作用<sup>[31,32]</sup>. 研究发现, 肝癌细胞株HepG2和Hep3B对TRAIL耐药, 塞来昔布的促凋亡作用, 可能与其作用于肝癌细胞后, 肝癌细胞对TRAIL的敏感性增强有关<sup>[33]</sup>.

**4.2 COX-2参与肿瘤血管的形成** COX-2在肿瘤血管形成中的作用包括: 增加促血管生成因子的表达; COX-2的催化产物, 如血栓烷A<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>等产生能直接刺激内皮的迁移和生长因子诱导的血管生成; COX-2通过刺激Bcl-2和Akt的活化, 抑制血管内皮细胞凋亡的能力<sup>[34,35]</sup>.

Rahman等<sup>[36]</sup>测定100例肝癌患者肝组织COX-2和诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达及癌组织中血管密度发现, COX-2和iNOS的表达和肿瘤血管密度呈显著相关, COX-2参与肿瘤血管形成. COX-2、iNOS、IL-8是一组可诱导蛋白, 其启动子均含有NF- $\kappa$ B应答元件, 炎症反应时IL-1和TNF- $\alpha$ 等细胞因子水平提高, 激活NF- $\kappa$ B, 从而使COX-2表达上调. 表达COX-2的细胞也表达iNOS, 两者具有协同作用. HCV阳性的HCC患者中, iNOS及COX-2表达阴性者的存活时间比阳性者明显延长<sup>[37]</sup>.

**4.3 COX-2参与肿瘤的转移和复发** HBx能够增强肝癌细胞的浸润能力、诱导MT1-MMP的表达, 而这些作用依赖于COX-2在肝癌中的过表达<sup>[38]</sup>. 在HBV相关性肝细胞癌患者中, 术后肝癌的复发与非肝癌肝组织中COX-2的高表达密切相关. 多元分析表明, 非肝癌组织中COX-2的过表达是肝癌复发的不利预后指标<sup>[39]</sup>. 另一项在对丙型肝炎相关的肝癌患者生存的研究中, 也发现了相似的结果<sup>[40]</sup>. Iwamoto等<sup>[41]</sup>研究发现, 肿瘤组织中COX-2升高抑制局部免疫应答, 从而参与肿瘤切除后剩余肝组织的肿瘤复发.

#### 5 结论

COX-2作为PG合成过程中的关键酶, 在肝脏炎症和肝癌的发生发展中起重要促进作用. 选择性COX-2抑制剂, 如塞来昔布、NS2398等, 高选择性的抑制COX-2而对COX-1抑制较弱, 避免了抑制COX-1后所致的胃肠黏膜损害等不良反应, 已广泛应用于心血管病的预防及治疗中. 在临床应用中发现, COX-2抑制剂具有安全性高的优点, 但也有一些个案报道其导致黄疸、转氨酶

#### ■ 相关报道

Iwamoto等研究发现, 肿瘤组织中COX-2升高抑制局部免疫应答, 从而参与肿瘤切除后剩余肝组织的肿瘤复发.

### ■应用要点

肝脏疾病发病机制复杂多样, 环氧合酶-2在不同的肝脏疾病中的作用及机制均不尽相同. 本文把环氧合酶-2在多种肝脏疾病中的作用和机制作了详细的综述, 为环氧合酶-2抑制剂应用于肝脏疾病的临床治疗提供了一定的方向.

升高等肝脏毒性作用. 因此, 虽然大量基础实验证实, COX-2在肝脏疾病中高表达及COX-2抑制剂对肝脏疾病的有效治疗作用, 但COX-2抑制剂应用于肝脏疾病患者群中, 仍需谨慎对待和进一步研究.

### 6 参考文献

- Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 350-354
- Cheng AS, Chan HL, Leung WK, To KF, Go MY, Chan JY, Liew CT, Sung JJ. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Mod Pathol* 2004; 17: 1169-1179
- Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 1997; 112: 943-951
- Keller SA, Paxian M, Lee SM, Clemens MG, Huynh T. Kupffer cell ablation attenuates cyclooxygenase-2 expression after trauma and sepsis. *J Surg Res* 2005; 124: 126-133
- Jokelainen K, Reinke LA, Nanji AA. Nf-kappaB activation is associated with free radical generation and endotoxemia and precedes pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease. *Cytokine* 2001; 16: 36-39
- Spitzer JA, Zheng M, Kolls JK, Vande Stouwe C, Spitzer JJ. Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Front Biosci* 2002; 7: a99-a108
- Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 3107-3113
- Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G100-G106
- Ganey PE, Barton YW, Kinser S, Sneed RA, Barton CC, Roth RA. Involvement of cyclooxygenase-2 in the potentiation of allyl alcohol-induced liver injury by bacterial lipopolysaccharide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 174: 113-121
- Bykov IL, Palmen M, Rainsford KD, Lindros KO. Chronic effects of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, cause enhanced alcohol-induced liver steatosis in rats. *Inflammopharmacology* 2006; 14: 36-41
- 中华医学会肝病分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中华内科杂志* 2010; 49: 275-278
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663-678
- Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*

- 2002; 17 Suppl 3: S377-S384
- Yu J, Ip E, Dela Peña A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006; 43: 826-836
- Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatology* 2002; 23: 185-195
- 邵建国, 谢幸尔, 姚建国, 屈莉红, 顾春燕, 包蕾. 环氧合酶2在慢性乙型肝炎肝组织中的表达. *第二军医大学学报* 2004; 25: 1383-1384
- Cheng AS, Chan HL, Leung NW, Liew CT, To KF, Lai PB, Sung JJ. Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 251-260
- Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120
- Trujillo-Murillo K, Rincón-Sánchez AR, Martínez-Rodríguez H, Bosques-Padilla F, Ramos-Jiménez J, Barrera-Saldaña HA, Rojkind M, Rivas-Estilla AM. Acetylsalicylic acid inhibits hepatitis C virus RNA and protein expression through cyclooxygenase 2 signaling pathways. *Hepatology* 2008; 47: 1462-1472
- Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, Apolinario A, Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, López-Cabrera M, Boscá L, Clemente G, García-Monzón C, Martín-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004; 53: 1665-1672
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9599-9604
- Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 2005; 79: 9725-9734
- Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatology* 2010; 40: 1219-1226
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- Xu L, Han C, Lim K, Wu T. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 11859-11868
- Sung YK, Hwang SY, Kim JO, Bae HI, Kim JC, Kim MK. The correlation between cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinogenesis. *Mol*

- Cells* 2004; 17: 35-38
- 28 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
- 29 Wu T. Cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 28-44
- 30 Cheng AS, Yu J, Lai PB, Chan HL, Sung JJ. COX-2 mediates hepatitis B virus X protein abrogation of p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 175-180
- 31 Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003; 38: 756-768
- 32 Kern MA, Schubert D, Sahi D, Schöneweiss MM, Moll I, Haugg AM, Dienes HP, Breuhahn K, Schirmacher P. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* 2002; 36: 885-894
- 33 Lu G, Liu Y, Ji B, Wei F, Hao C, Wang G. Synergistic effect of celecoxib on TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Invest* 2010; 28: 629-634
- 34 Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 19-27
- 35 Bamba H, Ota S, Kato A, Kawamoto C, Fujiwara K. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 485-491
- 36 Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Tsuchiya M, Nagasue N. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer* 2002; 100: 152-157
- 37 Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1325-1332
- 38 Lara-Pezzi E, Gómez-Gavero MV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, Martínez-A C, Arroyo AG, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002; 110: 1831-1838
- 39 He YF, Jin J, Wei W, Chang Y, Hu B, Ji CS, Jia WD, Wang XQ, Chen K, Chen J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in noncancerous liver tissue increases the postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *Can J Gastroenterol* 2010; 24: 435-440
- 40 Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4005-4012
- 41 Iwamoto A, Ikeguchi M, Matsumoto S, Hukumoto Y, Inoue M, Ozaki T, Ataka M, Tanida T, Endo K, Katanok K, Hirooka Y. Tumor cyclooxygenase-2 gene suppresses local immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumori* 2006; 92: 130-133

■同行评价  
本文新颖性较好, 具有较好的学术价值和可读性。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)采用了被索量、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)

# 危险信号分子与原发肝癌的研究进展

周蓉蓉, 范学工

## ■背景资料

危险模式理论及损失相关分子型分子等概念的提出是免疫学基础理论研究领域突破性进展。危险信号分子, 是正常细胞的结构分子, 一旦释放到细胞外, 可触发免疫反应。原发性肝癌的形成是慢性炎症长期作用的结果。以HMGB1, HSPs和S100蛋白等为代表的危险信号分子在慢性炎症和肿瘤微环境中的异常分布, 可以促进肿瘤的发生和进展。

周蓉蓉, 范学工, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

范学工, 教授, 主任医师, 主要从事炎症介质在重型肝炎、慢性乙型肝炎及原发性肝癌中的作用相关研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30972621

作者贡献分布: 本文综述由周蓉蓉完成; 范学工审核。

通讯作者: 范学工, 教授, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科, xgfan@hotmail.com

收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-04-21

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Role of alarmins in the pathogenesis of primary hepatic carcinoma

Rong-Rong Zhou, Xue-Gong Fan

Rong-Rong Zhou, Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972621

Correspondence to: Professor Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2011-03-05 Revised: 2011-04-21

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

Alarmins are a kind of constitutive cellular proteins which are released extracellularly under pathological conditions to signal danger to the host by triggering and mediating inflammatory responses. Persistent release of alarmins (e.g., HMGB1, HSPs and S100) during chronic liver inflammation and in tumor microenvironments plays an important role in the development and progression of liver carcinoma. Alarmins might become novel markers for predicting and monitoring carcinogenesis, metastasis and recurrence of liver carcinoma. Down-regulation of alarmins and blockage of the interaction of alarmins with their receptors represent new promising therapeutic strategies for liver carcinoma.

Key Words: Alarmins; Chronic inflammation; Primary hepatic carcinoma

Zhou RR, Fan XG. Role of alarmins in the pathogenesis of primary hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2011; 19(13): 1326-1330

## 摘要

危险信号分子, 是一大类细胞结构蛋白, 病理情况下释放到细胞外, 通过启动和介导炎症反应, 传递着细胞损伤的危险信号。以HMGB1、HSPs和S100为代表的危险信号分子, 在肝脏慢性炎症和肿瘤形成的微环境中持续存在, 在原发性肝癌形成和进展过程中发挥着重要的作用。危险信号分子可以成为新的预测和监测原发性肝癌发生、转移和复发的标志物, 下调这些危险信号分子表达及阻断其与受体结合的措施, 有望成为新的抗肿瘤治疗方法。

关键词: 危险信号分子; 慢性炎症; 原发性肝癌

周蓉蓉, 范学工. 危险信号分子与原发肝癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1326-1330

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1326.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝脏恶性肿瘤, 在世界范围内, 位居癌症相关死亡率的第3位。尤其在亚洲和非洲的部分地区, 估计每年有>680 000的新发病例。目前, 我国原发性肝癌患者数约占全球的55%; 在肿瘤相关死亡中仅次于肺癌, 位居第二。因此, 肝癌严重威胁我国人民的健康和生命。尽管外科手术切除和肝移植是比较有希望的根治性疗法, 但约有56%的患者在接受手术后1年内发生复发。即使在根治术后, 患者的5年生存率仍然不到5%。因此, HCC患者的预后差。除了缺乏有效的治疗方法以外, HCC较差的预后也与其临床症状出现晚有关, 许多患者在初次诊断时就已经是中、晚期。目前的诊断标志物, 对于预测HCC还不够精准。为了改善患者的预后, 迫切需要更有效的治疗方法和准确、可靠的筛查方法对HCC和高危人群进行筛查。危险信号分子(alarmins), 也称内源性损伤相关分子型(damage-associated molecular pattern, DAMP)分

## ■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

子, 是一个比较新的概念, 随着对其研究的深入, 发现其在慢性炎症和肿瘤性疾病中发挥着重要的作用. 本文主要介绍危险信号分子中的细胞外的高迁移率族蛋白1(high mobility group box protein 1, HMGB1), 如热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), S100蛋白在原发性肝癌生长和转移, 特别是早期转移中的作用.

## 1 危险信号分子与肿瘤

**1.1 危险信号分子的概念** 1994年, Matzinger提出了危险信号分子及危险模式理论<sup>[1]</sup>. 危险信号分子即内源性DAMP分子包括一些细胞内蛋白、DNA、RNA和核酸. 他们表达于不同的细胞结构中, 在维持正常细胞的稳态中发挥作用. 生理状态下, 他们可以位于胞核和胞质如HMGB1, 胞质如S100蛋白, 外染色体如HSPs. 危险信号分子是正常细胞的成分, 他们或者由坏死细胞被动释放, 或者在细胞受损时由应激状态下的细胞主动分泌<sup>[2]</sup>. 炎症介质在肿瘤的形成和进展中发挥重要作用. 细胞在应激状态, 机体损伤, 炎症, 坏死性细胞死亡等过程中都可以引起危险信号分子的释放, 这些分子通过与模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)结合, 触发免疫反应, 向宿主发出危险信号, 并且启动修复机制. 新近的研究表明, 这些分子在慢性炎症和肿瘤微环境中的异常分布, 可以促进肿瘤的发生和进展<sup>[3]</sup>. 这提示我们, 危险信号分子及其受体可以作为肿瘤治疗的新靶点.

**1.2 炎症诱发肿瘤** 已经证实有15%-20%的人类肿瘤中存在感染和慢性炎症反应, 常见的有: 胃肠道, 膀胱和肝脏肿瘤<sup>[4,5]</sup>. 其他引起慢性炎症的情况也预示肿瘤的发生, 如机械、物理、化学损伤和损伤后失调的免疫反应<sup>[6]</sup>. 炎症是对感染和组织损伤的免疫反应, 释放出各种炎症介质组成一个复杂的调节网络, 修复损伤组织, 维持内环境的稳定. 慢性炎症情况下, 在持续分泌的活性氧和含氮的活性分子的作用下, 修复的上皮细胞发生非可塑性增殖, 这样容易使DNA受损, 从而导致基因型的不稳定及携带突变基因细胞的增殖<sup>[7]</sup>. 病毒性肝炎是我国的常见病, 多发病, 国内95%的肝癌患者具有HBV感染的背景, 10%有HCV感染背景, 还有部分患者HBV和HCV重叠感染<sup>[8]</sup>. 而从HBV或HCV感染, 到慢性病毒性肝炎, 到肝癌的形成, 正好诠释了慢性炎症诱发肿瘤的理论.

**1.3 肿瘤引发炎症** 内源性肿瘤相关炎症反应由

肿瘤自身所触发, 不需要前炎症反应<sup>[9]</sup>. 上皮细胞在癌基因活化、肿瘤抑制基因失活或染色体质量排等因素的刺激下, 分泌一些因子, 可以招募炎症细胞到达肿瘤部位, 促成肿瘤微环境的形成. 肿瘤细胞和间质细胞共同组成局部微环境, 后者包括: 巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞、DC细胞、NK细胞、T和B淋巴细胞. 在不同类型的肿瘤及肿瘤形成的不同阶段, 这些间质细胞可以促进或抑制肿瘤的生长<sup>[10]</sup>.

## 2 几种常见危险信号分子与HCC

**2.1 HMGB1与HCC** HMGB1是一种重要的细胞因子, 在未成熟细胞和恶性细胞中常高度表达, 且具有多种生物学与病理学作用, 如诱导成年干细胞和胚胎干细胞迁移与增殖, 参与组织再生, 刺激内皮细胞表达细胞内黏附分子-1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)、E-selectin, 释放组织纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等. HMGB1与其受体RAGE在多种肿瘤组织, 如前列腺、直肠、颈部、胰腺、甲状腺、胃肠道、乳腺肿瘤, 淋巴瘤等中高表达<sup>[11,12]</sup>. HMGB1与肿瘤的发生、进展密切相关. HMGB1和RAGE的共表达与肿瘤的侵袭深度及淋巴结转移密切相关<sup>[13]</sup>. HMGB1能够在肿瘤血管内皮细胞中过表达, 提示他有助于肿瘤的新生血管形成. 给予HMGB1或RAGE抑制剂, 可明显抑制某些肿瘤细胞的增殖<sup>[14]</sup>.

HCC多数由慢性肝炎经肝硬化转变而来, 即“慢性肝炎-肝硬化-肝癌”三步曲. 在我国人群, HBV和HCV感染是导致慢性肝病和肝硬化的最主要病因. 鉴于原发性肝癌与慢性乙型肝炎的相关性, 我们课题组率先开展了HMGB1在慢性重型乙型肝炎中的作用研究, 发现慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中HMGB1 mRNA及血清HMGB1蛋白含量明显升高, 与疾病严重程度呈正向相关<sup>[15]</sup>. 在慢性丙型肝炎患者血清中HMGB1蛋白含量也明显升高. 这提示我们在慢性病毒性肝炎到肝癌的过程中, HMGB1可能发挥着重要的作用.

HMGB1与HCC密切相关. Cheng等<sup>[16]</sup>发

### ■ 相关报道

Cheng等发现, 肝癌患者血清HMGB1水平显著高于慢性肝炎、肝硬化及健康对照者. 血清HMGB1水平与AFP水平及肿瘤大小正相关.

### ■应用要点

本文进一步揭示危险信号分子在原发性肝癌发生、进展中的作用及其机制,对于开发新的预测和监测原发性肝癌发生、转移和复发的标志物,寻找新的抗肿瘤治疗方法有积极的意义。

现,肝癌患者血清HMGB1水平显著高于慢性肝炎、肝硬化及健康对照者。血清HMGB1水平与AFP水平及肿瘤大小正相关。将HCC患者按肿瘤大小分为3组: <3、3-5、>5 cm, 不同组患者血清中HMGB1表达水平分别为 $35.2 \mu\text{g/L} \pm 11.9 \mu\text{g/L}$ ,  $69.3 \mu\text{g/L} \pm 23.1 \mu\text{g/L}$ 和 $122.7 \mu\text{g/L} \pm 48.9 \mu\text{g/L}$ , 各组之间的差异是显著的。而将患者按TNM分期分为: I、II、III和IV期时, 各个分期相对应的血清HMGB1含量分别为 $30.2 \text{ pg/L} \pm 5.9 \text{ pg/L}$ ,  $58.9 \text{ pg/L} \pm 20.0 \text{ pg/L}$ ,  $100.9 \text{ pg/L} \pm 23.4 \text{ pg/L}$ 和 $175.8 \text{ pg/L} \pm 47.6 \text{ pg/L}$ 。在有明显肝外组织或淋巴结转移组中, HMGB1含量是显著增高的。提示HMGB1很可能与HCC的血管浸润, 淋巴结和远处脏器转移密切相关。

我们课题组的研究也证实, 原发性肝癌患者肝癌组织中HMGB1 mRNA及蛋白呈高表达。而能耐受根治性切除手术的原发性肝癌患者血清中HMGB1蛋白浓度及PBMC中HMGB1 mRNA表达水平低。这可能正提示了HMGB1与肝癌早期转移的相关性。进一步的体外实验中, 外源性重组HMGB1能刺激HepG2细胞增殖, 并上调cyclin D1、PCNA mRNA和蛋白的表达。特异性HMGB1中和抗体能逆转HMGB1对HepG2细胞的增殖作用<sup>[17]</sup>。靶向HMGB1的siRNA分子片段可以有效地抑制HepG2的生长并下调cyclin D1、PCNA mRNA和蛋白的表达, 抑制AFP释放, 促进HepG2细胞凋亡, 其作用与下调HMGB1的表达有关<sup>[18]</sup>。

目前的研究结果初步揭示了HMGB1在原发性肝癌中可能发挥的重要作用, HMGB1可以作为一个很有用的评价HH分期和判断预后的指标。阻断HMGB1的合成和释放的措施, 有望成为一种治疗HCC的新方法。但关于HMGB1在HCC肿瘤细胞形成、侵袭、转移等过程中的作用机制, 还知之甚少, 尚有待进一步的研究。

**2.2 HSPs与HCC** HSPs是一组在休克、化学和物理应激情况下高表达的蛋白<sup>[19]</sup>。迄今为止, 已经证实的HSPs超过了40种, 他们共同组成HSPs超家族。HSPs可以分为6个大类, HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40和小分子HSP。在生理情况下HSPs检测不到, 在应激情况下, HSPs的所有亚型可以构成细胞总蛋白5%, 而这些HSPs可以表达于不同的亚细胞组分中<sup>[20]</sup>。在HCC的早期诊断和治疗研究中, HSPs受到了高度关注, 因为他们在正常组织中不表达, 而在HCC时高表达<sup>[21,22]</sup>。

通过基因芯片筛选, 发现在肝脏肿瘤组织中, 有一系列HSPs被诱导表达, 表明他们中的部分可以用于HCC发生的早期诊断。比如通过免疫组织化学, 蛋白印迹和RT-PCR等方法证实了, HSP27、HSP70、GRP78、GRP75在HCC组织中高表达<sup>[21,23]</sup>。在HCC患者中还发现了可溶性HSP27<sup>[24,25]</sup>。有意思的是, 一些HSPs表达水平被证实与HCC患者的临床病理特征直接相关。比如, HSP27和HSP70过表达, 与更差的肿瘤分级直接相关<sup>[26]</sup>。除此以外, 一些临床病理状况, 如肝炎病毒感染, 早期复发, 判断预后等都可以用HSPs作为指标。

有研究证实, 非磷酸化和磷酸化的HSPs与肝癌的不同分期相关。磷酸化是在HSPs中常见的一种转录后修饰, 也是其活性的一个决定因子。在HCC组织中发现磷酸化的HSP27, 而且磷酸化水平与肿瘤大小, 微血管浸润和转移, 肿瘤分期密切相关<sup>[27]</sup>。

HSPs作为HCC早期复发的标志性分子。HSP家族中的GRP75被证实与HCC手术后的早期复发密切相关。在早期复发, 即术后4-12 mo复发的患者中, 其表达升高。GRP75高表达与HCC转移相关, 因此, 提示其可以作为预测HCC早期转移的标志物和判断预后的指标<sup>[24]</sup>。

HSPs作为判断预后的血清学标志物。总的来说, HSPs高表达与HCC较差的预后相关。HSPs高表达患者的5年生存率为24.1%, 显著低于HSP27低表达者的59.3%, 这也说明HSP27的表达可以作为一个强有力的判断生存预后的指标<sup>[28]</sup>。更重要的, 在70例HCC患者的组织标本中, 发现23例的HSP27、HSP70、GRP78表达同时上调, 他们中有80%(18/23)与肿瘤血管浸润和不良预后显著相关<sup>[23,29]</sup>。

目前肿瘤治疗药物的开发非常重视寻找肿瘤形成过程中的关键分子作为靶标。分子伴侣HSPs因其在维持致癌蛋白的结构、稳定性和功能信号通路中的关键作用, 而受到特别关注。如GRP75可以与P53相互作用, 下调P53的活性<sup>[30]</sup>。阻断HSPs的方法有望开发出新的抗肿瘤药物。

**2.3 S100蛋白与原发性肝癌** S100A8/A9蛋白参与了肿瘤的生长和转移的各个方面, 并且与肿瘤的早期转移密切相关<sup>[31,32]</sup>。有报道指出S100A9蛋白在侵袭性HCC中表达明显上调, 结合临床病理资料相关性研究, 结果提示S100A9可能成为一种潜在的、有应用价值的HCC分类、侵袭预测的分子标志物<sup>[33]</sup>。



### 3 结论

危险信号分子在炎症诱发的肿瘤和肿瘤引发的炎症中都发挥着重要作用. HCC的发生正是这样一个炎症诱发肿瘤和肿瘤引发炎症的复杂过程. 危险信号分子中的HMGB1、HSPs、S100在原发性肝癌的发生、侵袭、转移中发挥着重要, 甚至关键性的作用. 虽然目前仍有很多机制尚待进一步研究, 但是我们有理由相信, 这些危险信号分子可以成为新的预测和监测原发性肝癌发生、转移和复发的标志物, 阻断这些危险信号分子的措施, 有望成为新的抗肿瘤治疗方法.

### 4 参考文献

- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5
- Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 99-126
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867
- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 3-10
- Yang GY, Taboada S, Liao J. Inflammatory bowel disease: a model of chronic inflammation-induced cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 511: 193-233
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454: 428-435
- 杨秉辉, 丛文铭, 周晓军, 陈孝平, 杨甲梅, 樊嘉, 王建华, 杨仁杰, 李槐, 蒋国梁, 曾昭冲, 陈敏华, 陈敏山, 梁萍, 吕明德, 罗荣城, 刘鲁明, 秦叔逵, 叶胜龙, 吴孟超, 汤钊猷, 孙燕, 管忠震. 原发性肝癌规范化诊治专家共识. *临床肿瘤学杂志* 2009; 14: 259-269
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-799
- Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008; 27: 5904-5912
- Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, Lotze MT. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2836-2848
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 367-388
- Völp K, Brezniceanu ML, Bösser S, Brabletz T, Kirchner T, Göttel D, Joos S, Zörnig M. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* 2006; 55: 234-242
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000; 405: 354-360
- 刘洪波, 范学工, 黄建军, 李宁, 彭建萍, 李沙陵. 乙型肝炎患者血清高迁移率族蛋白-1含量的检测及临床意义. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 812-815
- Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Lu XF, Zhong N, Zhang ZL, Fan W, Li YQ. Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 446-452
- 贺新春, 范学工, 周蓉蓉. HMGB1对肝癌细胞株HepG2体外增殖的影响. *中南大学学报(医学版)* 2010; 35: 451-457
- 贺新春, 范学工, 刘洪波, 周蓉蓉. 小干扰RNA干扰高迁移率族蛋白1对HepG2细胞增殖和凋亡的影响. *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 361-365
- Aufricht C. HSP: helper, suppressor, protector. *Kidney Int* 2004; 65: 739-740
- Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1113: 192-201
- Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly AL, De Thonel A, Chiosis G, Garrido C. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2839-2847
- Lu WJ, Lee NP, Fatima S, Luk JM. Heat shock proteins in cancer: signaling pathways, tumor markers and molecular targets in liver malignancy. *Protein Pept Lett* 2009; 16: 508-516
- 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
- Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, Lau GK, Beretta L, Fan ST. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 315-325
- Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- Hwang TS, Han HS, Choi HK, Lee YJ, Kim YJ, Han MY, Park YM. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 690-700
- Zhang D, Wong LL, Koay ES. Phosphorylation of Ser78 of Hsp27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer. *Mol Cancer* 2007; 6: 52
- King KL, Li AF, Chau GY, Chi CW, Wu CW, Huang CL, Lui WY. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. *Cancer* 2000; 88: 2464-2470
- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 2487-2493
- Kaul SC, Aida S, Yaguchi T, Kaur K, Wadhwa R. Activation of wild type p53 function by its mortalin-binding, cytoplasmically localizing carboxyl terminus peptides. *J Biol Chem* 2005; 280: 39373-39379
- Ghavami S, Rashedi I, Dattilo BM, Eshraghi M, Chazin WJ, Hashemi M, Wesselborg S, Kerkhoff C, Los M. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP

### 同行评价

本文内容新颖, 能与临床结合, 具有较好的科学价值.

- kinase-dependent pathway. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1484-1492
- 32 Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2008; 181: 4666-4675
- 33 陈滨, 彭民浩, 李佳荃, 蓝柳根, 卢景宁. 钙调蛋白S100A9在肝细胞性肝癌中的表达及其意义. *中国癌症防治杂志* 2010; 2: 172-175

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

**本刊讯** 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>  
(总编辑: 马连生2011-05-30)

# 肝癌细胞蛋白质组在DTT诱导内质网应激条件下的表达

严冬梅, 刘友平, 代荣阳, 段春燕, 陈绍坤

严冬梅, 刘友平, 代荣阳, 段春燕, 泸州医学院生物化学教研室 四川省泸州市 646000

陈绍坤, 泸州医学院细胞生物学和遗传学教研室 四川省泸州市 646000

严冬梅, 讲师, 主要从事肝病分子机制方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81000886

四川省卫生厅基金资助项目, No. 100220

泸州医学院青年基金资助项目, No. 72

作者贡献分布: 严冬梅与陈绍坤对此论文作贡献均等; 此课题设计由严冬梅、代荣阳及陈绍坤完成; 研究过程由严冬梅、刘友平及段春燕操作完成; 本论文写作由严冬梅与陈绍坤共同完成。

通讯作者: 陈绍坤, 讲师, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院细胞生物学和遗传学教研室, luyicsk@163.com

收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-03-30

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-05-08

## Proteomic profiling of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells under endoplasmic reticulum stress induced with dithiothreitol

Dong-Mei Yan, You-Ping Liu, Rong-Yang Dai, Chun-Yan Duan, Shao-Kun Chen

Dong-Mei Yan, You-Ping Liu, Rong-Yang Dai, Chun-Yan Duan, Department of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Shao-Kun Chen, Department of Cell Biology and Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: Natural Science Foundation of China, No. 81000886; the Scientific Research Foundation of the Health Department of Sichuan Province, No. 100220; and the Young Researcher Foundation of Luzhou Medical College, No. 72

Correspondence to: Shao-Kun Chen, Department of Cell Biology and Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China luyicsk@163.com

Received: 2011-02-22 Revised: 2011-03-30

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-05-08

### Abstract

**AIM:** To explore new therapy targets for human hepatocellular carcinoma by proteomic profiling of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells under endoplasmic reticulum stress.

**METHODS:** Cultured SMMC-7721 cells were divided into two groups: experimental group and control group. The experimental group was treated with dithiothreitol (DTT, 2.5 mmol/L), while the control group was treated with equal

volume of culture medium. After treatment, total cell proteins were prepared and resolved by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The two-dimensional electrophoresis maps for the two groups of cells were analyzed using ImageMaster 2D Platinum software. Proteins that showed obvious expression alteration in the experimental group were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

**RESULTS:** There were  $844 \pm 46$  protein spots in the 2-DE map for the experimental group and  $1\ 015 \pm 63$  protein spots for the control group. There were  $593 \pm 23$  pairs of matched protein spots between the two groups, and the matching rate was about 71%. Most of the proteins have an isoelectric point at pH5.2-6.5 and a molecular weight of 15 000-80 000 Da. Three protein spots showed 2-fold or greater differential expression between the two groups and were identified by MALDI-TOF-MS. They were protein fem-1 homolog B, cyclin A1, and proliferation-inducing protein 44.

**CONCLUSION:** Three differentially expressed proteins in SMMC-7721 cells under endoplasmic reticulum stress were identified and may be useful molecular targets for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

**Key Words:** Endoplasmic reticulum stress; SMMC-7721 cells; Proteomics; Dithiothreitol

Yan DM, Liu YP, Dai RY, Duan CY, Chen SK. Proteomic profiling of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells under endoplasmic reticulum stress induced with dithiothreitol. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1331-1335

### 摘要

**目的:** 研究内质网应激条件下肝癌细胞 SMMC-7721 蛋白质组的表达, 为人类肝细胞癌的诊治提供新的靶点。

**方法:** 培养肝癌细胞株 SMMC-7721, 随机分为两组, 即实验组和对照组。实验组加入二硫苏

### ■背景资料

内质网是细胞储存  $\text{Ca}^{2+}$  和加工蛋白的主要场所, 其功能紊乱将导致内质网应激。肿瘤细胞具有旺盛的蛋白合成和分泌功能, 因而其内质网稳态的维持显得尤为重要。肿瘤生长过程中缺氧、过酸和营养不足能激活未折叠蛋白反应, 进而使肿瘤细胞适应不利环境, 未折叠蛋白反应的激活对肿瘤的发展起着重要作用。肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 未折叠蛋白反应与肝癌的发生、发展密切相关。

### ■同行评议者

周南进, 研究员, 江西省医学科学研究所

■ 研发前沿  
如何早期诊断及治疗HCC仍是目前面临的一大难题。

糖醇(DTT, 2.5 mmol/L), 对照组加入等量的培养基, 裂解细胞, 提取全细胞蛋白. 双向电泳(2-DE)分离, Image Master 2D Platinum软件进行差异表达蛋白质组分析, 基质辅助激光解吸附离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定蛋白质.

**结果:** 实验组肝癌细胞SMMC-7721的2-DE图谱上共检出蛋白质斑点(844±46)个, 对照组共检出蛋白质斑点(1 015±63)个, 对照组与实验组自动匹配配对(593±23)对, 匹配率约71%左右, 绝大多数蛋白集中于pH5.2-6.5, 相对分子质量15 000-80 000 Da; 获得组间标准化总灰度值(%Vol)相差2倍及以上的蛋白斑点3个, 通过MALDI-TOF-MS分析鉴定了3个差异蛋白质点, 分别是: fem-1同源蛋白B、细胞周期素A1、增殖诱导蛋白44.

**结论:** 鉴定的3个肝癌细胞株SMMC-7721在内质网应激下表达改变的蛋白质, 其功能涉及细胞增殖、细胞凋亡以及细胞周期等, 具有潜在的作为肝癌诊断、预后标记物或治疗靶点的意义.

**关键词:** 内质网应激; 肝癌细胞SMMC-7721; 蛋白质组; 二硫苏糖醇

严冬梅, 刘友平, 代荣阳, 段春燕, 陈绍坤. 肝癌细胞蛋白质组在DTT诱导内质网应激条件下的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1331-1335

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1331.asp>

## 0 引言

内质网是一种重要的真核细胞器, 由于各种原因引起的内质网中未折叠或错误折叠蛋白质的堆积能引起未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR), 导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)<sup>[1-4]</sup>. UPR对应激细胞恢复正常功能起重要作用, 但是当细胞面临过强或持续性内质网应激时, UPR则会启动凋亡信号清除不能恢复功能的细胞. UPR与肿瘤关系密切, 其通过促进血管生成、促进肿瘤细胞休眠及降低肿瘤细胞对某些化学药物的敏感性等发挥促癌作用<sup>[5,6]</sup>. 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 在我国为第2位的癌症死因<sup>[7]</sup>, 其发病率近年来仍有上升趋势<sup>[8]</sup>. 其发生是一个多基因、多途径的复杂过程, 新近研究<sup>[9,10]</sup>表明UPR与HCC的发生、发展密切相关.

蛋白质组学以组织或细胞的全部蛋白质为

研究对象, 以蛋白质整体表达水平的研究为特点. 近年来, 肝癌细胞系的蛋白组学研究为揭示HCC发生机制奠定了重要的实验基础. 如Fujii等运用蛋白质组学技术研究了不同HCC细胞系抑癌基因结合蛋白、转录调节蛋白、细胞周期调节蛋白等在正常细胞和癌细胞之间表达的差异性, 并建立了HCC细胞系HepG2的蛋白电泳图谱和数据库, 在HCC蛋白质谱研究领域具有里程碑式的意义<sup>[11,12]</sup>. 然而如何早期诊断及治疗HCC仍是目前面临的一大难题. 本研究从整体的角度出发, 采用内质网应激诱导剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DDT)刺激HCC细胞株SMMC-7721, 运用蛋白质组学方法<sup>[13-15]</sup>, 通过双向凝胶电泳、质谱分析和生物信息学等技术方法, 获得HCC细胞双向电泳图谱. 通过对这些图谱进行蛋白质表达差异分析并结合GenBank数据库资料, 确定与HCC细胞SMMC-7721内质网应激相关的蛋白质分子的表达变化, 从而全面了解蛋白表达改变与HCC细胞内质网应激的关系, 以期HCC的诊治提供新的靶点.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DTT购自Sigma公司, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(N, N-methyleubisacrylamide)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、尿素(urea)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、甘氨酸、N, N, N, N, -四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、固相pH梯度干胶条(pH4-7, 17 cm)和矿物油购自Bio-Rad公司; 蛋白分子质量Marker和苯甲基磺酰氟(PMSF)购自碧云天生物技术研究所; 其他常规试剂均购自GE Healthcare公司. 低温台式离心机(TDZ4.WS)购自长沙湘仪离心机仪器有限公司; 双向电泳系统、ChemiDoc XRS蛋白凝胶成像系统购自Bio-Rad公司; 高速冷冻离心机购自Sigma公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及样品制备:** HCC细胞株SMMC-7721在50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37 °C孵箱内用DMEM完全培养基(含102 mL/L FBS、20 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、20 mmol/L HEPES、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素)培养, 根据具体情况更换培养基. 实验组用DTT(2.5 mmol/L)诱导HCC细胞内质网应激反应<sup>[16,17]</sup>, 对照组加入等量的培养基, 24 h后弃去培养基, 生理盐水清洗2次, 加细胞裂解液, 4 °C振荡30 min, 4 °C 12 000 r/min离心30 min, 收集上清

表 1 肝癌细胞株SMMC-7721差异表达蛋白点质谱信息

蛋白编号	蛋白名称	GenBank号	蛋白匹配 分值	肽段 匹配数	理论分子质量 (Da)/等电点	实验分子质量 (Da)/等电点	功能
1	fem-1同源蛋白B	gi 7657265	48	13	71 189/6.14	70 000/5.8	细胞的凋亡
2	细胞周期素A1	gi 2183079	42	11	46 993/5.22	50 000/5.4	细胞周期的调控
3	增殖诱导蛋白44	gi 46981977	52	10	55 601/6.93	40 000/6.5	蛋白质的合成

液即为蛋白质提取物, 运用Bradford法<sup>[18]</sup>测定总蛋白浓度。

1.2.2 蛋白质的双向凝胶电泳: 将150  $\mu$ g蛋白质样品与样品水化液充分混匀后, 加入水化槽中。将IPG胶条(pH4-7, 17 cm)放入水化槽, 室温下被动水化12 h。根据资料<sup>[19-21]</sup>, 17  $^{\circ}$ C进行第一向电泳, 等电聚焦总伏时数为80 000 V; 二向电泳采用10% SDS-PAGE, 电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。

1.2.3 数据分析及质谱鉴定: 采用银染法<sup>[22]</sup>对双向电泳后的凝胶进行染色。运用Image Master 2D Platinum5.0分析软件进行蛋白质的差异分析, 初步筛选出实验组和对照组差异表达的蛋白质。以上每个样品重复实验3次。取组间标准化总灰度值(%Vol)都相差2倍及以上<sup>[23]</sup>的蛋白斑点3个, 胶内酶切, 进行基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定, 获得各差异蛋白质斑点的肽指纹图谱。再结合这些蛋白质斑点的等电点和分子量等信息, 使用肽指纹图谱匹配软件Mascot检索匹配GenBank数据库进行蛋白质斑点的鉴定。

**统计学处理** 所有数据的统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行。

## 2 结果

2.1 获得HCC细胞株SMMC-7721 2-DE图谱 培养HCC细胞株SMMC-7721, DTT诱导内质网应激, 裂解细胞提取蛋白, 双向凝胶电泳分离、银染法染色获得背景较清晰、分辨率高、重复性好的2-DE图谱。通过Image Master 2D Platinum5.0分析软件对2-DE图谱的斑点进行自动检测, 实验组即DTT诱导内质网应激组共有可稳定重复的蛋白斑点(844 $\pm$ 46)个, 对照组共有可稳定重复的蛋白斑点(1 015 $\pm$ 63)个, 对照组与实验组自动匹配配对(593 $\pm$ 23)对, 匹配率约71%左右。绝大多数蛋白集中于pH5.2-6.5, 相对分子质量15 000-80 000 Da(图1)。

2.2 DTT诱导内质网实验组与对照组2-DE图谱差异蛋白点的分析 实验组较对照组的蛋白质表

达谱在3次双向电泳图谱中均出现总灰度差达2倍以上的蛋白点视为差异表达蛋白点, 其中变化明显的蛋白点3个, 见图1, 2所示的蛋白点1-3。将各差异蛋白的表达量进行柱状分析: HCC细胞SMMC-7721内质网应激条件下各差异表达蛋白点都表现为明显上调趋势(图3)。

2.3 蛋白质斑点的质谱鉴定 通过Image Master 2D Platinum5.0分析软件匹配对比分析, 筛选出内质网应激下HCC细胞SMMC-7721表达明显改变的蛋白质斑点3个进行质谱检测鉴定, 获得了这些蛋白质斑点的肽指纹图谱, 采用Mascot软件将各蛋白质斑点的肽指纹图谱与GenBank数据库中已知蛋白的标准肽指纹图谱相比较, 获得各蛋白质斑点的鉴定结果(表1)。

## 3 讨论

肿瘤细胞具有旺盛的蛋白合成和分泌功能, 因而其内质网稳态的维持显得尤为重要。肿瘤生长过程中缺氧、过酸和营养不足能激活未折叠蛋白反应, 进而使肿瘤细胞适应不利环境, 未折叠蛋白反应的激活对肿瘤的发展起着重要作用<sup>[5,24-26]</sup>。我们前期的实验结果表明HCC细胞对内质网应激的耐受能力远远强于正常肝细胞<sup>[27]</sup>, 这就表明HCC细胞具有更强的抵抗内质网应激诱导凋亡的机制, HCC细胞正是利用这些机制维持了其在内质网应激环境中的存活。HCC细胞抵抗内质网应激诱导的凋亡是未折叠蛋白反应发挥促HCC作用的核心事件, 目前对HCC细胞耐受内质网应激凋亡的机制还很不清楚。

已鉴定的内质网应激条件下HCC细胞SMMC-7721差异表达的蛋白质3个。其中fem-1同源蛋白B是E3蛋白连接酶复合体的组成成分, 有研究表明, fem-1作为CED-3底物可能介导哺乳动物细胞的凋亡<sup>[28]</sup>, 在结肠癌细胞中, fem-1b作为一种凋亡前体蛋白, 调节蛋白酶体抑制剂介导的细胞凋亡<sup>[29]</sup>。本研究发现HCC细胞SMMC-7721在DTT诱导下发生内质网应激, fem-1蛋白的表达量明显增高, 提示fem-1蛋白与

### ■ 创新盘点

本研究通过双向电泳结合质谱技术检测出内质网应激条件下肝癌细胞SMMC-7721与对照组相比有3个差异蛋白质点, 分别是: fem-1同源蛋白B, 细胞周期素A1, 增殖诱导蛋白44。这3个差异表达蛋白质的表达量较对照都明显增高。

■应用要点

内质网应激条件下肝癌细胞SMMC-7721与对照组差异表达蛋白质的变化很可能是肝癌细胞抵抗内质网应激的物质基础。如果对以上差异表达蛋白质的进一步研究将为揭示肝癌发病的分子机制及寻找诊断治疗靶标提供可靠的实验依据。

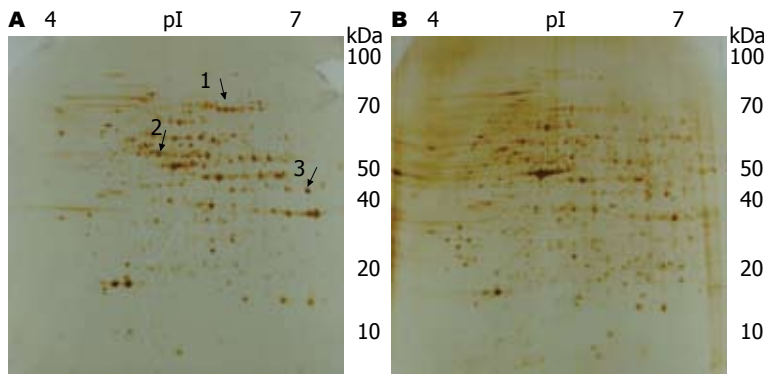


图1 内质网应激条件下HCC细胞SMMC-7721双向电泳图谱。A: 实验组; B: 对照组。

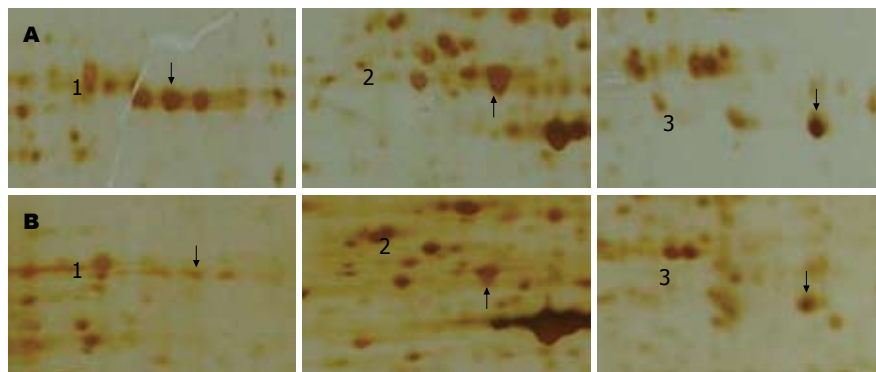


图2 内质网应激条件下HCC细胞与对照组比较的主要差异表达蛋白斑点。A: 实验组; B: 对照组。

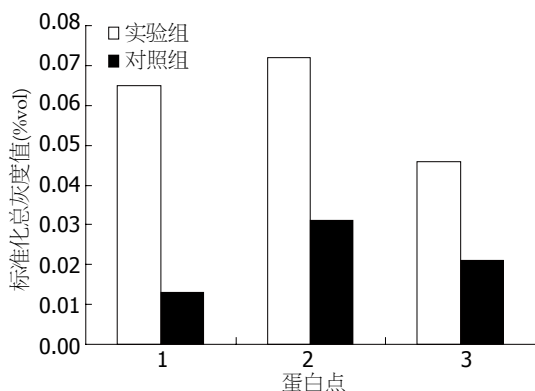


图3 各差异蛋白点的蛋白表达量比较。

HCC细胞内质网应激诱导的凋亡有关。cyclin家族对于细胞周期具有重要的调控作用,包括cyclin A-H。cyclin A只出现在细胞核,可与p34cdc2和cdc2有关的激酶结合。有资料表明<sup>[30-32]</sup>, cyclin A基因的持续表达可能与HCC的发生有关。cyclin A与p34cdc2结合,诱导细胞分裂,他在细胞中的水平持续增高可使细胞停止在有丝分裂期。cyclin A与细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)结合之后才显示酶的活性,可促进DNA复制顺利完成,并且为分裂期所需的蛋白质合成做好准备。cyclin A包括:表达于减数分裂和非常早期胚胎的胚胎特异型cyclin A1和在所有体细胞中都可见到的体细胞型cyclin A2。cyclin A1在细胞周期调节蛋白家族中发

现较晚,在细胞周期中,G<sub>1</sub>晚期到S期是细胞增殖最重要的时期,有研究发现,减少cyclin A1依赖的激酶2(CDK2)可以使细胞阻滞于S期<sup>[33]</sup>。本研究发现HCC细胞内质网应激诱导下cyclin A1表达增加,提示cyclin A1蛋白水平的升高,促进细胞周期发展及细胞增殖,与HCC的发生有关。增殖诱导蛋白44是一种氨基酰tRNA合成酶,其表达增强可促进蛋白质翻译过程。

总之,本研究发现的内质网应激条件下HCC细胞SMMC-7721差异表达的蛋白质3个与细胞凋亡、细胞周期以及细胞增殖有关,说明了内质网应激与HCC的病理生理密切相关,进一步明确相关蛋白在HCC中的作用机制,有望为HCC的诊治提供新的突破点。

4 参考文献

- 1 Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 379-384
- 2 Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999; 13: 1211-1233
- 3 Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18: 575-599
- 4 Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005; 569: 29-63
- 5 Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded

- protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 966-977
- 6 Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 234-246
  - 7 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
  - 8 Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 225-235
  - 9 Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L. Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 1099-1105
  - 10 Narjoz C, Marisa L, Imbeaud S, Paris A, Delacroix H, Beaune P, De Waziers I. Genomic consequences of cytochrome P450 2C9 overexpression in human hepatoma cells. *Chem Res Toxicol* 2009; 22: 779-787
  - 11 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* 2005; 5: 1411-1422
  - 12 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Okano T, Yamada M, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye. *Proteomics* 2006; 6: 1640-1653
  - 13 Shu H, Kang X, Guo K, Li S, Li M, Sun L, Gan L, Liu Y, Qin X. Diagnostic value of serum haptoglobin protein as hepatocellular carcinoma candidate marker complementary to  $\alpha$  fetoprotein. *Oncol Rep* 2010; 24: 1271-1276
  - 14 彭艳, 张霞, 王葵, 蒋平, 焦炳华, 倪健. 不同转移潜能肝癌细胞株的差异蛋白质组的二维液相色谱分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1482-1487
  - 15 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌. 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1684-1687
  - 16 Lai CW, Aronson DE, Snapp EL. BiP availability distinguishes states of homeostasis and stress in the endoplasmic reticulum of living cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 1909-1921
  - 17 Qin L, Wang Z, Tao L, Wang Y. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy* 2010; 6: 239-247
  - 18 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
  - 19 赵欣, 蒲小平, 耿兴超. 松果菊苷对帕金森病模型小鼠黑质. 纹状体蛋白表达影响的双向电泳分析. *中国药理学通报* 2008; 24: 28-32
  - 20 Ding SJ, Li Y, Shao XX, Zhou H, Zeng R, Tang ZY, Xia QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics* 2004; 4: 982-994
  - 21 Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 615-622
  - 22 范云峰, 谢虹, 梁建生. 双向电泳中4种常用染色方法的灵敏度比较. *扬州大学学报(农业与生命科学版)* 2008; 29: 80-83
  - 23 苗兰, 刘建勋, 李欣志, 潘映红. 中国实验小型猪冠心病模型的心肌组织蛋白质组学研究. *中国药理学通报* 2009; 25: 880-883
  - 24 Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 2006; 11: 5-13
  - 25 Scriven P, Brown NJ, Pockley AG, Wyld L. The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding? *J Mol Med* 2007; 85: 331-341
  - 26 Mann MJ, Hendershot LM. UPR activation alters chemosensitivity of tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 736-740
  - 27 Dai RY, Chen Y, Fu J, Dong LW, Ren YB, Yang GZ, Qian YW, Cao J, Tang SH, Yang SL, Wang HY. p28GANK inhibits endoplasmic reticulum stress-induced cell death via enhancement of the endoplasmic reticulum adaptive capacity. *Cell Res* 2009; 19: 1243-1257
  - 28 Chan SL, Tan KO, Zhang L, Yee KS, Ronca F, Chan MY, Yu VC. F1Aalpha, a death receptor-binding protein homologous to the *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein, FEM-1, is a caspase substrate that mediates apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 32461-32468
  - 29 Subauste MC, Sansom OJ, Porecha N, Raich N, Du L, Maher JF. Fem1b, a proapoptotic protein, mediates proteasome inhibitor-induced apoptosis of human colon cancer cells. *Mol Carcinog* 2010; 49: 105-113
  - 30 Zhang Y, Peng Z, Qiu G, Wang Z, Gu W. Overexpression of cyclin A in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBx gene integration. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002; 24: 353-355
  - 31 Wang X, Meng X, Sun X, Liu M, Gao S, Zhao J, Pei F, Yu H. Wnt/beta-catenin signaling pathway may regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Cycle* 2009; 8: 1567-1570
  - 32 Wang XH, Liu BR, Qu B, Xing H, Gao SL, Yin JM, Wang XF, Cheng YQ. Silencing STAT3 may inhibit cell growth through regulating signaling pathway, telomerase, cell cycle, apoptosis and angiogenesis in hepatocellular carcinoma: potential uses for gene therapy. *Neoplasia* 2011; 58: 158-171
  - 33 Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Hu WL, Xu RC. Targeting the Na(+)/K(+)-ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 743-751

#### ■同行评价

本文设计合理, 方法恰当, 内容新颖, 具有较好的临床指导意义.

编辑 李薇 电编 何基才

# 塞来昔布对肝癌HepG2细胞生长及KAI1/CD82蛋白表达的影响

崔荣花, 陈剑群, 孙旻, 孙忠志

## ■背景资料

原发性肝癌具有起病隐匿、发病率高、侵袭性强、预后差等特点, 手术治疗是目前最佳治疗手段, 但患者5年总生存率仍低于5%。传统的全身化疗药物不良反应较大, 临床疗效欠佳, 因此寻找对肝癌有效的治疗方法对于降低肝癌的发病率和死亡率具有重要的意义, 塞来昔布是一种新型非甾体类消炎药, 其抗肿瘤作用备受关注, 但其具体作用机制国内外研究尚不够全面。

崔荣花, 陈剑群, 孙旻, 孙忠志, 徐州医学院附属医院消化内科 江苏省徐州市 221002

崔荣花, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 课题设计由陈剑群、孙旻及崔荣花共同完成; 研究过程操作由崔荣花与孙忠志完成; 研究用试剂及分析工具由陈剑群提供; 数据分析由崔荣花完成; 本论文写作由崔荣花与陈剑群共同完成。

通讯作者: 陈剑群, 教授, 主任医师, 221002, 江苏省徐州市淮海西路99号, 徐州医学院附属医院消化内科。

xzjianqun@yahoo.com.cn

电话: 0516-85802326

收稿日期: 2011-03-02 修回日期: 2011-04-12

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-05-08

## Celecoxib inhibits cell growth and up-regulates KAI1/CD82 protein expression in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Rong-Hua Cui, Jian-Qun Chen, Min Sun, Zhong-Zhi Sun

Rong-Hua Cui, Jian-Qun Chen, Min Sun, Zhong-Zhi Sun, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Jian-Qun Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 99 West Huaihai Road, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. xzjianqun@yahoo.com.cn

Received: 2011-03-02 Revised: 2011-04-12

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of celecoxib on cell proliferation, apoptosis and KAI1/CD82 expression in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

**METHODS:** After HepG2 cells were treated with different concentrations of celecoxib (12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0  $\mu\text{mol/L}$ ), cell proliferation was measured by CCK-8 assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of KAI1/CD82 protein was detected by Western blot.

**RESULTS:** Treatment with celecoxib significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells

( $P < 0.05$ ) in a dose- and time-dependent manner, and the reduced rate of growth of HepG2 cells treated with 200.0  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib for 72 h was 69.23%. Treatment with celecoxib induced apoptosis of HepG2 cells in a dose-dependent manner. The apoptosis rates of cells treated with 12.5, 50.0, or 200.0  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib for 48 h were significantly higher than that of control cells ( $18.79\% \pm 2.37\%$ ,  $46.94\% \pm 0.78\%$ ,  $69.48\% \pm 0.63\%$  vs  $16.72\% \pm 1.54\%$ , all  $P < 0.05$ ). Treatment with celecoxib significantly up-regulated the expression of KAI1/CD82 protein in a dose-dependent manner (48 h:  $0.394 \pm 0.007$ ,  $0.886 \pm 0.057$ ,  $1.099 \pm 0.079$  vs  $0.321 \pm 0.020$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Celecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis possibly by up-regulating KAI1/CD82 protein expression in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

**Key Words:** HepG2 cells; Celecoxib; KAI1/CD82; Cell proliferation; Apoptosis

Cui RH, Chen JQ, Sun M, Sun ZZ. Celecoxib inhibits cell growth and up-regulates KAI1/CD82 protein expression in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1336-1341

## 摘要

**目的:** 探讨塞来昔布对人肝癌HepG2细胞增殖、凋亡以及KAI1/CD82蛋白表达的影响。

**方法:** 用不同浓度的塞来昔布(12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ )干预人肝癌HepG2细胞24、48、72 h后, 采用CCK-8法测定HepG2细胞体外增殖活性; 利用流式细胞术检测细胞凋亡率; 应用Western blot检测KAI1/CD82蛋白表达变化。

**结果:** CCK-8法证实塞来昔布可呈时间与剂量依赖性抑制肝癌HepG2细胞增殖, 200.0  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用72 h后, 抑制率达到最大(69.23%)。流式细胞术检测发现12.5、50.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布干预肝癌HepG2细胞48 h后, 塞来昔布可呈剂量依赖性诱导

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科



肝癌HepG2细胞凋亡, 凋亡率均高于对照组(18.79%±2.37%, 46.94%±0.78%, 69.48%±0.63% vs 16.72%±1.54%, 均 $P<0.05$ ). Western blot结果显示塞来昔布可呈剂量依赖性增加KAI1/CD82表达, 较对照组明显升高, 差异有统计学差异(48 h: 0.394±0.007, 0.886±0.057, 1.099±0.079 vs 0.321±0.020, 均 $P<0.05$ ).

**结论:** 塞来昔布可通过上调KAI1/CD82蛋白的表达, 诱导肝癌HepG2细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖.

**关键词:** 肝癌HepG2细胞; 塞来昔布; KAI1/CD82; 细胞增殖; 细胞凋亡

崔荣花, 陈剑群, 孙旻, 孙忠志. 塞来昔布对肝癌HepG2细胞生长及KAI1/CD82蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1336-1341  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1336.asp>

## 0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, Cox)又称前列腺素内过氧化物合成酶(prostaglandin H synthase, PGHS), 参与了恶性肿瘤发生、发展、侵袭、转移的全过程<sup>[1,2]</sup>, 其中COX-2是一种诱导酶, 在胃癌、肝癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中均有表达<sup>[3]</sup>, 塞来昔布作为高选择性COX-2抑制剂的一种, 与传统非甾体类消炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)相比具有高效低毒特点. NSAIDs抗肿瘤增殖和诱导肿瘤细胞凋亡作用已经为国内外研究所证实<sup>[4]</sup>, 已成为结肠癌、肝癌、肺癌等多种恶性肿瘤药物治疗的新选择. 已有研究证实塞来昔布能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导其凋亡、抑制肿瘤细胞新生血管形成及肿瘤细胞的迁移和黏附等<sup>[5,6]</sup>, 但其具体机制仍不能明确. KAI1/CD82是近几年国内外研究比较热的一种特异性肿瘤抑制基因, 最初在研究前列腺癌时发现<sup>[7]</sup>, 研究证实它能够参与细胞内信号通路等抑制肿瘤侵袭转移<sup>[8]</sup>. 而早在1998年Guo等<sup>[9]</sup>就已经证实, KAI1/CD82基因的表达与肝癌细胞的浸润、转移呈负相关. 因此我们以塞来昔布作用于肝癌HepG2细胞, 观察其对肝癌细胞的增殖抑制、诱导凋亡等作用, 并观察KAI1/CD82蛋白的表达变化情况, 为塞来昔布的体内研究提供更多的实验和理论依据, 亦为肝癌的治疗提供新的思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG2细胞株由徐州医学院肿

瘤科实验室保存; 塞来昔布购于美国Sigma公司; CCK-8为日本同仁化学研究所产品; 兔抗人KAI1/CD82单克隆抗体为北京博奥森公司产品; Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒为Biovision公司产品; RPMI 1640为美国Gibco公司产品; 胰酶、DMSO为美国Sigma公司产品; 小牛血清购于杭州四季青公司.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 细胞常规培养于含有100 mL/L小牛血清、青霉素-链霉素溶液(100×)的RPMI 1640的培养液中, 在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养, 2-3 d更换细胞培养液, 待细胞铺满瓶底时, 以2.5 g/L胰酶消化、传代. 取对数生长期细胞进行实验.

1.2.2 分组: 塞来昔布溶解于DMSO, 用RPMI 1640培养液稀释到12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L, 并确保DMSO浓度最终<0.1%, 并设阴性对照组(0 μmol/L).

1.2.3 CCK-8法检测肝癌细胞增殖抑制率: 取对数生长期HepG2细胞以 $1 \times 10^8$ 个/L接种于96孔培养板, 每孔100 μL, 置37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下待24 h细胞贴壁生长后, 弃上清, 按照1.2.2实验分组设计分组, 加入含有不同浓度塞来昔布的培养液, 每组设6个复孔, 重复2板, 分别培养至24、48、72 h弃上清, 每孔加入CCK-8溶液10 μL, 继续培养4 h, 取出培养板, 酶标仪测定450 nm处的吸光度, 计算抑制率: 抑制率 = (1-给药组A值/阳性对照组A值) × 100%.

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率: 取对数生长期HepG2细胞以每孔 $2 \times 10^8$ 个/L的细胞密度接种于6孔板, 分设阴性对照组(0 μmol/L), 塞来昔布组(12.5、50.0、200.0 μmol/L), 干预48 h后收集细胞, 用2.5 g/L胰酶+0.02% EDTA消化离心细胞, 1 000 r/min, 4℃离心5 min, 弃上清, PBS洗涤2次后, 将细胞重悬于500 μL Binding Buffer中, 加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 轻轻混匀, 室温避光5 min, 流式细胞仪检测肝癌HepG2细胞凋亡率.

1.2.5 Western blot检测KAI1/CD82蛋白表达: 收集对数生长期肝癌HepG2细胞以每孔 $2 \times 10^8$ 个/L的细胞密度接种于6孔板, 分设阴性对照组(0 μmol/L), 塞来昔布组(12.5、50.0、200.0 μmol/L), 分别加药干预48 h后, 置于冰上提取蛋白, 采用Forlin法测蛋白浓度后, 上样于SDS-PAGE电泳分离后转移至硝酸纤维素滤膜, 经抗原抗体反应、显色后于ODSEEY上机扫描, Im-

### ■ 研发前沿

塞来昔布抗肿瘤的作用机制是国内外研究热点, 且以体外实验居多, 因此体内实验抗肿瘤效果、临床合适应用剂量及其不良反应问题仍需进一步证实.

## ■ 相关报道

Roy等研究证实塞来昔布能够增强肝癌细胞株HepG2对抗肿瘤药物多柔比星的敏感性,其机制是通过COX-2所介导的下调MDR1的表达,而MDR1是一种多重耐药基因. 这为塞来昔布与其他药物联合应用抗肿瘤提供了新的思路.

表 1 不同浓度塞来昔布作用24、48、72 h后对肝癌HepG2细胞抑制作用 (mean  $\pm$  SD, %,  $n = 6$ )

分组	24 h		48 h		72 h	
	$A_{450}$	抑制率(%)	$A_{450}$	抑制率(%)	$A_{450}$	抑制率(%)
阴性对照组	0.720 $\pm$ 0.039	0.00	0.785 $\pm$ 0.021	0.00	0.722 $\pm$ 0.028	0.00
塞来昔布						
12.5 $\mu$ mol/L	0.599 $\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	16.20	0.574 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	21.64	0.564 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>	26.16
25.0 $\mu$ mol/L	0.524 $\pm$ 0.026 <sup>b</sup>	26.89	0.507 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	33.08	0.494 $\pm$ 0.025 <sup>b</sup>	34.82
50.0 $\mu$ mol/L	0.449 $\pm$ 0.042 <sup>b</sup>	37.06	0.465 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	39.90	0.432 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	40.03
100.0 $\mu$ mol/L	0.376 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>	47.49	0.363 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>	53.52	0.325 $\pm$ 0.030 <sup>b</sup>	54.89
200.0 $\mu$ mol/L	0.269 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>	62.41	0.245 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	68.57	0.222 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	69.23

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 阴性对照组.

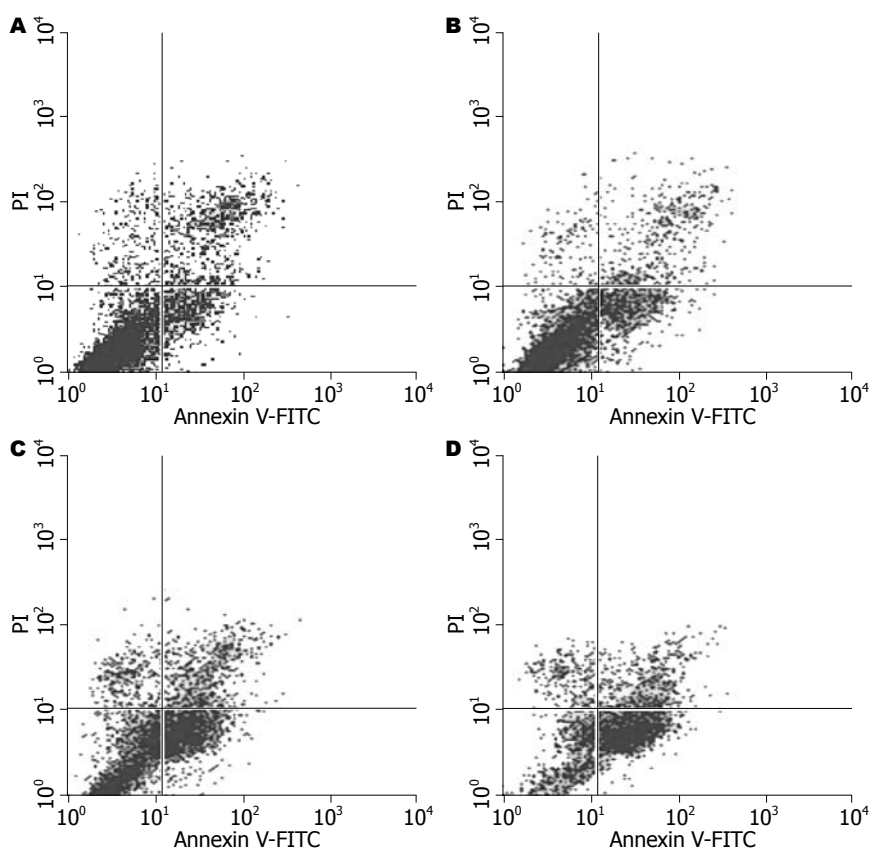


图 1 塞来昔布对肝癌HepG2细胞凋亡的影响. A: 阴性对照组; B: 塞来昔布12.5  $\mu$ mol/L组; C: 塞来昔布50.0  $\mu$ mol/L组; D: 塞来昔布200.0  $\mu$ mol/L组.

age J软件半定量分析,测定其 $A$ 值. 实验过程中,以 $\beta$ -actin作为内参进行检测,保证实验结果的准确性.

**统计学处理** 采用SPASS16.0进行统计分析,各组数据以mean  $\pm$  SD表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 塞来昔布对肝癌HepG2细胞生长的影响** 不同浓度的塞来昔布作用于肝癌HepG2细胞24、48、72 h后, CCK-8结果检测显示: 12.5  $\mu$ mol/L

塞来昔布作用肝癌HepG2细胞24 h后细胞增殖抑制率高于对照组( $P < 0.05$ ),且随塞来昔布作用时间的延长和浓度的增加,细胞抑制率增强,与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ). 即塞来昔布可呈时间和剂量依赖性抑制肝癌HepG2细胞的增殖(表1).

**2.2 塞来昔布对肝癌HepG2细胞凋亡的影响** 12.5、50.0、200.0  $\mu$ mol/L浓度塞来昔布作用于肝癌HepG2细胞48 h后,细胞凋亡率均高于对照组(18.79%  $\pm$  2.37%, 46.94%  $\pm$  0.78%, 69.48%  $\pm$  0.63% vs 16.72%  $\pm$  1.54%, 均 $P < 0.05$ , 图1).

**2.3 塞来昔布上调KAI1/CD82蛋白的表达** 肝癌

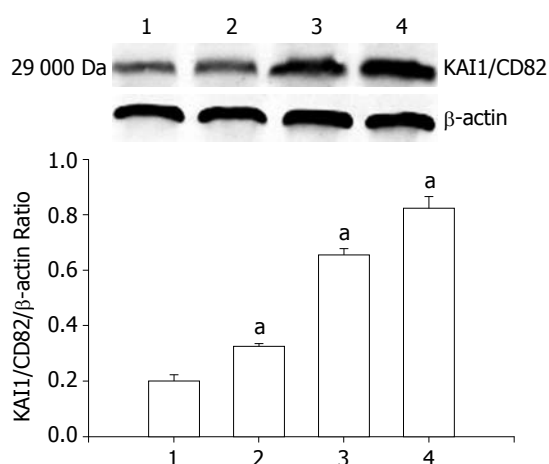


图2 Western blot检测塞来昔布作用于肝癌HepG2细胞后KAI1/CD82的表达。1: 阴性对照组; 2: 塞来昔布12.5 μmol/L; 3: 塞来昔布50.0 μmol/L; 4: 塞来昔布200.0 μmol/L。\* $P < 0.05$  vs 阴性对照组。

HepG2细胞经12.5、50.0、200.0 μmol/L塞来昔布处理48 h后, KAI1/CD82蛋白表达量较对照组明显提高, 差异具有统计学意义( $0.394 \pm 0.007$ ,  $0.886 \pm 0.057$ ,  $1.099 \pm 0.079$  vs  $0.321 \pm 0.020$ , 均  $P < 0.05$ , 图2)。

### 3 讨论

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是恶性肿瘤致死的最常见原因之一, 发病率约每年30/10万。近二十年来许多国家肝癌的发病率呈上升趋势, 手术切除是主要治疗手段, 但预后差。且很多患者明确诊断时已是晚期, 患者5年生存率不足5%。因此积极探索新的治疗方法具有重要的临床意义<sup>[10,11]</sup>。

KAI1/CD82是近几年来发现的特异性肿瘤抑制基因, 首先从前列腺癌细胞杂交出并命名, 其定位于人类染色体11p11.2-13上, 全长约80 kb, 包含10个外显子, 9个内含子以及外显子10之后的DNA的8 kb, 该基因一个显著的特点是: 在9个内含子当中, 内含子5最小, 约0.2 kb, 内含子1最长, 约29 kb, 相当于其他内含子长度之和。KAI1/CD82属于跨膜4超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)成员<sup>[12,13]</sup>, 他与其他TM4SF成员如CD9、CD63等在分子的重排和细胞的形态、聚集、黏附、迁移等生理及病理活动中发挥重要作用<sup>[14,15]</sup>, 其下调与许多恶性肿瘤发生、发展、转移等密切相关<sup>[16]</sup>。KAI1/CD82抑制食管癌<sup>[17]</sup>、胃癌<sup>[18]</sup>、胰腺癌<sup>[19]</sup>、大肠腺癌<sup>[20]</sup>细胞等侵袭和转移已为国内外研究所证实。而与原发性肝癌的相关研究成为近几年的热点。

塞来昔布是一种新型NSAIDs, 属于高选择性COX-2抑制剂的一种, 因其在对抗肿瘤的同时能够克服传统非甾体类药物长期使用所导致的胃肠道出血、消化性溃疡等不良反应而为研究者所关注, 塞来昔布在各种恶性肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤侵袭、转移方面国内外已有所研究, 如Tsutsumi等<sup>[21]</sup>研究发现选择性COX-2抑制剂塞来昔布能抑制胃癌的凋亡, 其机制是通过上调一种内质网伴侣蛋白的表达, 而这种内质网伴侣蛋白能够抑制塞来昔布所诱导的肿瘤细胞凋亡。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌离子依赖性内肽酶, 他可通过水解细胞外基质促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 而其抑制剂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, 两者是评价肝癌细胞转移能力的良好指标之一。殷积彬等<sup>[22]</sup>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抑制剂塞来昔布的抗肿瘤效果, 结果显示塞来昔布能够通过抑制肝癌细胞内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, 达到抑制肿瘤细胞转移的作用。塞来昔布还能够通过抑制NF-κB及VEGF蛋白的表达来抑制胃癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤新生血管形成<sup>[23]</sup>。Xu等研究证实塞来昔布可以通过花生四烯酸代谢途径以剂量和时间依赖方式抑制小鼠肝癌H22细胞增殖<sup>[24]</sup>, 而卢栋等通过Western blot等实验方法证实塞来昔布能够促进肝癌HepG2细胞凋亡, 而其途径是通过抑制细胞NF-κB DNA结合活性和NF-κB p65蛋白表达来实现的<sup>[25]</sup>, 另有报道研究证实塞来昔布能够增强肝癌细胞株HepG2对抗肿瘤药物多柔比星的敏感性, 其机制是通过COX-2所介导的下调多重耐药基因MDR1的表达<sup>[26]</sup>, 可见塞来昔布在诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制其转移的途径研究不一, 而其与肿瘤抑制基因的报道甚少。

本实验我们以肝癌细胞系HepG2为靶细胞, 探讨塞来昔布对肝癌细胞的增殖抑制、诱导凋亡及对KAI1/CD82蛋白表达作用的影响。通过增殖抑制实验发现, 12.5 μmol/L塞来昔布持续作用48 h抑制率为21.64%, 作用72 h抑制率为26.16%, 而浓度递增至200.0 μmol/L时, 抑制率达68.57%, 塞来昔布对肝癌HepG2的增殖抑制呈剂量和时间依赖效应。这和王智等研究塞来昔布对肝癌SMMC7721细胞的生长抑制作用相

### ■创新盘点

KAI1/CD82是近几年来发现的特异性肿瘤抑制基因, 其下调与肝癌发生、发展、转移等密切相关, 本研究探讨塞来昔布可以通过上调KAI1/CD82的表达从而达到抗肝癌目的, 这为塞来昔布肿瘤治疗提供新的作用靶点。

### ■应用要点

本实验为肝癌的临床治疗提供了新的思路和可靠的理论依据,但本实验就塞来昔布抑制肿瘤细胞增殖的具体细胞因子及是否存在其他作用途径,体内实验最适药物浓度均值得进一步研究。

一致<sup>[27]</sup>。细胞凋亡是细胞在生理或病理条件下,由基因调控的主动方面的自我消亡过程。相关研究表明细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及转归密切相关,诱导肿瘤细胞发生凋亡是部分抗肿瘤化疗药物的作用机制之一<sup>[28]</sup>。我们选用12.5、50.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ 低中高3个浓度塞来昔布通过流式细胞仪检测发现细胞凋亡率与药物浓度成正比,200.0  $\mu\text{mol/L}$ 凋亡率为69.48%,同时Western blot法观察到12.5、50.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ 剂量组塞来昔布均能促进人KAI1/CD82蛋白的表达,据此我们推测塞来昔布也可通过上调KAI1/CD82蛋白的表达而发挥抗肿瘤作用。但其具体诱导途径国内外研究不一,Zhou等<sup>[29]</sup>研究认为KAI1/CD82本身的糖基化和软酯酸化是其抑制肿瘤细胞黏附、运动和侵袭转移作用的重要因素。其还可以通过控制细胞表面分子活动和信号传导影响细胞转移,抑制肿瘤细胞的运动<sup>[30]</sup>;而Zhang等<sup>[31]</sup>研究证实KAI1/CD82能够通过FAK-Lyn-p130CAS-CrK II信号通路(FAK为局部黏附激酶,Lyn为Src酪氨酸激酶,为反应的底物)抑制制肿瘤细胞转移,具有趋触性和趋化性的FAK-Lyn-p130CAS-CrK II路径是细胞活动的分子开关,其通过调节肌动蛋白细胞骨架的组织结构而决定细胞的运动方向,而KAI1通过抑制活化的p130CAS-CrK II复合物的形成而抑制细胞的活动性;而另有研究发现KAI1/CD82也可通过干预介导肿瘤病理过程的PI3K/Akt/mTOR信号通路下调Rac1蛋白的表达从而抑制细胞转移和肿瘤的浸润<sup>[32]</sup>。通过本实验研究我们认为,塞来昔布能够通过上调KAI1/CD82蛋白的表达而抑制肝癌细胞侵袭转移,这为肝癌的临床治疗提供了可靠的理论依据,但其具体诱导途径复杂,需更深入的研究。

**志谢:** 感谢王青勋、张志峰等同志在实验中给予的大力帮助。

### 4 参考文献

- Smakman N, Kranenburg O, Vogten JM, Bloemendaal AL, van Diest P, Borel Rinkes IH. Cyclooxygenase-2 is a target of KRASD12, which facilitates the outgrowth of murine C26 colorectal liver metastases. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 41-48
- Castells A, Balaguer F, Gonzalo V, Castellví-Bel S. [Cyclooxygenase 2 and colorectal cancer: therapeutic implications]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 280-284
- Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 233-244

- Koga H. Hepatocellular carcinoma: is there a potential for chemoprevention using cyclooxygenase-2 inhibitors? *Cancer* 2003; 98: 661-667
- Sahin M, Sahin E, Gümüslü S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. *Angiology* 2009; 60: 242-253
- 刘江伟, 张永久, 李开宗, 窦科峰, 许永华, 张东, 闰兵. COX-2抑制剂联合survivin反义寡核苷酸抗胰腺癌BxPC-3细胞的效应. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3178-3183
- Ueda T, Ichikawa T, Tamaru J, Mikata A, Akakura K, Akimoto S, Imai T, Yoshie O, Shiraiishi T, Yatani R, Ito H, Shimazaki J. Expression of the KAI1 protein in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 149: 1435-1440
- Yang JM, Peng ZH, Si SH, Liu WW, Luo YH, Ye ZY. KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int* 2008; 28: 132-139
- Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 1481-1488
- 刘宝瑞, 王婷婷, 钱晓萍. 原发性肝癌分子靶向治疗研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 992-997
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995; 268: 884-886
- Malik FA, Sanders AJ, Jiang WG. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis. *Histol Histopathol* 2009; 24: 519-530
- Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett* 2006; 240: 183-194
- Gao AC, Lou W, Dong JT, Barrett JC, Danielpour D, Isaacs JT. Defining regulatory elements in the human KAI1 (CD 82) metastasis suppressor gene. *Prostate* 2003; 57: 256-260
- Bari R, Zhang YH, Zhang F, Wang NX, Stipp CS, Zheng JJ, Zhang XA. Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* 2009; 174: 647-660
- Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M, Imamura M. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 1168-1173
- Zhao ZS, Wang YY, Ye ZY, Tao HQ. Prognostic value of tumor-related molecular expression in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2009; 15: 589-596
- Xu JH, Guo XZ, Ren LN, Shao LC, Liu MP. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1126-1132
- Liu L, Wu DH, Li ZG, Yang GZ, Ding YQ. Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1231-1236
- Tsutsumi S, Namba T, Tanaka KI, Arai Y, Ishihara T, Aburaya M, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Celecoxib upregulates endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells. *Oncogene* 2006; 25: 1018-1029

- 22 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: 1206-1210
- 23 王云峰, 李健, 葛成华, 王世伟, 张建军, 夏强, 郭克建. 塞来昔布对不表达环氧合酶-2的胃癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3583-3589
- 24 Xu Z, Zhang M, Lv X, Xiang D, Zhang X, Chen L. The inhibitory effect of celecoxib on mouse hepatoma H22 cell line on the arachidonic acid metabolic pathway. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 603-609
- 25 卢栋, 杜玉开, 李永华, 纪龙, 李龙嫫, 余红平. 塞来昔布对人肝癌细胞株HepG2细胞核转录因子- $\kappa$ B活性及蛋白表达的抑制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1793-1796
- 26 Roy KR, Reddy GV, Maitreyi L, Agarwal S, Achari C, Vali S, Reddanna P. Celecoxib inhibits MDR1 expression through COX-2-dependent mechanism in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 903-911
- 27 王智, 陈洪, 夏国豪. 塞来昔布抑制肝癌细胞株增殖及其机制的实验研究. 临床肿瘤学杂志 2007; 12: 251-254
- 28 Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12: 1543-1568
- 29 Zhou B, Liu L, Reddivari M, Zhang XA. The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res* 2004; 64: 7455-7463
- 30 Miranti CK. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell Signal* 2009; 21: 196-211
- 31 Zhang XA, He B, Zhou B, Liu L. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem* 2003; 278: 27319-27328
- 32 Sakai O, Kanda K, Takamizawa K, Sato T, Yaku H, Nakayama Y. Faster and stronger vascular &quot; Biotube&quot; graft fabrication in vivo using a novel nicotine-containing mold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 90: 412-420

■同行评价  
本文思路清晰, 设计合理, 有一定的理论意义和潜在的临床价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

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

# siRNA沉默Bmi-1表达对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用

冷政伟, 殷涛, 夏清华, 张万里, 王国斌, 陶凯雄

## ■背景资料

最初发现Bmi-1基因参与了胚胎发育、干细胞功能的维持和抗凋亡作用, 进一步研究显示其在多种肿瘤中高表达, 且高表达Bmi-1与肿瘤的耐药、淋巴转移、生存率负相关, 提示该基因在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的调控作用。以此为线索, 研究发现Bmi-1基因可以促进肿瘤细胞的耐药、增殖、克隆形成等恶性生物学行为, 并且参与了正常细胞的恶性转化。以上研究提示Bmi-1可以作为肿瘤基因治疗的靶点以及肿瘤的诊断和预后指标。

## ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

冷政伟, 殷涛, 夏清华, 张万里, 王国斌, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022

冷政伟, 在读博士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 本课题实验操作及本文撰写由冷政伟完成; 本课题由殷涛设计; 夏清华提供了实验指导和分析工具; 陶凯雄与王国斌对文章提出了批评性审阅及部分实验试剂; 数据分析由张万里完成。

通讯作者: 陶凯雄, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科。

tao\_kaixiong@163.com

收稿日期: 2010-12-06 修回日期: 2011-04-14

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## SiRNA-mediated down-regulation of Bmi-1 expression inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells

Zheng-Wei Leng, Tao Yin, Qing-Hua Xia, Wan-Li Zhang, Guo-Bin Wang, Kai-Xiong Tao

Zheng-Wei Leng, Tao Yin, Qing-Hua Xia, Wan-Li Zhang, Guo-Bin Wang, Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. tao\_kaixiong@163.com

Received: 2010-12-06 Revised: 2011-04-14

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the impact of knockdown of the B-cell specific Moloney leukemia virus insertion site 1 (Bmi-1) gene on the biological behavior of human pancreatic cancer cells.

**METHODS:** An expression vector carrying a small interference RNA (siRNA) targeting the Bmi-1 gene was constructed and transfected into human pancreatic cancer PANC-1 cells. After transfection, Bmi-1 protein expression was detected by Western blot; cell proliferation was evaluated by MTT assay; and cell cycle progression and apoptosis were examined by flow cytometry.

**RESULTS:** PANC-1 cells transfected with the recombinant vector had more significant cell

cycle arrest ( $G_0/G_1$  phase:  $60.480\% \pm 1.545\%$  vs  $40.520\% \pm 2.865\%$ ; S phase:  $35.740\% \pm 2.074\%$  vs  $12.68\% \pm 2.654\%$ ), increased apoptosis ( $21.670\% \pm 2.948\%$  vs  $7.870\% \pm 0.900\%$ ), and decreased Bmi-1 expression ( $175.39 \pm 1.76$  vs  $318.54 \pm 3.53$ ,  $P < 0.05$ ) compared to control cells.

**CONCLUSION:** SiRNA-mediated down-regulation of Bmi-1 expression induces cell cycle arrest and increases apoptosis in PANC-1 cells. Bmi-1 might serve as a target for gene therapy of pancreatic cancer.

**Key Words:** Pancreatic cancer; B-cell specific Moloney leukemia virus insertion site 1; Small interference RNA; Flow cytometry

Leng ZW, Yin T, Xia QH, Zhang WL, Wang GB, Tao KX. SiRNA-mediated down-regulation of Bmi-1 expression inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1342-1346

## 摘要

**目的:** 探讨运用RNAi技术沉默Bmi-1基因对胰腺癌细胞恶性行为的影响, 为胰腺癌基因治疗提供新的靶点和思路。

**方法:** 构建反义Bmi-1真核表达载体转染人胰腺癌PANC-1细胞, 运用荧光显微镜下观察、MTT、Western blot、流式细胞术检测转染效果及细胞周期、凋亡变化。

**结果:** 成功构建反义Bmi-1真核表达载体并且转染后细胞Bmi-1表达明显下降( $175.39 \pm 1.76$  vs  $318.54 \pm 3.53$ ,  $P < 0.05$ ), 实验组细胞与对照组相比, 增殖受到抑制, 周期出现阻滞( $G_0/G_1$ :  $60.480\% \pm 1.545\%$  vs  $40.520\% \pm 2.865\%$ ; S:  $35.740\% \pm 2.074\%$  vs  $12.68\% \pm 2.654\%$ , 均 $P < 0.05$ ), 凋亡明显增加( $21.670\% \pm 2.948\%$  vs  $7.870\% \pm 0.900\%$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** Bmi-1的siRNA能明显抑制Bmi-1的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。Bmi-1可作为胰腺癌基因治疗的靶点。

**关键词:** 胰腺癌; B细胞特异性莫洛尼氏白血病毒插入位点1; 小干扰RNA; 流式细胞术

冷政伟, 殷涛, 夏清华, 张万里, 王国斌, 陶凯雄. siRNA沉默Bmi-1表达对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1342-1346  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1342.asp

## 0 引言

肿瘤的发生发展是多基因多步骤参与的结果, B细胞特异性莫洛尼氏白血病病毒插入位点1(B-cell specific moloney leukemia virus insertion site 1, Bmi-1)属于PcG(polycomb group)家族, 参与了细胞DNA损伤修复、细胞周期和凋亡调控等行为. 近年来研究发现Bmi-1在肝癌、肺癌、结肠癌、淋巴瘤胰腺癌等多种肿瘤中高表达, 提示Bmi-1在肿瘤发生发展以及基因治疗等方面可能具有重要作用, 而有望成为肿瘤基因治疗重要的靶点, 引起了学者的广泛关注. RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是近年来迅速发展起来的基因沉默技术, 通过合成与靶基因同源的小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)并转染入细胞, 导致靶基因mRNA的降解而达到基因沉默的效果, 在肿瘤基因治疗中已被广泛运用. 我们通过该技术转染Bmi-1 siRNA入胰腺癌PANC-1细胞中, 并观察对其细胞恶性生物学行为的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌PANC-1细胞株由本实验室提供; 细胞凋亡检测试剂盒(凯基, 中国); Mouse Bmi-1 antibody(Santa, sc-81201); Mouse GAPDH antibody(ProMab, Mab-2005079); Goat Anti Mouse IgG/HRP等.

### 1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计合成: 由上海吉凯基因技术有限公司合成; 根据Bmi-1的编码序列设计并合成靶向沉默Bmi-1的siRNA序列5'-ATGAAGAGA-AGAAGGGATT-3', 5'-AATGGACATACCTA-ATACT-3', 将其克隆至慢病毒载体pSuper-retro, 构建编码Bmi-1 siRNA的病毒载体pSuper-retro-Bmi-1对照组为pSuper-retro-GFP载体.

1.2.2 细胞培养及转染: 取对数生长期细胞, 在生物安全柜中严格按照转染说明书操作. 取MOI = 60, 转染48 h后观察细胞无明显异常后进行后续实验.

1.2.3 MTT检测细胞增殖: 取1 000个细胞干扰48 h后每孔加入20  $\mu$ L MTT溶液(5 g/L, 即0.5% MTT), 继续培养4 h. 终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入150  $\mu$ L DMSO, 使结晶物充分溶解. 在490 nm处测量各孔的A值, 分别以转染时

表 1 沉默Bmi-1后细胞凋亡变化(% , mean  $\pm$  SD)

分组	早期凋亡	晚期凋亡
实验组	0.507 $\pm$ 0.147	21.670 $\pm$ 2.948 <sup>a</sup>
对照组	0.577 $\pm$ 0.339	7.870 $\pm$ 0.900

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

间、A值为横、纵坐标, 绘制细胞生长曲线.

1.2.4 Western blot检测Bmi-1的蛋白表达: 用RIPA提取液提取靶细胞中的蛋白质后行SDS-PAGE电泳, 免疫印迹-转膜, 一抗与蛋白质结合, 酶标记的二抗与一抗结合, 最后化学发光得到条带.

1.2.5 流式细胞术: 消化收集细胞加入300  $\mu$ L binding buffer悬浮细胞, 加入3  $\mu$ L Annexin V-APC混匀后加入3  $\mu$ L PI混匀, 室温避光反应15 min, 1 h内检测细胞凋亡情况. 收集细胞, 加0.6 mL PBS液重悬细胞, 再加1.4 mL冰无水乙醇涡旋, 使细胞分散, 然后置4  $^{\circ}$ C过夜, PBS洗1次细胞后收集, 加入264  $\mu$ L PBS重悬细胞, 混匀, 再加入PI(10 $\times$ )30  $\mu$ L以及RNA酶(50 $\times$ )6  $\mu$ L, 总体积为300  $\mu$ L, 常温避光反应10 min, 30 min内检测细胞周期.

**统计学处理** 所有实验重复3次, Western blot条带以Gel pro4.0版凝胶吸光度分析软件进行分析, 测其L4值. 所有结果用SPSS11.0软件行 $t$ 检验, 取 $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

2.1 荧光倒置显微镜下观察 转染48 h后各组细胞形态良好, 转染后细胞没有出现明显不良反应, 细胞转染率较高, 能满足实验要求(图1).

2.2 Western blot检测Bmi-1的蛋白表达 干扰后Bmi-1蛋白有明显的下降(175.39  $\pm$  1.76 vs 318.54  $\pm$  3.53,  $P < 0.05$ , 图2).

2.3 MTT检测沉默Bmi-1对细胞增殖的影响 转染后PANC-1细胞在对数生长期(12-36 h)的增殖受到明显抑制, 且在36-72 h之间转染细胞的增殖仍然被抑制(图3). 提示在转染后细胞近、远期增殖能力减弱.

2.4 细胞周期、凋亡变化 与对照组相比, 实验组细胞晚期凋亡明显增加( $P < 0.05$ , 图4, 表1)和G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S期阻滞( $P < 0.05$ , 图5, 表2).

## 3 讨论

胰腺癌是消化系统高度恶性的肿瘤, 其5年生存率极低<sup>[1,2]</sup>. 寻求对胰腺癌的基因靶向治疗已经成为了研究热点. 随着研究的不断深入, 近年来

**■ 研发前沿**  
胰腺癌是消化系统高度恶性的肿瘤, 其5年生存率极低. 寻求对胰腺癌的基因靶向治疗已经成为了研究热点.

### ■相关报道

Xiao等运用RNAi技术成功下调Bmi-1表达,而使胃癌细胞生长和侵袭能力减弱。

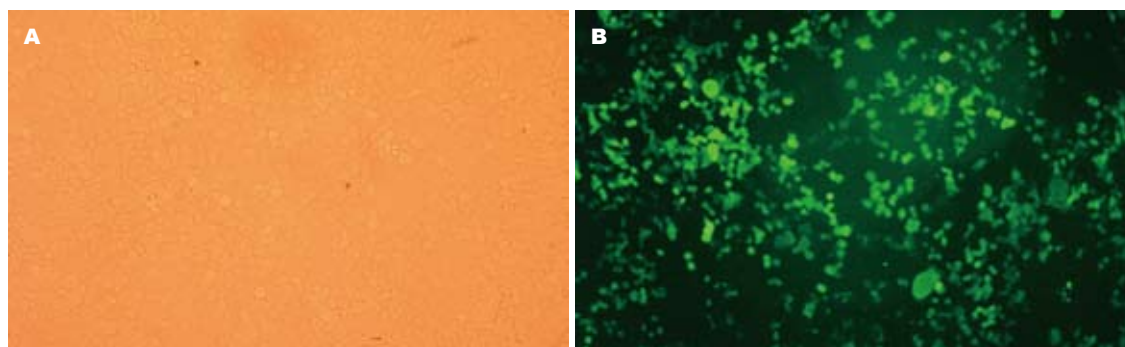


图1 荧光倒置显微镜下观察结果. A: 明视野; B: 荧光视野( $\times 50$ ). MOI = 60, 感染率在90%左右.

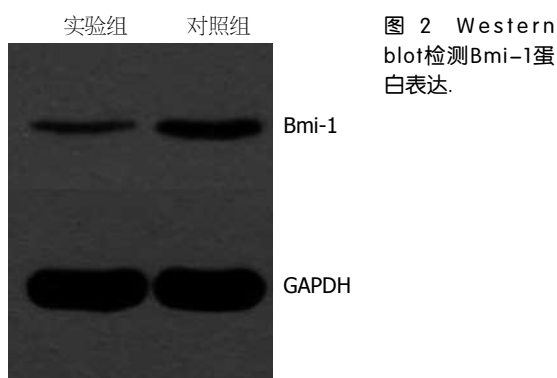


图2 Western blot检测Bmi-1蛋白表达.

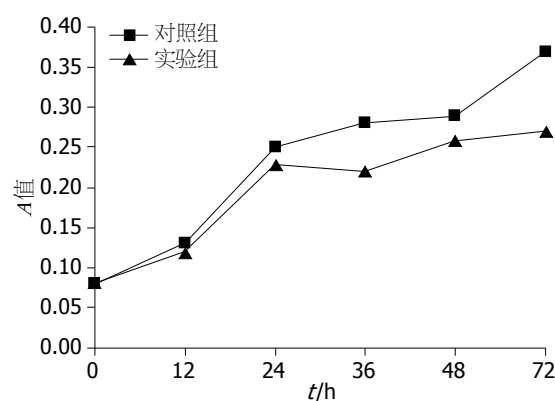


图3 MTT结果显示沉默Bmi-1对细胞增殖的影响.

表2 沉默Bmi-1后细胞周期变化 (% , mean  $\pm$  SD)

分组	G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> M	S
实验组	60.480 $\pm$ 1.545 <sup>a</sup>	26.850 $\pm$ 1.946	12.68 $\pm$ 2.654 <sup>a</sup>
对照组	40.520 $\pm$ 2.865	23.750 $\pm$ 0.881	35.740 $\pm$ 2.074

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

有观点认为胰腺癌起源于肿瘤干细胞<sup>[3-5]</sup>. 干细胞在增殖、多向分化、衰老、凋亡过程中都有严格的调控机制, 在细胞生长过程中这些机制紊乱可以导致肿瘤的发生. 研究显示肿瘤细胞的增殖与干细胞的自我更新过程可能由相同的信号通路所调控<sup>[6]</sup>. 原癌基因Bmi-1参与沉默与细胞衰老、凋亡、死亡相关的基因, 参与了干细胞的增殖、分化与衰老<sup>[7]</sup>, 被认为与肿瘤的发生发展有着密切的联系. 目前Bmi-1的研究主要集中在两个方面: (1)维持干细胞分化功能和抗凋亡作用: 如在造血干细胞<sup>[8]</sup>、神经干细胞中就高表达Bmi-1, 缺乏Bmi-1的鼠出生后在造血功能, 骨骼形成, 神经系统功能等方面表现出缺陷. Fasano等<sup>[9]</sup>已经证实了Bmi-1在维持神经干细胞功能方面的作用. Cordisco等<sup>[10]</sup>证实由于Bmi-1的下调细胞衰老明显增加. 研究人员发现在小鼠乳腺上皮细胞的发育过程中, Bmi-1也

起非常重要的作用<sup>[11]</sup>. 以上研究显示了Bmi-1在维持干细胞正常功能中的重要作用, 则在同样属于干细胞的肿瘤干细胞中Bmi-1是否也扮演了重要角色呢? Bmi-1在肿瘤细胞中有什么作用? 与肿瘤的耐药、复发、远处转移等有何相关性? 近年来, 在该领域的研究取得了一定的进展; (2)促进肿瘤的恶性生物学行为: 最初发现Bmi-1可与c-Myc癌基因协同在鼠淋巴瘤的发生过程中发挥作用<sup>[12]</sup>. 而后, 越来越多的研究显示Bmi-1高表达于包括胰腺癌在内的诸多恶性肿瘤中. Song等<sup>[13]</sup>研究提示Bmi-1在胰腺癌手术标本及PANC-1细胞中高表达, 并且Bmi-1的高表达与淋巴转移及生存率负相关. 另一组相关研究也证实了胰腺癌高表达Bmi-1<sup>[14]</sup>. 所以我们选择在胰腺癌PANC-1细胞中靶向下调Bmi-1的表达进行进一步的研究. 有资料显示Bmi-1下调后肿瘤的分化、克隆形成能力和转移能力大大削弱<sup>[15,16]</sup>. Wang等<sup>[17]</sup>还发现Bmi-1参与了HaCaT细胞的恶性转化过程. Xiao等<sup>[18]</sup>运用RNAi技术成功下调Bmi-1表达, 而使胃癌细胞生长和侵袭能力减弱. Bmi-1还参与了鼻咽癌细胞抗凋亡的过程<sup>[19]</sup>. Becker等<sup>[20]</sup>在小鼠肺癌模型中发现由Bmi-1下调导致了P16INK4a与p19ARF(人类为



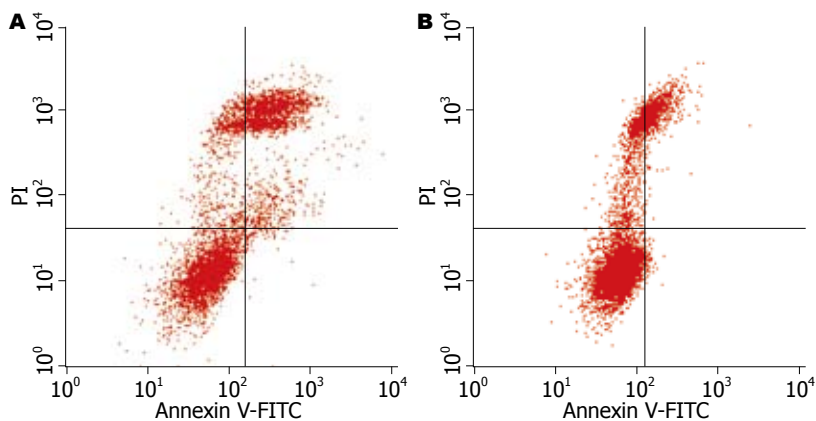


图 4 细胞凋亡. A: 实验组; B: 对照组.

**应用要点**  
Bmi-1的siRNA能明显抑制Bmi-1的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡. Bmi-1可作为胰腺癌基因治疗的靶点.

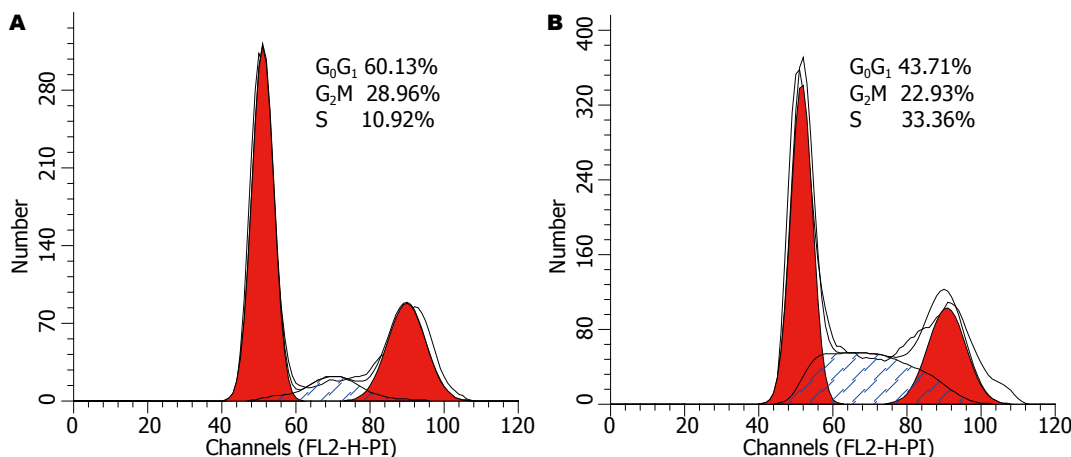


图 5 细胞周期变化. A: 实验组; B: 对照组.

P14ARF)上调, 从而影响了肿瘤中细胞的死亡和细胞周期. 我们在干扰PANC-1细胞的Bmi-1表达后发现: Bmi-1蛋白表达在该细胞中明显受到抑制( $P<0.05$ ). 基因多是通过其编码的蛋白质发挥作用, 实验显示我们已经在蛋白质水平下调了Bmi-1的表达, Bmi-1的功能已经受到抑制, 而被转染的PANC-1细胞的恶性生物学行为将被削弱, 这一观点在后续实验中得到了证实. 同时, MTT及流式细胞术结果显示: 沉默Bmi-1后细胞晚期凋亡比例由 $7.870\% \pm 0.900\%$ 上升到 $21.670\% \pm 2.948\%$ , 具有统计学差异( $P<0.05$ ). 细胞的G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>和S期阻滞也非常明显( $P<0.05$ ), 提示沉默Bmi-1确实能够降低肿瘤细胞恶性生物学行为, 与现有相关报道结果相符.

另外, 还有研究证实Bmi-1参与了细胞的恶性转化过程, Bmi-1的上调可以抑制P16INK4a, 延长多种细胞的生存期<sup>[21]</sup>. 过度表达Bmi-1还可以上调人端粒逆转录酶的转录水平, 导致端粒酶活性增高, 阻止细胞的衰老、凋亡使其永生<sup>[22]</sup>. Bmi-1促进肝脏干细胞的分化, 同时又参与了他的恶性转化<sup>[23]</sup>. 还有资料表明: Bmi-1导致了人鼻咽部上皮细胞的恶性转化<sup>[24]</sup>. 已有实验表明

Bmi-1与肿瘤的侵袭性、远处转移、复发等密切相关<sup>[13]</sup>. Bmi-1的临床价值已经在胃癌、卵巢癌、食管癌等多种肿瘤中得到肯定<sup>[16,25-27]</sup>.

siRNA是一种双链短RNA分子, 能以同源互补序列的mRNA为目标降解特定的mRNA, 从而沉默特定基因, 这种基因沉默机制被称为RNAi<sup>[28]</sup>. 目前RNAi技术成为人为改变基因表达强有力的武器, RNA干扰技术已经广泛运用于细胞信号传导、基因功能学、抗肿瘤等方面的研究. 近年来, 运用相关技术将siRNA成功转入了活体, 人们期待该技术能够成为治疗包括肿瘤在内的多种疾病强有力的手段. 当然, 由于RNAi技术还不成熟, 有些方面还处于探索阶段, 所以目前也存在诸多挑战如安全性、转染效率、给药途径及药物载体、毒性、近期及远期负面效应等. 但是随着理论、实验技术、方法、设备的不断改进, RNAi技术必然愈加成熟, 目前已有运用该技术成功抑制多种基因表达的实验报道<sup>[29-31]</sup>.

在本实验中, 我们采用RNAi技术在胰腺癌PANC-1细胞中靶向下调了Bmi-1基因的表达并观察细胞恶性生物学行为的变化, 结果显示: Bmi-1的沉默可以导致细胞增殖抑制、凋亡增

### ■同行评价

本文选题较好, 方法恰当, 思路清晰, 对临床有一定的实用价值。

加和周期阻滞, 与其他相关实验结果吻合, 也提示Bmi-1可以作为肿瘤基因治疗的靶点以及肿瘤的预后指标。

### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1819-1823
- 冷政伟, 夏清华. 肝癌干细胞研究进展. *腹部外科* 2008; 21: 372-373
- Rasheed Z, Wang Q, Matsui W. Isolation of stem cells from human pancreatic cancer xenografts. *J Vis Exp* 2010; 26: pii: 2169
- Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives. *Mol Oncol* 2010; 4: 431-442
- Pardal R, Molofsky AV, He S, Morrison SJ. Stem cell self-renewal and cancer cell proliferation are regulated by common networks that balance the activation of proto-oncogenes and tumor suppressors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 177-185
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353
- Gong H, Zhang YC, Liu WL. [Regulatory effects of Bmi-1 gene on self-renewal of hematopoietic stem cells--review]. *Zhongguo Shiyuan Xueyexue Zazhi* 2006; 14: 413-415
- Fasano CA, Phoenix TN, Kokovay E, Lowry N, Elkabetz Y, Dimos JT, Lemischka IR, Studer L, Temple S. Bmi-1 cooperates with Foxg1 to maintain neural stem cell self-renewal in the forebrain. *Genes Dev* 2009; 23: 561-574
- Cordisco S, Maurelli R, Bondanza S, Stefanini M, Zambruno G, Guerra L, Dellambra E. Bmi-1 reduction plays a key role in physiological and premature aging of primary human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1048-1062
- Pietersen AM, Evers B, Prasad AA, Tanger E, Cornelissen-Steijger P, Jonkers J, van Lohuizen M. Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Curr Biol* 2008; 18: 1094-1099
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 1999; 13: 2678-2690
- Song W, Tao K, Li H, Jin C, Song Z, Li J, Shi H, Li X, Dang Z, Dou K. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 1754-1760
- Martínez-Romero C, Rooman I, Skoudy A, Guerra C, Molero X, González A, Iglesias M, Lobato T, Bosch A, Barbacid M, Real FX, Hernández-Muñoz I. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 2009; 219: 205-213
- Jiang Y, Su B, Meng X, Liu C, Liu B, Liu D, Fan Y, Yang H. Effect of siRNA-mediated silencing of Bmi-1 gene expression on HeLa cells. *Cancer Sci* 2010; 101: 379-386
- Li W, Li Y, Tan Y, Ma K, Cui J. Bmi-1 is critical for the proliferation and invasiveness of gastric carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 568-575
- Wang Q, Li WL, You P, Su J, Zhu MH, Xie DF, Zhu HY, He ZY, Li JX, Ding XY, Wang X, Hu YP. Onco-protein BMI-1 induces the malignant transformation of HaCaT cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 16-24
- Xiao J, Deng C. Knockdown of Bmi-1 impairs growth and invasiveness of human gastric carcinoma cells. *Oncol Res* 2009; 17: 613-620
- Qin L, Zhang X, Zhang L, Feng Y, Weng GX, Li MZ, Kong QL, Qian CN, Zeng YX, Zeng MS, Liao DF, Song LB. Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 531-535
- Becker M, Korn C, Sienerth AR, Voswinckel R, Lu-etkenhaus K, Ceteci F, Rapp UR. Polycomb group protein Bmi1 is required for growth of RAF driven non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2009; 4: e4230
- Haga K, Ohno S, Yagawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 2007; 98: 147-154
- Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-4745
- Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology* 2010; 52: 1111-1123
- Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, Fu LW, Huang WL, Dimri GP, Band V, Zeng YX. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6225-6232
- Liu WL, Guo XZ, Zhang LJ, Wang JY, Zhang G, Guan S, Chen YM, Kong QL, Xu LH, Li MZ, Song LB, Zeng MS. Prognostic relevance of Bmi-1 expression and autoantibodies in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 467
- Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer* 2010; 102: 892-897
- Yang GF, He WP, Cai MY, He LR, Luo JH, Deng HX, Guan XY, Zeng MS, Zeng YX, Xie D. Intensive expression of Bmi-1 is a new independent predictor of poor outcome in patients with ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 133
- Sibley CR, Seow Y, Wood MJ. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing. *Mol Ther* 2010; 18: 466-476
- Yuan W, Wu S, Guo J, Chen Z, Ge J, Yang P, Hu B, Chen Z. Silencing of TKTL1 by siRNA inhibits proliferation of human gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 710-716
- Yu FJ, Dong PH, Fan XF, Lin Z, Chen YP, Li J. Down-regulation of angiotensin II by shRNA reduces collagen synthesis in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2010; 25: 801-806
- Dong P, Yu F, Fan X, Lin Z, Chen Y, Li J. Inhibition of ATIR by shRNA prevents collagen synthesis in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 2010; 344: 195-202

# hMLH1和RASSF1A在食管癌组织中的表达及其与患者预后关系

蒲红伟, 陈晓, 李晓梅, 卜晓红, 龚晓瑾, 张丽萍

蒲红伟, 李晓梅, 新疆医科大学高职学院教学实验中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
陈晓, 卜晓红, 新疆医科大学基础医学院病理学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
龚晓瑾, 新疆医科大学第二附属医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
张丽萍, 新疆医科大学基础医学院生化教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
蒲红伟, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤分子病理学研究。  
新疆自治区自然科学基金项目资助, No. 200821134  
作者贡献分布: 张丽萍与蒲红伟对此文所作贡献均等; 此课题陈晓与张丽萍设计; 研究过程由蒲红伟与龚晓瑾操作完成; 资料的收集和整理由卜晓红与李晓梅完成; 数据分析由蒲红伟与张丽萍完成; 本论文写作由蒲红伟、陈晓及张丽萍共同完成。  
通讯作者: 张丽萍, 副教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学基础医学院生化教研室。  
zhanglp7684@163.com  
收稿日期: 2011-01-17 修回日期: 2011-04-19  
接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Correlation between hMLH1 and RASSF1A expression and prognosis of esophageal carcinoma

Hong-Wei Pu, Xiao Chen, Xiao-Mei Li, Xiao-Hong Bu, Xiao-Jin Gong, Li-Ping Zhang

Hong-Wei Pu, Xiao-Mei Li, Higher Training College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Xiao Chen, Xiao-Hong Bu, Department of Pathology, Preclinical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Xiao-Jin Gong, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Li-Ping Zhang, Department of Biochemistry, Preclinical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 200821134  
Correspondence to: Associate Professor Li-Ping Zhang, Department of Biochemistry, Preclinical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zhanglp7684@163.com  
Received: 2011-01-17 Revised: 2011-04-19  
Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of human mutL homologue 1 (hMLH1) and Ras association domain family 1A (RASSF1A) in esophageal

squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their prognostic value.

**METHODS:** The expression of hMLH1 mRNA and RASSF1A protein in 60 specimens of esophageal cancer was detected by *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry, respectively. The relationship of hMLH1 and RASSF1A expression with ESCC prognosis was evaluated using Cox regression model and Kaplan-Meier survival curve analysis.

**RESULTS:** The positive rates of hMLH1 and RASSF1A expression in esophageal carcinoma were significantly lower than those in normal esophageal tissue (41.67% vs 90.00%, 80.00% vs 100.00%; both  $P < 0.05$ ). The expression of hMLH1 and RASSF1A was correlated with tumor TNM stage, invasion depth, lymph node metastasis, and tumor size (all  $P < 0.05$ ), but not with patient's nationality ( $P > 0.05$ ). The expression of RASSF1A was positively correlated with that of hMLH1 ( $r = 0.338, P < 0.01$ ). The five-year overall survival rate for all the patients was 35% (21/60). Univariate survival analysis suggested that the five-year survival rate for patients with positive expression of RASSF1A was higher than that for patients with negative expression of RASSF1A though the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). Patients with positive expression of hMLH1 had a significantly higher survival rate compared to those with negative expression of hMLH1 ( $P < 0.05$ ). Cox multivariate analysis indicated that tumor invasion depth and TNM stage were independent prognostic factors affecting survival of ESCC patients (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Both hMLH1 and RASSF1A were weakly expressed in ESCC. The expression of hMLH1 and RASSF1A was positively correlated with ESCC progression. Expression of hMLH1 and RASSF1A might be used as a prognostic parameter in ESCC patients.

**Key Words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Human mutL homologue 1; Ras association domain

## ■背景资料

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 我国新疆哈萨克族是食管癌的最高发民族之一, 高于我国平均水平, 严重威胁着哈萨克族人民的身心健康, 因此探讨新疆哈萨克族与汉族食管癌的发病机制, 寻找有效预防及治疗的途径, 是目前迫切需要解决的问题。

## ■同行评议者

李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

## ■ 研发前沿

肿瘤的发生发展是个多步骤、多因素、进行性发展的过程,涉及到多种肿瘤抑制基因失活、癌基因的激活和凋亡相关基因的变化。hMLH1是DNA错配修复系统中重要组成部分,而RASSF1A是肿瘤发生重要的抑癌基因,其功能缺陷均与恶性肿瘤的发生有关,因此成为目前的研究热点。

## family 1A; Prognosis

Pu HW, Chen X, Li XM, Bu XH, Gong XJ, Zhang LP. Correlation between hMLH1 and RASSF1A expression and prognosis of esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1347-1352

## 摘要

**目的:** 探讨食管鳞癌组织中hMLH1和RASSF1A基因表达及其对预后的影响。

**方法:** 采用原位杂交技术检测hMLH1基因、免疫组织化学法检测RASSF1A基因在60例食管鳞癌患者中的表达,应用Cox回归模型和Kaplan-Meier生存曲线分析其与患者预后的关系。

**结果:** 在食管鳞癌组织中hMLH1 mRNA表达显著低于正常黏膜组织(41.67% vs 90.00%,  $P < 0.01$ ), RASSF1A蛋白表达低于食管正常黏膜组织(80% vs 100%,  $P < 0.05$ )。hMLH1和RASSF1A的表达与TNM分期、食管癌浸润深度、淋巴结转移和肿瘤大小相关(均 $P < 0.05$ ),但与民族无关; RASSF1A与hMLH1表达呈正相关( $r = 0.338$ ,  $P < 0.01$ ); 本组病例5年总生存率为35%(21/60),单因素生存分析表明,食管癌hMLH1高表达组5年生存率高于低表达组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); RASSF1A高表达组较低表达组有生存优势,但差异无统计学意义; Cox模型多因素分析表明, hMLH1和RASSF1A不是影响生存期的独立因素,而肿瘤浸润深度和TNM分期均是影响生存期的独立因素( $P < 0.05$ )。

**结论:** hMLH1和RASSF1A在食管癌组织中表达均较低,其表达水平与食管肿瘤的发生发展有一定的关系,结合临床病理可作为判断预后的指标。

**关键词:** 食管癌; hMLH1基因; RASSF1A基因; 预后

蒲红伟, 陈晓, 李晓梅, 卜晓红, 龚晓瑾, 张丽萍. hMLH1和RASSF1A在食管癌组织中的表达及其与患者预后的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1347-1352

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1347.asp>

## 0 引言

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,我国每年因食管癌死亡的人数约占全部恶性肿瘤死亡人数的1/4<sup>[2]</sup>。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的发生是一个多步骤、多因素、进行性发展的过程,涉及到多种

肿瘤抑制基因失活、癌基因的激活和凋亡相关基因的变化。hMLH1是DNA错配修复(DNA mismatch repair, MMR)系统中重要组成部分,定位于3p21.3-23, 主要与错配点结合并与其他修复蛋白结合复合体来进行DNA修复。目前在结肠癌、子宫内膜癌等肿瘤中关于hMLH1的研究较多,但是在ESCC中相关研究较少<sup>[3,4]</sup>。RASSF1A基因是Dammann等<sup>[5]</sup>于2000年从3p21.3上首先克隆出来并证实其转录本在肺癌细胞系中为肺癌的候选抑癌基因,他所表达的产物广泛存在于肺、乳腺、肾、消化系等多种器官和组织中,在多种癌组织中存在不同程度的表达缺失<sup>[6,7]</sup>。本实验联合检测hMLH1和RASSF1A在60例ESCC中的表达水平,分析两者与肿瘤临床病理特征和患者预后的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2001-01/2004-12新疆医科大学第一及第二附属医院手术切除并经病理证实的ESCC标本60例,其中汉族30例,哈萨克族30例,男40例,女20例,年龄38.0-76.0(平均54.6)岁。所有病例术前未经任何放疗和化疗。按照WHO分类标准进行病理分级:高分化20例,中低分化40例。I期8例,II期32例,III期19例,IV期1例。无淋巴结转移34例,有淋巴结转移26例。同时选取20例正常食管组织(距ESCC原发灶5 cm)作对照。标本均经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,连续4 μm厚度切片。hMLH1原位杂交试剂盒,兔抗人RASSF1A均购自武汉博士德生物工程有限公司, DAB显色试剂盒由北京中杉生物公司提供。

**1.2 方法** 采用免疫组织化学PV-9000二步法检测各组织中RASSF1A蛋白的表达。步骤如下:石蜡切片逐级脱蜡、水化至水,用30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温下孵育20 min(封闭内源性过氧化物酶), PBS漂洗。将切片置于pH6.0的枸橼酸盐缓冲液中,微波炉加热修复抗原20 min(温度控制在95 °C -100 °C)。取出自然冷却至室温后,用PBS漂洗。滴加一抗,置于湿盒内,4 °C冰箱过夜。同法冲洗切片,滴加生物素化通用性二抗工作液, DAB显色生物素化二抗工作液,置于湿盒中,自来水终止显色反应,切片苏木素复染,盐酸酒精分化返蓝,脱水封片。hMLH1原位杂交步骤按试剂盒说明进行。RASSF1A以胞质内出现黄褐色或棕褐色颗粒为阳性染色细胞。hMLH1 mRNA探针以在胞质表达棕黄色颗粒为主,也可见部分细胞核表达。以正常食管黏膜细胞表达的强度及方

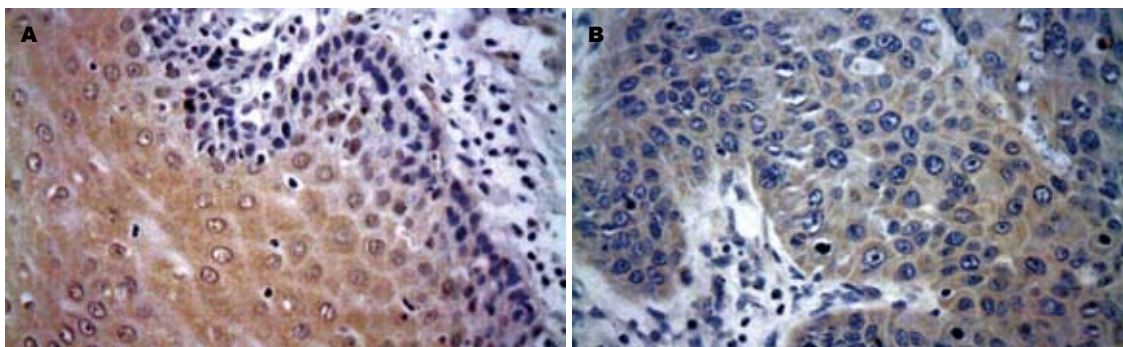


图 1 hMLH1的表达(IAB × 400). A: 正常食管黏膜; B: ESCC组织.

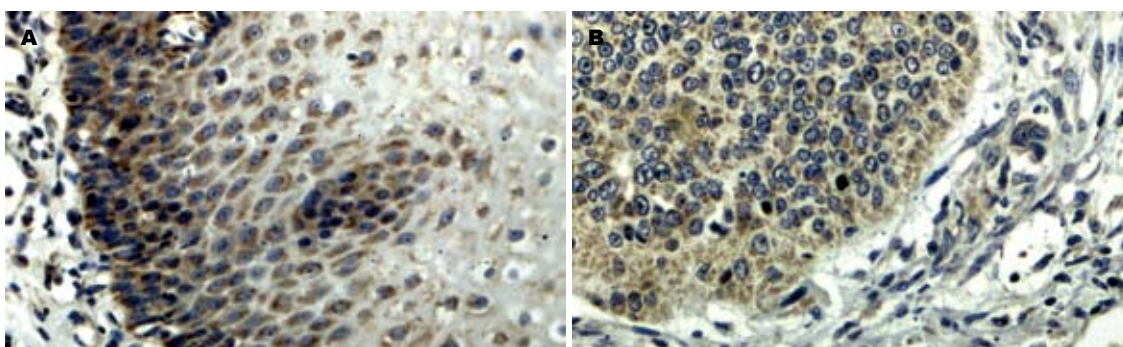


图 2 RASSF1A的表达(SP × 400). A: 正常食管黏膜; B: ESCC组织.

**■ 相关报道**  
夏颀等在对40例胃癌的研究中发现hMLH1蛋白在胃炎组织和癌旁组织中的表达显著高于胃癌组织, 推测MLH1则可能是胃癌预警组织的一种标志物. 蒋鹏程等采用RT-PCR检测胃正常组织、腺瘤组织、不典型增生组织各20例及胃腺癌组织40例中RASSF1A及Cyclin D1 mRNA的表达, 并Western blot法检测RASSF1A蛋白表达. 结果显示RASSF1A的表达低于不典型增生、良性腺瘤及正常组织组, 认为二者联合检测能为胃癌的早期临床诊断和治疗提供有利的生物学信息.

式为阳性对照, 在400倍视野下每张切片随机观察5个视野, 阳性细胞<5%为阴性; >5%, 为阳性.

**统计学处理** 统计学分析采用SPSS15.0软件分别进行 $\chi^2$ 检验、Kaplan-Meier生存分析和Cox模型多因素生存分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 hMLH1和RASSF1A在正常食管组织和ESCC组织中的表达** hMLH1 mRNA表达以在胞质出现棕黄色颗粒为主, 也可见部分细胞核表达, 在正常食管黏膜鳞状细胞和基底细胞中阳性表达, 在食管癌组织中表达部分或全部缺失, 差异有统计学意义( $P<0.01$ , 图1); RASSF1A蛋白以胞质出现棕褐、黄褐色颗粒为阳性染色细胞(图2), 正常食管黏膜鳞状细胞和基底细胞中RASSF1A几乎100%强阳性表达, 与食管癌组织中的表达差异有统计学意义( $P<0.05$ ).

**2.2 hMLH1和RASSF1A与临床病理参数的关系** hMLH1的表达则与肿瘤浸润深度、病理分期、肿瘤大小(最长径线)相关, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); hMLH1的表达在有淋巴结转移组低于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 但其表达在不同分化程度组之间的差异无统

计学意义( $P>0.05$ ); RASSF1A蛋白表达阳性率随病理分期增高依次降低, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 有淋巴结转移组低于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 随着浸润深度的增加阳性率也逐渐降低, 进行肌层和浆膜层两组之间的差异比较, 结果有统计学意义( $P<0.05$ ), 其表达阳性率随肿瘤分化程度降低依次降低但差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 在不同的肿瘤大小组中的表达差异也有统计学意义( $P<0.05$ ). RASSF1A和hMLH1的表达在汉族和哈萨克族之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ , 表1).

**2.3 hMLH1和RASSF1A的表达相关性** hMLH1和RASSF1A的表达呈正相关( $r = 0.338, P<0.01$ , 表2).

**2.4 患者预后** 本研究对60例ESCC患者进行随访, 其中21例存活, 中位生存期为51.0(38.8-63.2) mo, 5年生存率为35%(21/60).

**2.4.1 单因素Kaplan-Meier生存曲线:** hMLH1阳性表达组与阴性表达组相比, 前者5年生存率较高, 且差异有统计学意义( $P<0.05$ ); RASSF1A阳性表达组平均生存时间和中位生存时间都高于阴性表达组, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图3, 4).

**2.4.2 多因素分析:** 以患者肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM分期、分化程度、病变长度以及食管癌中hMLH1和RASSF1A的表达为变量, 进

■ 创新盘点

本实验运用原位杂交法和免疫组织化学法分别在转录水平和蛋白水平检测hMLH1和RASSF1A的表达情况,探讨二者与结直肠癌各项临床病理参数之间的关系,并应用Cox回归模型和Kaplan-Meier生存曲线分析其与患者预后的关系,为hMLH1和RASSF1A成为判断食管癌生物学行为及预后的重要参考指标提供理论依据。

表 1 hMLH1和RASSF1A表达与食管癌病理特征的关系

病理特征	n	hMLH1 mRNA表达			$\chi^2$ 值	P值	RASSF1A蛋白表达			$\chi^2$ 值	P值
		-	+	阳性率(%)			-	+	阳性率(%)		
癌组织	60	35	25	41.67							
正常组织	20	2	18	90.00	14.096	0.000	0	20	100.00	4.619	0.032
临床分期											
I 和 II	40	17	23	57.50			3	37	92.50		
III 和 IV	20	18	2	10.00	12.377	0.001	9	11	55.00	11.719	0.001
分化程度											
高分化	20	9	11	55.00			1	19	95.00		
中低分化	40	26	14	35.00	2.194	0.171	11	29	72.50	4.219	0.047
浸润深度											
≤肌层	29	12	17	58.62			2	27	93.11		
≥浆膜层	31	23	8	25.81	6.638	0.018	10	21	67.74	6.023	0.022
淋巴转移											
有N1	26	23	3	11.54			10	16	61.54		
无N0	34	12	22	64.71	17.135	0.000	2	32	94.11	9.774	0.003
肿瘤大小(cm)											
≤5	35	16	19	54.28			3	32	91.43		
>5	25	19	6	24.00	5.503	0.033	9	16	64.00	6.857	0.019
民族											
汉族	30	16	14	46.67			5	25	83.34		
哈萨克族	30	19	11	36.67	0.617	0.601	7	23	76.67	0.924	0.391

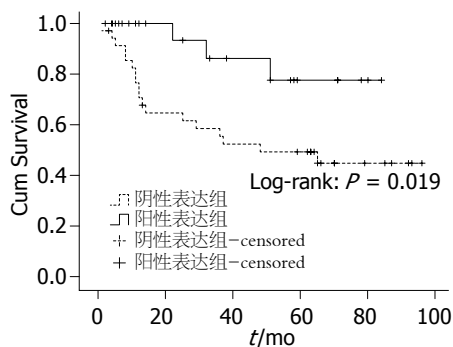


图 3 hMLH1表达阴性和阳性表达组生存曲线。

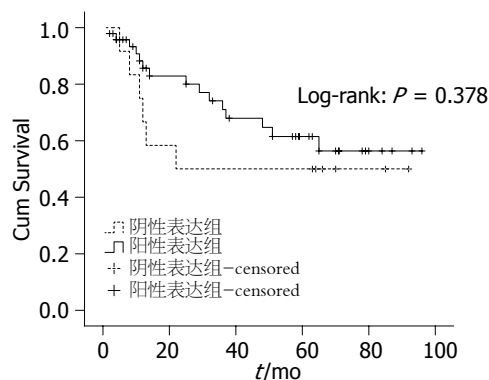


图 4 RASSF1A表达阴性和阳性表达组生存曲线。

表 2 hMLH1和RASSF1A表达的相关性 (n)

hMLH1	RASSF1A		合计
	-	+	
-	11	24	35
+	1	24	25
合计	12	48	60

行Cox多因素回归分析. 结果显示, 独立的预后因素为肿瘤浸润深度和TNM分期( $P < 0.05$ , 表3).

3 讨论

MMR是人体细胞的一种修复DNA碱基错配的

安全保障体系<sup>[8,9]</sup>, 由一系列特异性修复DNA碱基错配的酶分子(错配修复基因)组成, 包括Mut H, Mut L和Mut S三大家族的蛋白, 该系统中任一基因突变都会导致细胞错配修复功能缺陷, 结果产生遗传不稳定, 表现为复制错误或微卫星不稳定, 进而导致肿瘤发生. hMLH1是MMR中重要组成部分, 定位于3p21.3-23, 基因组DNA全长约58 kb(不包括启动子), 含19个外显子, cDNA有2 268 bp的开放阅读框架, 编码蛋白质756个氨基酸, 功能主要与错配点结合并与其他修复蛋白结合复合体来进行修复, 其异常与遗传性肠癌、II型贲门癌、白血病、Muri-

表 3 食管癌预后的Cox模型多因素分析

选入变量	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
TNM分期	0.908	0.367	6.130	1	0.013	2.478
肿瘤浸润深度	0.913	0.380	5.775	1	0.016	2.492

Torre家族性肿瘤综合征、恶性胶质瘤Turcot综合征等相关<sup>[10,11]</sup>。Cai等<sup>[12]</sup>研究发现食管癌中有hMLH1杂合性缺失并且与微卫星不稳定有关,正是由于hMLH1的突变或缺失使细胞碱基错配不能得以修复,从而使DNA复制错误积累终导致肿瘤的发生;刘复兴等<sup>[13]</sup>研究了食管癌3p杂合性丢失情况,发现3p近hMLH1基因区域存在高频缺失,并进一步选取MLH1基因内微卫星标志,发现ESCC中hMLH1存在较高的等位基因丢失,hMLH1基因内标志D3S1611的LOH频率高达(66.7%),说明食管癌hMLH1基因丢失频发,可能是食管癌基因改变的靶点,目前较多研究结果提示<sup>[14-18]</sup>hMLH1基因甲基化可能是多种散发性肿瘤错配修复基因失活的常见方式。本实验采用原位杂交方法检测hMLH1 mRNA的表达,结果显示早期患者mRNA表达明显高于中晚期患者,该研究结果与张军航等报道相一致<sup>[19-21]</sup>,同时hMLH1的表达与肿瘤浸润深度、病理分期、肿瘤大小、淋巴结转移相关,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),提示hMLH1可能是食管癌发生的早期事件,并且与肿瘤的发展和转移有关;Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,hMLH1阳性表达组生存率都高于阴性表达组,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但多因素分析结果认为,hMLH1并不是ESCC独立的预后影响因素。

RASSF1A是Ras效应蛋白家族中的一员,由Ras蛋白参与的Ras通路是一条高度保守的信号传递通路。其中Ras蛋白在有活性的GTP结合构象和无活性的GDP结合构象之间转化,通过与不同的效应物分子激活多条传递通路,其中Ras/RASSF1/ERK通路将信号由细胞外传递到细胞内,介导细胞分化、增殖、存活及原癌基因转化<sup>[22-24]</sup>。RASSF1A蛋白通过磷酸化ATM蛋白的激酶位点,使之活化来发挥抑制肿瘤的作用。武林枫等<sup>[25]</sup>采用免疫印迹方法检测48例胰腺癌组织及其癌旁(正常)组织RASSF1A基因蛋白的表达水平,结果发现癌旁组织RASSF1A蛋白的表达量高于胰腺癌组织的表达量( $P<0.05$ );TNM分期III期RASSF1A蛋白的表达量低于I、II期( $P<0.05$ )。周岩等<sup>[26]</sup>采用RT-PCR检测

29例膀胱移行细胞癌组织及5例正常膀胱组织中RASSF1A mRNA的表达水平,结果显示RASSF1A mRNA在所有正常膀胱组织中均呈阳性表达,而在膀胱移行细胞癌组织中表达缺失率为79.3%(23/29),两者比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );目前也有研究证实RASSF1A基因在食管癌、胃癌组织的表达量高于癌旁对照组织<sup>[27-31]</sup>。本实验检测RASSF1A蛋白表达阳性率随病理分期增高依次降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ );且其表达与肿瘤浸润深度、病理分期、肿瘤大小、淋巴结转移以及肿瘤分化程度相关,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),提示RASSF1A蛋白表达降低促进癌细胞的生物学行恶化,使其侵袭和转移增强;Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,RASSF1A阳性表达组与阴性表达组相比,前者5年生存率较后者高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );进一步做Cox多因素回归分析,结果显示,RASSF1A亦不能作为ESCC独立的预后因素。另外,本实验的结果还显示ESCC中RASSF1A和hMLH1的表达呈正相关,相关系数 $r = 0.338$ ( $P<0.01$ ),二者表达在食管癌的发生发展中可能具有协同作用。在30例汉族和30例哈萨克族ESCC中,hMLH1和RASSF1A的表达在不同民族之间无显著性差异( $P>0.05$ ),提示在新疆的汉族和哈萨克族ESCC的发生发展中hMLH1和RASSF1A的表达具有共同性,无民族间基因背景差异。

总之,hMLH1和RASSF1A在ESCC组织的表达均较低,且其表达与临床病理相关,因此我们认为,上述生物学指标与临床病理学指标相结合为食管癌的诊断和治疗提供了崭新的思路。

#### 4 参考文献

- Jenkins TD, Friedman LS. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Dig Dis* 1999; 17: 153-162
- Zhang H, Chen SH, Li YM. Epidemiological investigation of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1834-1835
- Bahnassy AA, Zekri AR, Madbouly MS, El-Naggari M, El-Khelany ZF, El-Merzebany MM. The correlation between FHIT, P53 and MMR genes in human papillomavirus-associated cervical carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 191-202
- Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firoozi M, Al-Mandhari M, Al-Mawaly K, Al-Mjeni R, Al-Sayegh A, Raeburn S, Lee E, Giardiello F, Smoot DT, Vilkin A, Boland CR, Goel A, Hafezi M, Nouraie M, Ashktorab H. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. *Mol Cancer* 2008; 7: 68
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeif-

#### ■应用要点

本实验证实了hMLH1和RASSF1A基因在食管癌组织中表达均较低,其表达水平与食管肿瘤的发生发展有一定的关系,结合临床病理可作为判断预后的指标,为食管癌的治疗提供新的思路及理论依据。

### ■同行评价

本文设计合理, 结论明确, 但科学性一般。

- er GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319
- 6 Hamilton DW, Lusher ME, Lindsey JC, Ellison DW, Clifford SC. Epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in ependymoma. *Cancer Lett* 2005; 227: 75-81
- 7 Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 2007; 23: 73-87
- 8 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 9 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457
- 10 Jackson T, Ahmed MA, Seth R, Jackson D, Ilyas M. MLH1 function is context dependent in colorectal cancers. *J Clin Pathol* 2011; 64: 141-145
- 11 赵成海. 错配修复缺陷, 微卫星不稳定与胃癌. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1384-1388
- 12 Cai YC, So CK, Nie AY, Song Y, Yang GY, Wang LD, Zhao X, Kinzy TG, Yang CS. Characterization of genetic alteration patterns in human esophageal squamous cell carcinoma using selected microsatellite markers spanning multiple loci. *Int J Oncol* 2007; 30: 1059-1067
- 13 刘复兴, 王明荣, 徐晰. 食管鳞癌MLH1基因杂合性丢失分析. *咸宁学院学报(医学版)* 2005; 19: 458-460
- 14 Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM. Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 2002; 21: 5696-5703
- 15 Lu C, Xie H, Wang F, Shen H, Wang J. Diet folate, DNA methylation and genetic polymorphisms of MTHFR C677T in association with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 91
- 16 Vasavi M, Kiran V, Ravishankar B, Prabhakar B, Ahuja YR, Hasan Q. Microsatellite instability analysis and its correlation with hMLH1 repair gene hypermethylation status in esophageal pathologies including cancers. *Cancer Biomark* 2010; 7: 1-10
- 17 卜献民, 赵成海, 张宁, 林帅, 高峰, 戴显伟. 胰腺癌组织和细胞系中DNA错配修复基因的甲基化和异常表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1074-1077
- 18 吴安城, 刘希双, 杨堃. 错配修复基因hMLH1甲基化与胃癌的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1407-1411
- 19 张军航, 刘顺寿, 刘德贵, 玉寒冰, 魏舜, 赵翔, 王伟, 王征, 黄雁峰, 马琳. hMLH1基因在食管癌组织中的表达及临床意义. *实用肿瘤学杂志* 2001; 15: 173-174
- 20 焦云娟, 杨晓煜, 张哲莹, 崔静, 王永霞, 张景航, 赵卫星. hMLH1、转化生长因子 $\beta$ 受体II在食管癌中的表达及意义. *肿瘤防治研究* 2010; 37: 922-925
- 21 夏岷, 刘希双, 杨堃, 隋爱华. 错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3446-3450
- 22 Yoo YA, Na AR, Lee MS, Yoon S, Kim JS, Yoo YD. RASSF1A suppresses oncogenic H-Ras-induced c-Jun N-terminal kinase activation. *Int J Oncol* 2006; 29: 1541-1547
- 23 Song MS, Chang JS, Song SJ, Yang TH, Lee H, Lim DS. The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *J Biol Chem* 2005; 280: 3920-3927
- 24 Pijnenborg JM, Dam-de Veen GC, Kisters N, Delvoux B, van Engeland M, Herman JG, Groothuis PG. RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutations and recurrent endometrial cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 491-497
- 25 武林枫, 王逢春, 马玉刚. 抑癌基因RASSF1A在胰腺癌组织中表达的研究. *中国普通外科杂志* 2009; 18: 292-294
- 26 周岩, 梁铸林, 熊平. RASSF1A基因在膀胱移行细胞癌中的表达及其临床意义. *临床泌尿外科杂志* 2008; 23: 138-142
- 27 陈雅慧, 兰忠平, 惠起源, 李宝莉, 杨彦玲. RASSF1A与CyclinD1在胃黏膜病变组织中表达及二者的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2604-2609
- 28 蒋鹏程, 马圭, 孟鑫, 祁卫东, 高振军. RASSF1A基因在胃癌和癌前病变中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2992-2996
- 29 Lo PH, Xie D, Chan KC, Xu FP, Kuzmin I, Lerman MI, Law S, Chua D, Sham J, Lung ML. Reduced expression of RASSF1A in esophageal and nasopharyngeal carcinomas significantly correlates with tumor stage. *Cancer Lett* 2007; 257: 199-205
- 30 Zhang TW, Wang SF, Cong DG, Fu SB, Meng XN, Yu L, Wang J. [Suppression of RASSF1A gene on human esophageal carcinoma cells: experiments in vitro and in vivo]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 1214-1216
- 31 Cong DG, Wang SF, Zhang TW. [mRNA expression of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma and clinical significance thereof]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2006; 86: 1624-1627

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# IFN- $\gamma$ 通过非依赖STAT1途径对人胃癌组织中P53表达的调控机制

邓昊, 镇鸿燕, 陈莹, 付政祺, 刘丽江

邓昊, 镇鸿燕, 付政祺, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室 湖北省武汉市 430056  
邓昊, 陈莹, 刘丽江, 江汉大学病理诊断所 湖北省武汉市 430056  
刘丽江, 江汉大学第二附属医院病理科 湖北省武汉市 430050  
邓昊, 讲师, 主要从事胃肠道肿瘤病理学及病理学教学研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81000884  
武汉市晨光计划基金资助项目, No. 20045006071-7  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2006AB191  
作者贡献分布: 此课题由邓昊与刘丽江设计; 研究过程由邓昊与镇鸿燕操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈莹提供; 数据分析由邓昊与付政祺完成; 本论文写作由邓昊完成。  
通讯作者: 刘丽江, 教授, 430056, 湖北省武汉市沌口经济技术开发区三角湖路8号, 江汉大学病理诊断所. liulijiang@163.com  
电话: 027-82411803 传真: 027-84226503  
收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-03-28  
接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-05-08

## IFN- $\gamma$ regulates P53 expression in gastric cancer through a STAT1-independent pathway

Hao Deng, Hong-Yan Zhen, Ying Chen, Zheng-Qi Fu, Li-Jiang Liu

Hao Deng, Hong-Yan Zhen, Zheng-Qi Fu, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Hao Deng, Ying Chen, Li-Jiang Liu, Institute of Pathology, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Li-Jiang Liu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430050, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81000884; the Young Chenguang Foundation of Wuhan, No. 20045006071-7; and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2006AB191

Correspondence to: Professor Li-Jiang Liu, Institute of Pathology, Jiangnan University, 8 Sanjiaohu Road, Dunkou Economic and Technical Development Zone, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com

Received: 2011-02-22 Revised: 2011-03-28

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To explore the relationship between STAT1 and *p53* mRNA expression in human gastric cancer cell line SGC7901 and to characterize the regulatory effect of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) on *p53* expression in gastric cancer.

**METHODS:** After SGC7901 cells were treated with IFN- $\gamma$  and antisense oligonucleotides (ASON) targeting the STAT1 gene, alone or in combination, the mRNA expression of *p53* and STAT1 was tested by RT-PCR, and cell apoptosis was examined by Hoechst 33258 staining. The protein expression of *p53* and STAT1 in human gastric cancer tissue was examined by immunohistochemistry. Average optical density was compared between different groups using Student's *t* test analysis. The relationship between the expression of STAT1 and P53 protein in human gastric cancer was evaluated using Spearman rank correlation analysis.

**RESULTS:** Treatment with IFN- $\gamma$  up-regulated the mRNA expression of STAT1 and *p53* in SGC7901 cells (both  $P < 0.05$ ). Treatment with STAT1-specific ASON induced down-regulation of STAT1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ) in a concentration-dependent manner. The expression of *p53* mRNA was lower in all ASON groups than in the control group (all  $P > 0.05$ ). Simultaneous treatment with IFN- $\gamma$  and STAT1-specific ASON induced lower STAT1 mRNA expression than treatment with IFN- $\gamma$  alone ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of *p53* was higher in all cells treated simultaneously with IFN- $\gamma$  and STAT1-specific ASON than in those treated with IFN- $\gamma$  alone (all  $P > 0.05$ ). There was no correlation between STAT1 and *p53* mRNA and protein expression in human gastric cancer tissue and cell lines. Treatment with either IFN- $\gamma$  or STAT1-specific ASON had no significant impact on cell apoptosis.

**CONCLUSION:** IFN- $\gamma$  could regulate *p53* expression in gastric cancer through a STAT1-independent pathway.

**Key Words:** Interferon- $\gamma$ ; Signal transducer and activator of transcription 1; *p53* gene; Gastric cancer

Deng H, Zhen HY, Chen Y, Fu ZQ, Liu LJ. IFN- $\gamma$  regulates P53 expression in gastric cancer through a STAT1-independent pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1353-1358

## ■背景资料

胃癌中, IFN- $\gamma$ 可通过STAT1调控促凋亡分子*p21<sup>waf</sup>*的表达。P53作为*p21<sup>waf</sup>*的经典调节分子与细胞内的其他信号转导通路间存在着错综复杂的相互关系。胃癌中, IFN- $\gamma$ -STAT1途径对*p21<sup>waf</sup>*表达调控是否依赖P53途径完成, 当前尚无明确的结论。

## ■同行评议者

季菊玲, 副教授, 南通大学医学院病理教研室

## ■ 研究前沿

IFN- $\gamma$ 可促进SGC7901细胞STAT1以及*p53* mRNA表达上升,同时使用IFN- $\gamma$ 和STAT1 ASON以及单独使用STAT1 ASON处理SGC7901细胞时,*p53* mRNA表达无明显变化,提示胃癌中IFN- $\gamma$ 上调*p53*的表达,并不是通过IFN- $\gamma$ -STAT1途径完成的。

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌中IFN- $\gamma$ 通过非依赖STAT1途径对P53表达调控的作用及机制。

**方法:** SGC7901经IFN- $\gamma$ 及STAT1反义寡核苷酸处理, RT-PCR及灰度分析法检测STAT1和*p53* mRNA水平变化,应用Hoechst33258观察细胞凋亡。人胃癌组织经免疫组织化学染色检测STAT1和P53蛋白。各组平均吸光度值通过检验分析。

**结果:** SGC7901细胞经IFN- $\gamma$ 处理后, STAT1和*p53* mRNA表达上升( $P < 0.05$ )。经不同浓度STAT1反义寡核苷酸处理后, STAT1 mRNA表达下降,有浓度依赖性( $P < 0.05$ )。*p53* mRNA表达量始终低于未处理组( $P < 0.05$ )。经IFN- $\gamma$ 和不同浓度STAT1反义寡核苷酸联合处理后, STAT1 mRNA和蛋白表达较IFN- $\gamma$ 单独处理逐渐下降,有浓度依赖性( $P < 0.05$ )。*p53* mRNA表达量始终高于IFN- $\gamma$ 单独处理组( $P < 0.05$ )。所有处理组中, STAT1 mRNA与*p53* mRNA表达无关。人胃癌组织经免疫组织化学染色检测, STAT1和P53蛋白表达无关。经IFN- $\gamma$ 和STAT1反义寡核苷酸处理后细胞无明显凋亡。

**结论:** IFN- $\gamma$ 可通过非依赖STAT1途径促进胃癌组织中P53的表达。

**关键词:** 干扰素- $\gamma$ ; 信号转导子和转录活化子1; *p53* 基因; 胃癌

邓昊, 镇鸿燕, 陈莹, 付政祺, 刘丽江. IFN- $\gamma$ 通过非依赖STAT1途径对人胃癌组织中P53表达的调控机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1353-1358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1353.asp>

## 0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居恶性肿瘤的第2位<sup>[1-3]</sup>。有研究表明胃癌中细胞凋亡明显受阻<sup>[4-6]</sup>,但有关胃癌凋亡调控的机制尚未取得突破性的进展。我们前期的研究发现,人胃癌组织中转录信号转导子和转录活化子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)蛋白表达与胃癌淋巴结转移密切相关,并有着重要的临床意义。在胃癌细胞中,干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )可通过STAT1促进*p21*<sup>waf</sup>在mRNA及蛋白水平的表达上调<sup>[7-9]</sup>。*p21*<sup>waf</sup>是细胞凋亡调控过程中的重要分子,其基因定位于人染色体6p21.2,编码的蛋白由164个氨基酸组成,相对分子质量为21 000 Da,是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期

抑制蛋白。*p21*<sup>waf</sup>是经典的*p53*下游分子,其基因上游2.4 kb和8 kb处各有一个P53蛋白特殊序列结合位点<sup>[10]</sup>。作为抑癌基因的*p53*自发现就备受关注,*p53*介导的信号转导途径在细胞的生长、分化、衰老、应激等生命过程中起着重要的调控作用,而且与细胞内的其他信号转导通路间存在着错综复杂的相互关系<sup>[11-14]</sup>。研究表明,STAT1可通过下调P53抑制蛋白Mdm2的表达促进P53的表达进而完成对*p21*<sup>waf</sup>表达的调控<sup>[15]</sup>。胃癌中,IFN- $\gamma$ -STAT1途径对*p21*<sup>waf</sup>表达调控是否依赖P53途径完成,当前尚无明确的意见。本研究拟通过细胞生物学的研究方法,在给予IFN- $\gamma$ 和STAT1反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASON)单独处理以及联合处理胃癌细胞系SGC7901时,观察STAT1和*p53* mRNA表达的变化以及相互关系,并通过临床病理学的研究方法,观察人胃癌组织中STAT1和P53蛋白的相关性,以探讨胃癌中IFN- $\gamma$ -STAT1途径能否对P53进行调控。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌细胞株SGC7901由本实验室保存。使用含100 mL/L小牛血清(Gibcol)的RMPI 1640培养基(Gibcol),置于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>(体积分数)的培养箱中培养。每2-3 d换1次液。100例胃癌根治性手术切除标本来自江汉大学附属医院(1989-2003),男68例,女32例,年龄26-77(中位年龄59)岁。全部病例均有详细的病理学检查结果,均为腺癌。所有病例术前未进行放疗和化疗。

### 1.2 方法

**1.2.1 ASON的转染以及药物处理:** 使用1 000 kIU/L IFN- $\gamma$ <sup>[16]</sup>(102CY27, PEPROTECH)分别处理细胞0.5、3和24 h。

ASON及引物序列由赛百胜生物技术有限公司合成。用阳离子脂质体Transfectin(TianGENE)进行转染。ASON的序列设计以及浓度的使用根据已发表的文献。STAT1ASON: 5'-CCACTGAGACATCCTGCCACC-3',按照200、400和600 nmol/L的浓度转染<sup>[17]</sup>。将STAT1 ASON单独以及与1 000 kIU/L IFN- $\gamma$ 联合处理细胞24 h;细胞的转染严格按照说明书操作,ASON:脂质体=1:2-3。

**1.2.2 RT-PCR检测及灰度分析:** 用TRIzol(Invitrogen)提取总RNA,样品纯度和浓度经核酸测定仪测定, $A_{260/280} = 1.8-2.0$ 。严格按照RT-PCR试剂盒(TaKaRa)说明书操作进行RT-PCR。使用Primer 5.0引物设计软件分别设计STAT1、*p53*和 $\beta$ -actin

表 1 引物序列

基因	反义	正义	长度(bp)
STAT1	5'-CATGCGGTTGAACCTACA-3'	5'-TTCTACAGAGCCCACTATCC-3'	342
p53	5'-CTGCTCAGATAGCGATGG-3'	5'-TATGGCGGGAGGTAGACT-3'	599
$\beta$ -actin	5'-TGCTGTCCCTCTACGCCTCT-3'	5'-GCTTCTCCTTGATGTCGC-3'	234

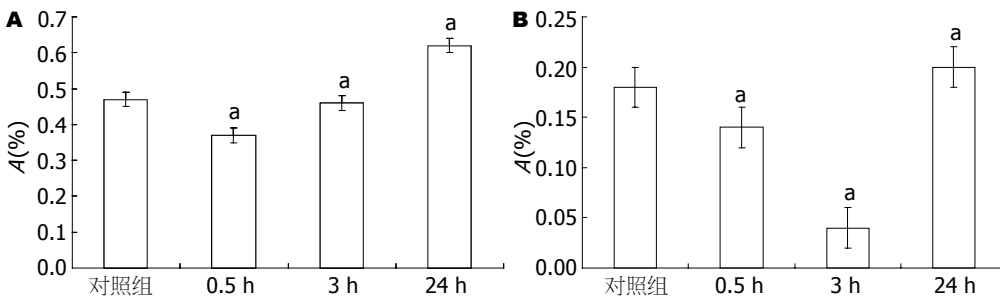


图 1 IFN- $\gamma$ 刺激SGC7901细胞0.5、3和24 h后STAT1和p53 mRNA表达变化. A: STAT1; B: p53. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

的上游和下游引物(表1). 目的引物与 $\beta$ -actin用一管法进行PCR. PCR产物经1.5 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测, 使用Biostep Photoimpact软件分析各组目的基因与 $\beta$ -actin条带的平均吸光度值, 计算两者的比值, 进行相对定量.

1.2.3 Hoechst3325染色检测细胞凋亡: 无菌条件下取出细胞爬片并固定后, Hoechst33258孵育15 min, 0.01 MPBS洗5 min  $\times$  1次. 水溶性封片剂封片, 荧光显微镜紫外光下观察, Hoechst33258染料呈现蓝色荧光. 高倍镜下观察, 凋亡细胞为蓝色亮点, 亮度明显强于未凋亡细胞, 形态学上出现核膜消失、核固缩、核碎裂等特征. 随机数取1 000个细胞进行凋亡细胞计数.

1.2.4 免疫组织化学及免疫细胞化学染色: 免疫组织化学及免疫细胞化学染色使用抗体为, 抗STAT1单克隆抗体(P84/P91, C-136, Santa Cruz公司产品), 即用型鼠抗人P53单克隆抗体(DO-7, NeoMarkers公司产品), SP法即用型检测试剂盒均购自福州迈新生物公司. 所有染色均经DAB显色. STAT1以癌细胞质内呈棕黄色表达为阳性, P53以癌细胞核内呈棕黄色表达为阳性. 操作过程严格按照说明书要求进行.

**统计学处理** 全部数据经SPSS12.0统计学软件处理, 相关因素分析采用Spearman等级相关分析, 各组平均光密度值通过t检验分析.  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

2.1 IFN- $\gamma$ 对STAT1和p53 mRNA表达的影响 IFN- $\gamma$  1 000 kIU/L处理SGC7901细胞0.5、3、

24 h, STAT1和p53在mRNA水平均有先下降后上升的表现, 24 h时, mRNA水平平均高于对照组 ( $P < 0.05$ , 图1).

2.2 IFN- $\gamma$ 通过非STAT1依赖途径对p53 mRNA表达的影响 使用IFN- $\gamma$  1 000 kIU/L联合200、400和600 nmol/L STAT1 ASON处理SGC7901细胞24 h后, STAT1 mRNA表达均高于对照组, 但呈现逐渐下降的趋势( $P < 0.05$ ), 在IFN- $\gamma$ +600 nmol/L STAT1 ASON处理组其表达水平与对照组接近; p53 mRNA表达均高于对照组, 且有逐渐上升的表现( $P < 0.05$ , 图2).

2.3 抑制STAT1表达时, STAT1和p53 mRNA表达变化的相关性 使用200、400和600 nmol/L STAT1 ASON处理SGC7901细胞24 h后, STAT1 mRNA表达逐渐下降, 在400 nmol/L STAT1 ASON处理时开始低于对照组( $P < 0.05$ ); p53 mRNA表达量均低于对照组, 其变化与STAT1 mRNA表达变化无关( $P > 0.05$ , 图3).

2.4 IFN- $\gamma$ 和STAT1 ASON处理时, 胃癌细胞系SGC7901的凋亡情况 SGC7901胃癌细胞在各处理组和对照组凋亡情况无明显变化( $P > 0.05$ ).

2.5 胃癌组织中STAT1和P53蛋白的相关性 STAT1阳性率为42%(42/100), P53阳性率为28%(28/100). 经Spearman等级相关分析显示: STAT1与P53蛋白表达无关( $r = 0.10, P = 0.317$ , 图4).

## 3 讨论

STAT家族至少包括STAT1( $\alpha$ 和 $\beta$ )、2、3、3 $\beta$ 、4、5、6和果蝇STAT蛋白[即D-STAT(mrl)]等8个成员. STAT1作为STAT家族的重要成员, 是一

**创新盘点**  
本研究首先明确了人胃癌中IFN- $\gamma$ 可上调p53的表达, 继而通过IFN- $\gamma$ 以及STAT1 ASON对胃癌细胞系SGC7901中STAT1和p53 mRNA影响以及人胃癌组织中STAT1和P53蛋白的相关性的观察, 探讨了胃癌中IFN- $\gamma$ 对P53分子的调控作用.

■应用要点

本研究证实IFN- $\gamma$ 对P53存在调控作用并对其机制进行了初步探讨. 该结论可望进一步完善当前凋亡调控理论, 并为临床治疗提供新的角度和思考.

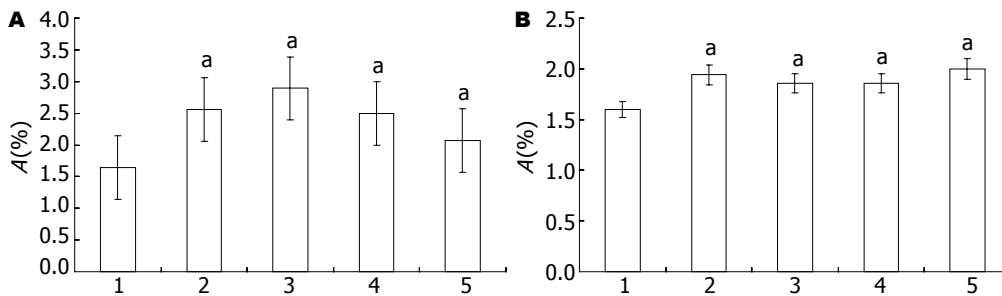


图 2 SGC7901细胞经IFN- $\gamma$  1 000 IU, IFN- $\gamma$  1 000 IU+STAT1 ASON(200、400及600 nmol/L)处理24 h后, STAT1和p53 mRNA表达的变化. A: STAT1; B: p53. 1: 对照组; 2: IFN- $\gamma$ ; 3: IFN- $\gamma$ +ASON 200 nmol/L; 4: IFN- $\gamma$ +ASON 400 nmol/L; 5: IFN- $\gamma$ +ASON 600 nmol/L. <sup>a</sup> $P$ <0.05 vs 对照组.

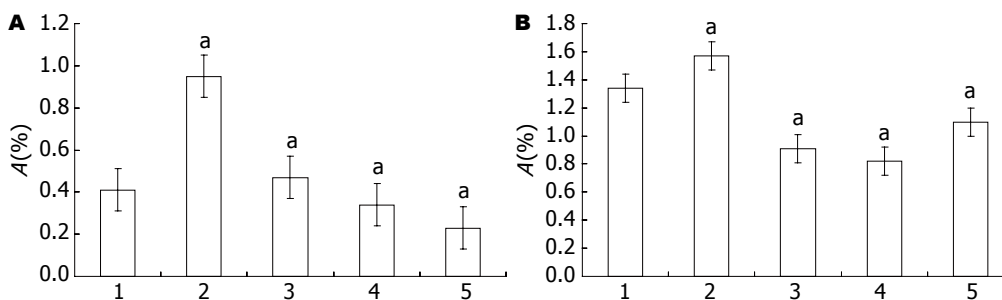


图 3 SGC7901细胞经IFN- $\gamma$  1 000 IU, 200、400及600 nmol/L STAT1 ASON处理24 h后, STAT1和p53 mRNA表达的变化. A: STAT1; B: p53. 1: 对照组; 2: IFN- $\gamma$ ; 3: ASON 200 nmol/L; 4: ASON 400 nmol/L; 5: ASON 600 nmol/L. <sup>a</sup> $P$ <0.05 vs 对照组.

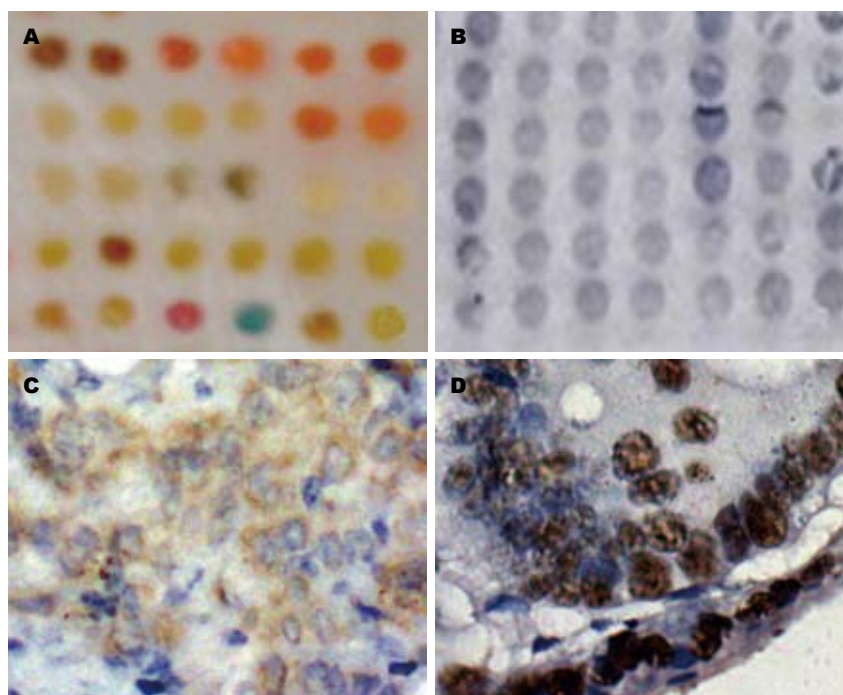


图 4 胃癌组织中STAT1和P53的表达(免疫组织化学染色). A: 组织微阵列的构建; B: 免疫组织化学染色切片( $\times 10$ ); C: STAT1( $\times 400$ ); D: P53( $\times 400$ ).

个抑癌基因, 可促肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>. IFN- $\gamma$ 等信号因子作用于JAK蛋白酪氨酸激酶(janus protein tyrosine kinase, JAK)1、2等, 使胞质中STAT1激活并形成二聚体, 进入细胞核促进相应靶基因转录, 从而促进细胞凋亡<sup>[18-21]</sup>. 胃癌中, STAT1具有重要临床意义<sup>[7,8,22]</sup>.

*p21<sup>waf</sup>*是STAT1促进细胞凋亡的重要调控点<sup>[17-19]</sup>, 我们的前期研究也表明胃癌中IFN- $\gamma$ -STAT1途径存在对*p21<sup>waf</sup>*表达的调控作用<sup>[7-9]</sup>. 研究表明, STAT1可通过非依赖P53<sup>[22-25]</sup>以及依赖P53两条途径来实现对*p21<sup>waf</sup>*的调控. 非依赖P53途径机制主要为STAT1可与*p21<sup>waf</sup>*上游转录调控

位点(SIE1, SIE2以及SIE3)结合, 从而引起细胞的生长抑制. 对IFN- $\gamma$ 促进细胞凋亡及 $p21^{waf}$ 表达上调这一现象的研究发现, 此过程也正是通过活化的STAT1结合 $p21^{waf}$ 上游相应的3个结合位点而行使功效的<sup>[24]</sup>. 依赖P53途径机制主要为, STAT1与P53相互作用, 通过调控 $p21^{waf}$ 表达增强细胞的生长抑制和促凋亡作用, 但是对于STAT1和P53之间的相互关系以及调控机制, 当前尚存在争议. 有研究显示STAT1可通过抑制MDM2蛋白的表达来上调P53的表达<sup>[15]</sup>, 但是也有研究显示PIAS1(STAT1抑制蛋白)是重要的促进P53表达的因子<sup>[26]</sup>. 胃癌中, IFN- $\gamma$ -STAT1途径与P53的关系, 当前尚无定论.

本研究以人体胃癌组织系SGC7901作为研究模型. SGC7901是1981年建立的一株胃癌淋巴结转移癌细胞系, 该细胞系具有凋亡率低的特点<sup>[16]</sup>. 通过IFN- $\gamma$ 处理SGC7901细胞24 h时, STAT1以及 $p53$  mRNA表达上升. 该现象提示胃癌中, IFN- $\gamma$ 可同时促进STAT1以及P53表达. 而当同时使用IFN- $\gamma$ 和STAT1 ASON处理SGC7901细胞时, 我们发现STAT1 mRNA表达出现抑制现象, 但 $p53$  mRNA表达无明显变化. 该现象提示胃癌中, IFN- $\gamma$ 对P53的上调并不完全依赖上调STAT1完成. 当进一步单独使用STAT1 ASON处理SGC7901细胞时, 发现STAT1 mRNA表达与 $p53$  mRNA表达也无关, 提示胃癌细胞中IFN- $\gamma$ 对P53的调控与IFN- $\gamma$ -STAT1途径之间可能并不存在相互关系. 同时, 在人胃癌组织的研究中, 我们也发现STAT1蛋白表达率与P53蛋白表达率无关. 由此我们认为IFN- $\gamma$ 上调胃癌细胞中P53的表达, 并不是通过IFN- $\gamma$ -STAT1途径完成的.

在本研究中, IFN- $\gamma$ 以及STAT1 ASON作用于胃癌SGC7901细胞, 其细胞凋亡水平无明显变化, 该结果与Beppu等<sup>[27]</sup>研究结果一致. 提示胃癌SGC7901细胞中可能存在多条凋亡抑制的途径.

#### 4 参考文献

- 1 NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. NCCN online, 2006, cited 2011. Available from: www.nccn.org
- 2 Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1415-1425
- 3 刘丽江, 张应天. 胃癌淋巴结微转移的组织学诊断及间质反应的研究. *中华病理学杂志* 2000; 29: 339-342
- 4 Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2209-2213

- 5 Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch* 1996; 428: 229-235
- 6 Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4347-4353
- 7 向春香, 邓昊, 罗海蓬, 刘丽江. 胃癌细胞SGC7901中STAT1, NF- $\kappa$ B p65和caspase 8的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2194-2200
- 8 邓昊, 镇鸿燕, 周红艳, 陈琼霞, 刘丽江. 人胃癌IFN- $\gamma$ -STAT1通路的作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1103-1107
- 9 邓昊, 黄莹, 高友晶, 镇鸿燕, 刘丽江. IFN- $\gamma$ 对人胃癌Survivin分子通路的调控作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3249-3253
- 10 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816
- 11 Gan H, Ouyang Q, Wang Y. [Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to cell proliferative activity and prognosis]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1996; 18: 244-246
- 12 Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, Pampallona S, Bosman FT, Givel JC. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1008-1015
- 13 Kim YW, Lee S, Park JH, Yoon TY, Park YK, Yang MH. An immunohistochemical study of the expression of p53 protein in colon cancer. *J Korean Med Sci* 1995; 10: 176-182
- 14 Diez M, Medrano M, Mugüerza JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, Martín A, Nogueras F, Ruiz A, Granell J. Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20: 3907-3912
- 15 Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 5811-5820
- 16 李莹, 韩炯, 王立峰, 林树新, 药立波, 俞强, 刘新平. 人胃癌细胞株抗脱落凋亡特性的分析. *第四军医大学学报* 2003; 24: 485-488
- 17 Huang YQ, Li JJ, Karparkin S. Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 6462-6468
- 18 Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-1635
- 19 Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 293-322
- 20 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584
- 21 Reed JC, Bischoff JR. BIRing chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell* 2000; 102: 545-548
- 22 Deng H, Wu RL, Chen Y, Liu LJ. STAT1 and survivin expression in full lymph node examined

■同行评价  
本文设计合理, 内容全面, 有一定的临床实用意义.

- gastric cancer by using tissue microarray technique. *Chin-Ger J Clin Oncol* 2006; 5: 249-252
- 23 Chen B, He L, Savell VH, Jenkins JJ, Parham DM. Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region. *Cancer Res* 2000; 60: 3290-3298
- 24 Xiao L, Naganawa T, Obugunde E, Gronowicz G, Ornitz DM, Coffin JD, Hurley MM. Stat1 controls postnatal bone formation by regulating fibroblast growth factor signaling in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004; 279: 27743-27752
- 25 Ihle JN. STATs and MAPKs: obligate or opportunistic partners in signaling. *Bioessays* 1996; 18: 95-98
- 26 Megidish T, Xu JH, Xu CW. Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1). *J Biol Chem* 2002; 277: 8255-8259
- 27 Beppu K, Morisaki T, Matsunaga H, Uchiyama A, Ihara E, Hirano K, Kanaide H, Tanaka M, Katanano M. Inhibition of interferon-gamma-activated nuclear factor-kappa B by cyclosporin A: A possible mechanism for synergistic induction of apoptosis by interferon-gamma and cyclosporin A in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 797-805

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 招聘生物医学编辑部主任

**本刊讯** 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

### ■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册。
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理。
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实。
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印。
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改。

### ■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用。

### ■ 薪资待遇面议

### ■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书。

# 人抗菌肽LL-37在溃疡性结肠炎组织中的表达及其与结肠炎症的关系

李懿璇, 王化虹, 迟雁

李懿璇, 王化虹, 迟雁, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

李懿璇, 博士, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

作者贡献分布: 王化虹与李懿璇对此文所作贡献占大部分; 迟雁对此文有部分贡献; 此课题由王化虹与李懿璇设计; 研究过程由李懿璇与迟雁操作完成; 数据分析及论文写作由李懿璇完成。

通讯作者: 王化虹, 主任医师, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科。

wanghuahong@medmail.com.cn

电话: 010-83572226

收稿日期: 2011-02-15 修回日期: 2011-04-20

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Correlation between expression of human cathelicidin peptide LL-37 and colon inflammation in patients with ulcerative colitis

Yi-Xuan Li, Hua-Hong Wang, Yan Chi

Yi-Xuan Li, Hua-Hong Wang, Yan Chi, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Correspondence to: Hua-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 West Shiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wanghuahong@medmail.com.cn

Received: 2011-02-15 Revised: 2011-04-20

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of human cathelicidin LL-37 in the colon mucosa of patients suffering from ulcerative colitis and to assess its relationship with colon inflammation.

**METHODS:** Thirty-two patients with ulcerative colitis were included in the study. The severity of ulcerative colitis was assessed using the Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UCDAI). The expression of LL-37 and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-4) in the colon mucosa was detected by real-time RT-PCR. Immunohistochemistry was used to investigate the location of the LL-37 peptide in the normal and inflamed colon mucosa. Colon epithelial cells were stimulated *in vitro* with cytokines to evaluate mechanisms that influence cathelicidin production.

**RESULTS:** The mRNA expression of LL-37 and cytokines in the colon mucosa was significantly elevated with the severity of disease activity in UC patients compared to controls (LL-37:  $4.97 \pm 6.95$ ,  $31.46 \pm 10.74$ ,  $75.50 \pm 13.19$  vs  $0.27 \pm 0.45$ ; TNF- $\alpha$ :  $97.04 \pm 23.74$ ,  $201.07 \pm 33.46$ ,  $290.81 \pm 30.45$  vs  $72.82 \pm 18.85$ ; IL-1 $\beta$ :  $72.98 \pm 38.03$ ,  $153.46 \pm 22.68$ ,  $211.34 \pm 25.12$  vs  $38.56 \pm 10.38$ ; IL-4:  $26.04 \pm 12.47$ ,  $46.38 \pm 15.12$ ,  $46.94 \pm 16.53$  vs  $19.34 \pm 11.61$ , all  $P < 0.05$ ). Significant correlations were found between the mRNA expression of LL-37 and cytokines ( $r = 0.965, 0.940, 0.628$ , all  $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry analysis showed that the LL-37 peptide was located in the colon epithelial surface in both normal controls and UC patients. In addition, the LL-37 peptide was detected easily in inflammatory cells infiltrating into the inflamed colon mucosa in UC patients. *In vitro* stimulation with cytokines did not up-regulate LL-37 expression in colon epithelial cells.

**CONCLUSION:** The up-regulation of LL-37 expression in inflamed colon mucosa of UC patients and high correlation between the expression of LL-37 and cytokines indicate a close relationship between LL-37 and immune inflammatory response in UC patients with ulcerative colitis; however, this process does not involve colonic epithelial cells.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Cathelicidin LL-37; Cytokines

Li YX, Wang HH, Chi Y. Correlation between expression of human cathelicidin peptide LL-37 and colon inflammation in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1359-1366

## 摘要

**目的:** 探讨LL-37在溃疡性结肠炎(UC)患者结肠黏膜组织中的表达及其与结肠炎症之间的关系。

**方法:** 选择2007-09/2008-12在北京大学第一医院消化内科确诊的UC患者32例,并按UC疾病活动指数(UCDAI)分为轻、中、重度活动组;选择同时期行结肠镜发现有结肠息肉的患者

## ■背景资料

目前炎症性肠病(IBD)的发病机制仍不明,细菌感染与免疫炎症为其核心机制。抗菌肽在控制感染维持内环境稳定中有重要意义。已证实LL-37表达于人的胃和结肠黏膜上皮,在胃肠道黏膜起着重要防御功能。很多研究提示抗菌肽的表达在IBD患者的结肠黏膜中存在异常,这种异常在IBD的发病机制中的作用尚不清。

## ■同行评议者

夏冰, 教授, 武汉大学中南医院消化内科; 许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## ■ 研发前沿

抗菌肽的作用广泛、复杂,除了具有广谱的直接杀灭病原微生物的作用,还具有强大的免疫调节功能.初步的研究已表明其在结肠黏膜中存在表达且在炎症性肠病中的表达存在异常,很多学者都关注于此,其在炎症性肠病的发病机制中发挥的作用已成为研究热点.

为对照组;用荧光定量PCR方法测定不同疾病活动度UC患者的炎症结肠黏膜中LL-37和炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4)的表达及其相互关系;用免疫组织化学方法观察LL-37在正常结肠黏膜和炎症黏膜中的表达部位;用炎症因子体外刺激结肠上皮细胞,观察其对LL-37表达的影响.

**结果:**活动期UC患者炎症结肠黏膜中LL-37和炎症因子的表达较正常黏膜增高(LL-37:  $4.97 \pm 6.95$ ,  $31.46 \pm 10.74$ ,  $75.50 \pm 13.19$  vs  $0.27 \pm 0.45$ ; TNF- $\alpha$ :  $97.04 \pm 23.74$ ,  $201.07 \pm 33.46$ ,  $290.81 \pm 30.45$  vs  $72.82 \pm 18.85$ ; IL-1 $\beta$ :  $72.98 \pm 38.03$ ,  $153.46 \pm 22.68$ ,  $211.34 \pm 25.12$  vs  $38.56 \pm 10.38$ ; IL-4:  $26.04 \pm 12.47$ ,  $46.38 \pm 15.12$ ,  $46.94 \pm 16.53$  vs  $19.34 \pm 11.61$ , 均 $P < 0.05$ ),且随疾病活动度的增加而增高,二者的表达呈正相关( $\gamma = 0.965, 0.940, 0.628$ , 均 $P < 0.01$ ); LL-37表达于人正常结肠黏膜和UC患者炎症结肠黏膜的表层上皮,另外在UC患者炎症黏膜中浸润的大量炎症细胞内存在高表达;体外炎症因子刺激并不能上调结肠上皮细胞中LL-37的表达.

**结论:**抗菌肽LL-37在活动期UC患者炎症结肠黏膜中的高表达及其与炎症因子呈正相关,提示其参与了UC的免疫炎症过程,但其机制可能与结肠上皮细胞无关.

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 抗菌肽LL-37; 炎症因子

李懿璇, 王化虹, 迟雁. 人抗菌肽LL-37在溃疡性结肠炎组织中的表达及其与结肠炎症的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1359-1366

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1359.asp>

## 0 引言

近几十年来有关炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的两大类疾病溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)发病机制的研究越来越多,目前公认为细菌感染和异常的免疫应答相互作用使黏膜炎症迁延不愈是IBD的机制核心<sup>[1-3]</sup>. 其中各种炎症因子表达的失衡与肠道炎症的发生和迁延密切相关<sup>[4-7]</sup>. 人的肠道黏膜内有内源性免疫系统来维持肠道内环境平衡<sup>[8,9]</sup>, 其中一大类非常重要的内源性免疫系统的效应器被称作cathelicidins, 目前发现唯一的人cathelicidin源抗菌肽为hCAP18/LL-37<sup>[10]</sup>. LL-37表达广泛<sup>[11-17]</sup>, 其功能和作用复杂<sup>[18-22]</sup>. 已证实LL-37表达于人的胃和结肠黏膜上皮, 在胃肠道黏膜起着重要防御功

能<sup>[12,13]</sup>. 很多研究提示抗菌肽的表达在IBD患者的结肠黏膜中存在异常<sup>[23-28]</sup>. 其机制及作用尚不清楚, 综合目前研究结果认为可能CD患者中抗菌肽是低表达并导致肠黏膜屏障的缺陷, 从而诱发细菌感染和慢性炎症<sup>[23,24,26]</sup>, 但UC患者中抗菌肽的表达及意义尚不清楚. 本研究主要揭示LL-37在UC患者结肠黏膜的表达情况及其与结肠炎症之间的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究通过了北京大学第一医院伦理委员会的伦理审批, 所有参加入组的患者都是自愿参加并签署知情同意书. UC组的选择标准: 选择2007-09/2008-12在北京大学第一医院消化内科确诊的UC患者. 诊断标准依据2007年中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组制定的炎症性肠病诊治规范; 病情的活动度采用Sutherland或Mayo疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分分为3级, 3-5分为轻度活动, 6-10分为中度活动, 11-12分为重度活动. 总共32例患者(平均年龄49.56岁)入选, 其中轻度活动组(UCDAI平均分4.1)10例, 中度活动组(UCDAI平均分8.3)12例, 重度活动组(UCDAI平均分11.2)10例. 对照组的选择标准: 同时期行结肠镜检查发现有结肠息肉的患者. 总共12例患者(平均年龄60.75岁)入选. UC组及对照组的排除标准: 伴有其他可能会影响试验结果的疾病者, 包括: 全身或局部的感染性疾病、炎症性皮肤病、恶性肿瘤等; 近期服用维生素D者; 患有严重心、肝、肺、肾疾病, 不能耐受结肠镜检查者; 拒绝取活检者; 另外UC组的排除标准还包括诊断不明确的各种肠炎. UC组: 在内镜下观察炎症部位结肠黏膜取活检组织1-2块. 对照组: 在内镜下观察息肉以外的正常结肠黏膜取活检组织1-2块. 将活检的结肠黏膜标本立即放入液氮中冷冻保存.

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA的制备、逆转录和普通PCR及实时荧光定量PCR:** 活检的结肠黏膜标本放在液氮中保存. 组织和细胞的RNA参照TRIzol(美国Invitrogen公司)的说明书用TRIzol方法提取, 用紫外分光光度计定量RNA的浓度. 取2  $\mu\text{g}$ 总RNA, 用0.5  $\mu\text{g}$ 的Oligo-dT(美国Promega公司)、10 mmol/L的dNTP(美国Promega公司)各1.25  $\mu\text{L}$ 和200 U M-MLV(美国Promega公司)配成25  $\mu\text{L}$ 反应体系, 逆转录合成cDNA, 具体参照M-MLV逆转录酶的说明书进行, 放入-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存.

引物序列及TaqMan探针(上海生工生物工



表 1 引物序列及TaqMan探针序列

引物名称	序列	产物大小(bp)
LL-37	上游引物	5'-ACCCAGCAGGGCAATCTC-3'
	下游引物	5'-GAAGGACGGGCTGGTGAAG-3'
	TaqMan探针	5'-TGTTATCCTTATCACAACACTGAT-3'
TNF- $\alpha$	上游引物	5'-GGCCCCAGAGGGAAGA-3'
	下游引物	5'-GGTTTGCTACAACATGGGCTACA-3'
	TaqMan探针	5'-TTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCC-3'
IL-1 $\beta$	上游引物	5'-GTTCCCTGCCACAGACCTT-3'
	下游引物	5'-CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA-3'
	TaqMan探针	5'-TGACCTGAGCACCTTCTTTCCCTTCATCTT-3'
IL-4	上游引物	5'-CCACGGACACAAGTGCATA-3'
	下游引物	5'-GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT-3'
	TaqMan探针	5'-TGAACAGCCTCACAGAGCAGAAGAACAACA-3'
GAPDH	上游引物	5'-CAGTCAGCCGCATCTTCTTTT-3'
	下游引物	5'-GTGACCAGGCGCCCAATAC-3'
	TaqMan探针	5'-CGTCGCCAGCCGAGCCACA-3'

## ■ 相关报道

有学者认为抗菌肽的高表达在炎症黏膜显著高于非炎症黏膜,提示其与结肠炎症反应持久放大有关。这些都提示,抗菌肽可能在炎症性肠病的发病机制中起一定作用。

程技术服务有限公司合成)见表1。对cDNA分别进行目的基因和管家基因的普通PCR扩增,将扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察条带。实时荧光定量PCR的反应体系为25  $\mu$ L, 包含模板cDNA 2  $\mu$ L, 上下游引物各0.75 pmol, 10 mmol/L的dNTP各0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ 反应缓冲液2.5  $\mu$ L, TaqMan探针5 pmol, Taq DNA聚合酶0.25  $\mu$ L。采用荧光定量PCR扩增仪(美国ABI公司Prism 7300操作系统)进行DNA的扩增,反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性10 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环。通过系统自带的软件得出样品的Ct值(荧光信号达到阈值的循环数), 将每个标本目的基因的Ct值与管家基因GAPDH的Ct值相比较, 换算成目的基因的表达量:  $2^{(Ct_{\text{管家基因}}-Ct_{\text{目的基因}})}$ , 经过同一个阳性对照校正后得出目的基因表达的相对水平。由于目的基因在某些标本中的表达非常少, 故最终表达水平以原始结果 $\times$ 100倍表示。

1.2.2 免疫组织化学: 活检的结肠黏膜标本放入40 g/L的甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片4  $\mu$ m。脱蜡、水化后用3%过氧化氢甲醇室温放置20 min以消除内源性过氧化物酶活性。用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)微波法进行抗原修复。用正常的山羊血清封闭液进行封闭后, 滴加1:200兔抗人LL-37一抗(美国Santa Cruz公司)4  $^{\circ}$ C过夜, 滴加通用型二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司二步法免疫组织化学检测试剂盒)室温放置1 h, 用DAB溶液(北京中杉金桥生物技术有限公司浓缩型DAB试剂盒)显色3 min, 流水终止

反应后苏木素复染核, 并脱水、透明后封片。染色阳性标准: 细胞胞质内见到棕黄色颗粒。

1.2.3 细胞培养: 人结肠癌细胞系HT-29在含50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C恒温的培养箱中培养, 细胞培养基为含2 mmol/L的L-谷氨酰胺和100 mL/L胎牛血清(美国Hyclone公司)的RPMI 1640培养基(美国Hyclone公司)。在培养基内分别加入终浓度为0.1、1、10、100  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ (美国Millipore公司)或IL-4(美国Peprotech Asia公司), 阳性对照组中加入终浓度2 mmol/L的丁酸钠, 继续培养细胞24及48 h。收集细胞后用RT-PCR的方法测定LL-37的表达。

**统计学处理** 所有计量资料以mean $\pm$ SD表示, 用SPSS13.0软件对资料进行分析。由于部分数据方差不齐, 用独立样本近似t检验比较两组间的差异; 用单因素方差分析近似F检验比较两组以上的组间差异; 用Pearson相关性检验分析LL-37和细胞因子间的相关性,  $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LL-37 mRNA在结肠黏膜中的表达 29/32例UC组患者和4/12例对照组患者的结肠黏膜组织在本实验条件下有LL-37 mRNA的扩增。对于在本实验条件下未检测到目的基因扩增的标本, 即认为无目的基因的表达, 表达水平设定为0。UC组患者炎症部位结肠黏膜LL-37 mRNA的表达水平为36.94 $\pm$ 30.44, 对照组患者正常结肠黏膜LL-37 mRNA的表达水平为0.27 $\pm$ 0.45, 较UC

### ■创新盘点

本文首次从不同层面证实了抗菌肽LL-37在结肠的表达及其与结肠炎症的密切关系。

表 2 LL-37和细胞因子mRNA在不同疾病活动度的UC患者结肠黏膜中的表达 (mean ± SD)

分组	n	LL-37	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4
对照组	12	0.27 ± 0.45	72.82 ± 18.85	38.56 ± 10.38	19.34 ± 11.61
UC轻度活动组	10	4.97 ± 6.95	97.04 ± 23.74	72.98 ± 38.03	26.04 ± 12.47
UC中度活动组	12	31.46 ± 10.74	201.07 ± 33.46	153.46 ± 22.68	46.38 ± 15.12
UC重度活动组	10	75.50 ± 13.19	290.81 ± 30.45	211.34 ± 25.12	46.94 ± 16.53

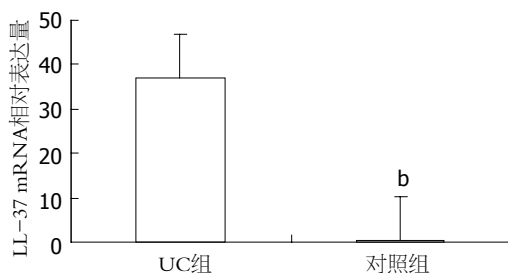


图 1 UC组和对照组结肠黏膜LL-37 mRNA的相对表达水平。<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs UC组。

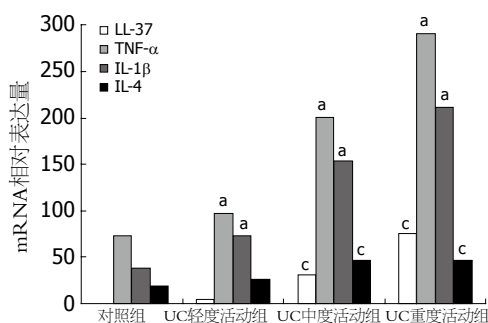


图 2 LL-37和细胞因子mRNA在不同疾病活动度的UC患者结肠黏膜的表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs UC轻度活动组。

组明显降低, 两者相比具有显著性差异( $P < 0.001$ , 图1)。LL-37在不同疾病活动程度的UC患者结肠黏膜的表达有差异, 随着UCDAI的评分增加, LL-37的表达进行性升高, 即重度活动组>中度活动组>轻度活动组( $P < 0.05$ ), 但轻度活动组和对照组LL-37的表达无显著性差异(表2, 图2)。

2.2 LL-37的表达与炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-4的相关性 各种炎症因子的表达在UC组较对照组明显增高, 且随着UCDAI的评分增加而升高, 其中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达在UC重度活动组>UC中度活动组>UC轻度活动组>对照组( $P < 0.05$ ), IL-4在UC中、重度活动组的表达也较轻度活动组明显增加(表2, 图2)。LL-37的表达和炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-4的表达呈明显的正相关关系( $\gamma = 0.965, 0.940, 0.628$ , 均 $P < 0.01$ )。

2.3 LL-37蛋白在结肠黏膜中的表达 LL-37表达于人正常结肠黏膜的表层上皮和临近隐窝的上

部, 而深部隐窝和固有层腺体上皮几乎无表达。LL-37在UC患者炎症部位结肠黏膜的表达与正常结肠黏膜相似, 也是仅位于结肠表层上皮, 且与正常结肠黏膜相比表达无特别的差异。免疫组织化学灰度值结果显示LL-37在对照组结肠黏膜表层上皮的表达为 $0.1877 \pm 0.0015$ , 在UC炎症部位结肠黏膜表层上皮的表达为 $0.1893 \pm 0.0014$ , 两者之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。此外, LL-37在UC患者炎症部位结肠黏膜的隐窝脓肿和固有层内浸润的大量炎症细胞中高表达, 提示LL-37可能在UC患者的结肠黏膜炎症中发挥重要作用(图3)。

2.4 体外炎症因子对结肠上皮细胞LL-37表达的影响 在本实验条件下(荧光定量PCR), 结肠上皮细胞HT-29的LL-37 mRNA的表达是低于检测下限的, 用不同浓度(0.1、1、10、100  $\mu\text{g/L}$ )的炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 或IL-4体外刺激结肠上皮细胞HT-29 24或48 h后, 仍然不能检测到LL-37的表达, 而作为阳性对照组, 用丁酸(2 mmol/L)刺激HT-29细胞24 h后即有LL-37的表达(图4)。故认为细胞因子并不能上调结肠上皮细胞LL-37的表达。

### 3 讨论

IBD的两大类主要疾病UC和CD是一组由多因素引起的以慢性病程、反复发作为特点的慢性非特异性肠道炎症性疾病。虽然其结肠炎症的具体病因和机制尚未完全清楚, 但目前研究的进展表明: 在易感人群中, 环境因素、肠道内微生物和机体的免疫系统三者相互作用导致异常的免疫应答<sup>[3,29]</sup>。这种异常的免疫应答通过内源性免疫系统以及后天获得性免疫系统介导并最终引起肠道炎症<sup>[30]</sup>, 其中内源性免疫系统的主要效应器-抗菌肽以其强大的杀灭病原微生物和免疫调节功能在IBD的发病机制中受到越来越多的关注<sup>[31]</sup>。

实际上抗菌肽cathelicidins最初是在皮肤病中的研究广泛且成熟, 其在炎症性皮肤病中表达异常且参与疾病的发病机制, 如: cathelicidins在特应性皮炎的患者中表达是降低的, 并可以

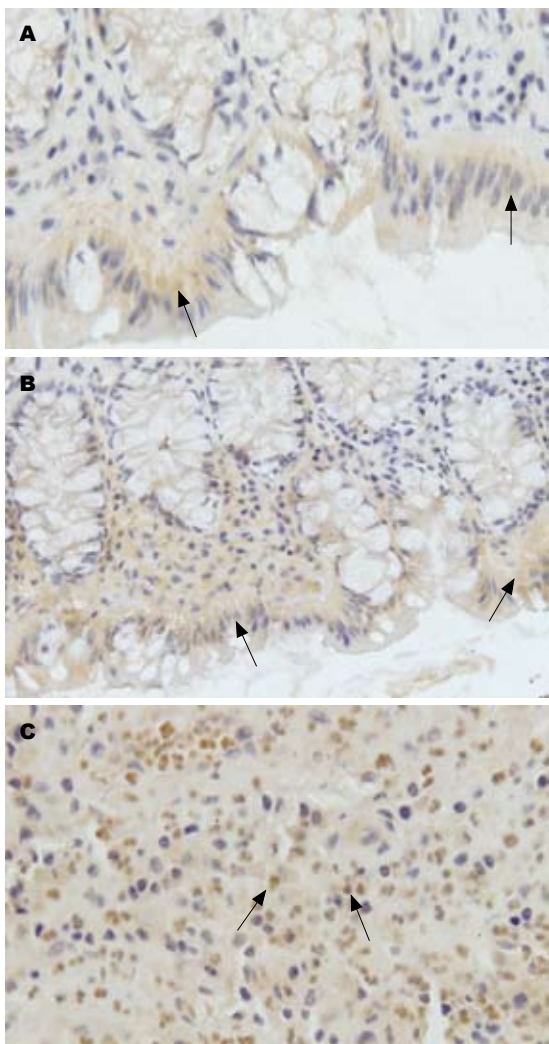


图 3 LL-37在各黏膜组织中的表达(免疫组织化学染色 × 1000). A: 正常结肠黏膜组织的表层上皮细胞; B: UC炎症部位黏膜组织的表层上皮细胞; C: UC炎症部位黏膜组织中浸润的炎症细胞.

导致二重感染的几率大大增加; 在红斑痤疮的患者中cathelicidins过度表达并形成异常结构, 可导致局部的皮肤炎症和血管反应; 而在银屑病患者中cathelicidins与自身DNA结合并诱发自身免疫反应<sup>[32,33]</sup>. 随着研究的深入, 发现cathelicidins在结肠黏膜存在表达, 且与IBD的发病机制有密切联系, LL-37在UC患者的结肠黏膜表达显著升高, 而在CD患者中表达无类似升高, 但这种异常表达在IBD发病机制中的意义尚不明确<sup>[28]</sup>.

本研究结果显示: LL-37在UC患者炎症部位结肠黏膜的表达较对照组正常结肠黏膜显著升高; 同时我们初步探讨了不同UC疾病活动度患者中LL-37表达的差异: 随着UC疾病活动度的增加, LL-37的表达进行性升高. 这提示LL-37的表达和UC患者的疾病严重程度或疾病活动度有密切关系, 其表达水平有助于反应UC目前疾病的炎症状

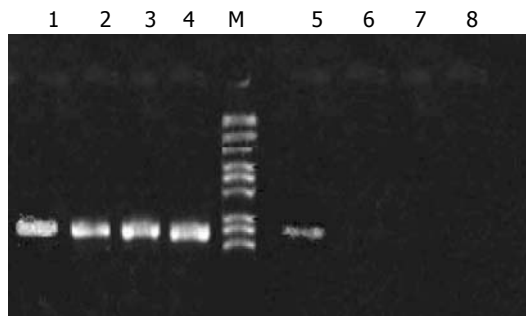


图 4 体外炎症因子对结肠上皮细胞LL-37表达的影响. 1-4: 管家基因GAPDH的表达; 5-8: 目的基因LL-37的表达; 1, 5: 丁酸刺激细胞; 2, 6: TNF- $\alpha$ 刺激细胞; 3, 7: IL-1 $\beta$ 刺激细胞; 4, 8: IL-4刺激细胞; M: Marker.

态及程度. 既往的研究曾表明UC患者LL-37的表达较健康体检者正常结肠黏膜升高, 无论是在炎症部位还是非炎症部位的结肠黏膜, 但在炎症部位结肠黏膜中这种升高更为显著<sup>[28]</sup>, 这也支持我们的研究结果LL-37的表达与UC患者的结肠炎症程度有关; 近期Wehkamp的研究表明另一大类抗菌肽-防御素HBD-2和HBD-3的表达在UC患者的结肠黏膜也是显著增高的, 而且主要是炎症部位结肠黏膜的表达增高<sup>[23]</sup>; 有研究者认为HBD2的高表达在炎症黏膜显著高于非炎症黏膜提示HBD2与结肠炎症反应持久放大有关<sup>[34]</sup>.

为了进一步评价LL-37在UC患者中的高表达和结肠炎症之间的关系, 我们研究了LL-37的表达和炎症因子的关系. 炎症因子是在IBD发病机制中起关键作用的一类免疫炎症分子<sup>[35]</sup>; 他是由免疫细胞产生的一类短肽, 在细胞之间起信号传递的作用, 通过自分泌、旁分泌和内分泌途径能够介导局部和全身性炎症反应<sup>[6]</sup>. IBD中大量致炎因子和调节性炎症因子的表达失衡导致了肠道黏膜的破坏程度并决定了疾病的表型<sup>[36]</sup>. TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 是两个在UC发病机制中非常重要的致炎因子, 许多研究都表明其在UC患者中的表达显著升高<sup>[34,37,38]</sup>; Olsen和Guimbaud的研究提示TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的表达随着活动期UC疾病活动度的增加而相应的升高, 和结肠炎症呈很好的相关性<sup>[7,39]</sup>. 但是很多调节性炎症因子如IL-4等在IBD的表达及作用尚研究的不透彻, 不同的研究观察到IL-4在UC中的表达也不一致<sup>[7,40-42]</sup>; IL-4对T、B淋巴细胞具有调节作用, 在肠道被认为是一个免疫抑制性分子, 产生IL-4的Th2型CD4 T淋巴细胞在IBD的免疫病理机制中也起非常重要的作用<sup>[43]</sup>. 我们的研究表明细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-4在UC患者炎症部位结肠黏膜的表达较对照组正常结肠黏膜显著升高,

**应用要点**  
本文为进一步探讨UC患者发病机制开拓了新思路, 为进一步寻找阻断UC患者疾病过程提供理论依据.

#### ■同行评价

本文设计合理, 方法可靠, 对溃疡性结肠炎发生机制的深入认识有参考价值.

并和UC疾病活动度有关; 其中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达随着疾病活动度的增加而显著升高, IL-4表达也随着疾病活动度的增加有升高的趋势, 特别是在中、重度患者中, 但没有前两者明显.

进一步相关性研究的结果显示LL-37的表达与炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-4呈明显的正相关, 提示LL-37可能和UC异常免疫炎症反应有密切关系. 一方面, LL-37的表达在某些细胞或组织中受炎症因子的调控: 如炎症因子IL-6和IFN- $\gamma$ 可以刺激外周血单核细胞使LL-37蛋白的分泌量明显增加<sup>[44]</sup>; 特应性皮炎被认为与UC类似, 是一种Th2应答为主的皮肤炎症性疾病, Howell等<sup>[45]</sup>的研究发现Th2细胞因子IL-4和IL-13可以抑制抗菌肽的LL-37在角质细胞的表达而使特应性皮炎患者皮肤感染的机会增加; 另外发现, LL-37基因中有可以和IL-6结合的增强子, IL-6在某些上皮中可以调节LL-37的表达<sup>[11,46]</sup>. 另一方面, LL-37反过来也具有趋化炎症细胞、调节机体免疫功能的作用: 它具有对单核细胞、肥大细胞、中性粒细胞和T淋巴细胞的趋化作用<sup>[47-49]</sup>, 可以促进肥大细胞脱颗粒释放组胺<sup>[50]</sup>, 并能够调控20多种趋化因子及其受体的表达, 已证明LL-37可以上调趋化因子MCP-1和IL-8的表达<sup>[51]</sup>; 还促进DC细胞的成熟从而增强Th1细胞的应答<sup>[52]</sup>. 因此, LL-37与机体免疫功能有密切关系, 本研究的结果-LL-37和炎症因子表达的高度正相关性-说明其在UC异常免疫炎症反应中发挥重要作用.

LL-37在胃肠道的表达主要位于胃和结肠黏膜, 并可以分泌至胃肠道黏膜表面, 但在小肠黏膜中几乎无表达<sup>[12,13]</sup>. 本研究发现LL-37在人正常结肠黏膜和IBD患者炎症部位结肠黏膜的表达部位类似, 主要位于表层上皮细胞及临近的隐窝上部, 而在深部隐窝上皮未发现其表达, Hase等和Schauber等的研究与我们的研究结果相符合<sup>[12,28]</sup>. 另外我们首次发现LL-37蛋白表达于UC炎症部位结肠黏膜的隐窝脓肿和固有层内浸润的大量炎症细胞中, 因此我们推测LL-37参与UC免疫炎症过程的机制可能为: LL-37的表达在结肠上皮细胞水平或是炎症细胞水平或是二者兼有受炎症因子的调控.

进一步比较LL-37蛋白在正常结肠黏膜表层上皮和UC炎症部位结肠黏膜表层上皮的表达, 结果显示LL-37的表达在两者之间无显著性差异; 另外, 体外炎症因子刺激结肠上皮细胞系HT-29后, 不能诱导LL-37的表达. 据此实验结果, 可以认为LL-37的表达在结肠上皮细胞水平不受

炎症因子的调控. 在正常生理情况下结肠表层上皮细胞中即表达LL-37, 有活性的LL-37被分泌至肠腔后在肠道表面形成一层薄膜屏障可以抑制细菌的黏附和生长, 这在维持宿主和肠道菌群之间的内环境稳定中具有重要意义<sup>[53]</sup>; 当细菌入侵时, 肠道的感受器被激活, 结肠上皮细胞在细菌的刺激下LL-37表达升高, 形成控制细菌入侵的第一道防线<sup>[12,54]</sup>; Islam等发现志贺菌却可以引起肠道上皮抗菌肽LL-37表达下降, 这被认为是细菌逃逸机体对其防御的一种机制<sup>[55]</sup>. 因此, 结肠上皮细胞表达的LL-37可能是肠道黏膜屏障抗感染的效应器, 而与UC的异常免疫炎症反应无关.

最初LL-37的表达即是在骨髓中发现的, 随后证实LL-37广泛存在于不同类型的免疫炎症细胞中, 包括单核、NK、T、B淋巴细胞, 肥大细胞及中性粒细胞<sup>[44,56-58]</sup>. 另外, 当感染急性志贺菌痢的时候, 结肠黏膜的固有层内有大量炎症免疫细胞浸润并表达cathelicidins抗菌肽; 研究表明, cathelicidins的转录活性和结肠炎症程度是匹配的, 炎症感染最重的部位其转录活性也最高, 随着感染控制后, 固有层内的免疫炎症细胞消失, 同时也伴随着固有层cathelicidins的表达下降<sup>[59]</sup>. 据此, 我们推测LL-37在UC患者中的高表达很可能是由UC患者炎症黏膜内大量炎症细胞浸润并产生的, 其和UC患者结肠炎症的密切关系也很可能是通过炎症细胞介导的.

Schauber等<sup>[28]</sup>认为LL-37在不同组织的表达可能受不同因素的调控, LL-37表达的受调节因素可能具有组织特异性. 本研究证实LL-37表达于UC患者炎症结肠黏膜的表层上皮, 但更重要的是, 表达于局部隐窝脓肿和固有层内浸润的大量炎症细胞中; 因此虽然我们的研究提示LL-37在结肠上皮细胞水平不受炎症因子的调控, 尚需要进一步研究证明LL-37在UC炎症细胞的表达是否受炎症因子的调控, 即: LL-37在炎症细胞中的表达是否和UC异常免疫炎症反应有关, 这需要进一步的研究去证实.

总之, 本研究初步观察探讨了抗菌肽LL-37在UC患者中的表达情况, 其在活动期UC患者炎症结肠黏膜中的高表达及其与炎症因子的正相关关系提示其参与了UC的免疫炎症过程; LL-37蛋白表达于UC患者炎症结肠黏膜的表层上皮及浸润的炎症细胞中, 但其参与UC免疫炎症过程的机制可能与结肠上皮细胞无关.

#### 4 参考文献

- 1 Schmidt C, Stallmach A. Etiology and pathogenesis

- of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 127-145
- 2 Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46: 25-54
  - 3 Stefanelli T, Malesci A, Repici A, Vetrano S, Danese S. New insights into inflammatory bowel disease pathophysiology: paving the way for novel therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 413-418
  - 4 Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ. T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997; 150: 91-97
  - 5 Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Büschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999; 44: 812-818
  - 6 Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-4288
  - 7 Olsen T, Goll R, Cui G, Husebekk A, Vonen B, Birketvedt GS, Florholmen J. Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1312-1320
  - 8 Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 147-151
  - 9 Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 82-88
  - 10 Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1408-1425
  - 11 Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* 1999; 67: 2561-2566
  - 12 Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* 2002; 70: 953-963
  - 13 Hase K, Murakami M, Iimura M, Cole SP, Horibe Y, Ohtake T, Obonyo M, Gallo RL, Eckmann L, Kagnoff MF. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2003; 125: 1613-1625
  - 14 Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9541-9546
  - 15 Chromek M, Slamová Z, Bergman P, Kovács L, Podracká L, Ehrén I, Hökfelt T, Gudmundsson GH, Gallo RL, Agerberth B, Brauner A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006; 12: 636-641
  - 16 Malm J, Sørensen O, Persson T, Frohm-Nilsson M, Johansson B, Bjartell A, Lilja H, Ståhle-Bäckdahl M, Borregaard N, Egesten A. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun* 2000; 68: 4297-4302
  - 17 Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1090-1095
  - 18 Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2206-2214
  - 19 Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol* 2007; 601: 185-194
  - 20 Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 379-389
  - 21 Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003; 111: 1665-1672
  - 22 Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, Sandstedt B, Borregaard N, Tham E, Sørensen OE, Weber G, Ståhle M. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int J Cancer* 2005; 114: 713-719
  - 23 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 215-223
  - 24 Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18129-18134
  - 25 Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 903-910
  - 26 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaeffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-1664
  - 27 Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A, Schnabel A, Kays RJ, Fellermann K, Burk O, Schwab M, Clevers H, Bevins CL, Stange EF. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007; 179: 3109-3118
  - 28 Schaubert J, Rieger D, Weiler F, Wehkamp J, Eck M, Fellermann K, Scheppach W, Gallo RL, Stange EF. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 615-621

- 29 Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2058-2069
- 30 Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-4812
- 31 Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 370-378
- 32 Schaubert J, Ruzicka T, Rupec RA. [Cathelicidin LL-37. A central factor in the pathogenesis of inflammatory dermatoses?]. *Hautarzt* 2008; 59: 72-74
- 33 Schaubert J, Gallo RL. The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol* 2008; 17: 633-639
- 34 Chang YY, Ouyang Q. [Expression and significance of mucosal beta-defensin-2, TNFalpha and IL-1beta in ulcerative colitis]. *Zhonghua Neike Zazhi* 2008; 47: 11-14
- 35 Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007; 149: 173-186
- 36 José León A, Garrote JA, Arranz E. [Cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Med Clin (Barc)* 2006; 127: 145-152
- 37 Raddatz D, Bockemühl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547-557
- 38 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-179
- 39 Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, Quartier G, Vidon N, Giroud JP, Couturier D, Chaussade S. Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2397-2404
- 40 Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2441-2446
- 41 Nielsen OH, Køppen T, Rüdiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1786-1793
- 42 Kmiec Z. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998; 46: 143-155
- 43 Iijima H, Takahashi I, Kishi D, Kim JK, Kawano S, Hori M, Kiyono H. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice. *J Exp Med* 1999; 190: 607-615
- 44 Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000; 96: 3086-3093
- 45 Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE, Leung DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 2006; 24: 341-348
- 46 Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol Immunol* 2005; 42: 903-912
- 47 Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1996; 271: 2935-2940
- 48 Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Identification of human neutrophil-derived cathelin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 1997; 186: 739-747
- 49 Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002; 106: 20-26
- 50 Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1066-1075
- 51 Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 2002; 169: 3883-3891
- 52 Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 451-459
- 53 Zasloff M. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8913-8914
- 54 Akbari MR, Haghghi HR, Chambers JR, Brisbin J, Read LR, Sharif S. Expression of antimicrobial peptides in cecal tonsils of chickens treated with probiotics and infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1689-1693
- 55 Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G. Down-regulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001; 7: 180-185
- 56 Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 195-199
- 57 Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* 1997; 90: 2796-2803
- 58 Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003; 170: 2274-2278
- 59 Raqib R, Sarker P, Bergman P, Ara G, Lindh M, Sack DA, Nasirul Islam KM, Gudmundsson GH, Andersson J, Agerberth B. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9178-9183

## *k-ras*基因在中国结直肠癌患者中的突变状态

刘伟, 王丽, 余英豪, 王旭洲, 武一曼, 吴在增, 欧阳学农, 王烈

刘伟, 余英豪, 王旭洲, 吴在增, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025  
王丽, 福建省人民医院病理科 福建省福州市 350003  
武一曼, 福建中医药大学病理学教研室 福建省福州市 350003  
欧阳学农, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科 福建省福州市 350025  
王烈, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025  
刘伟, 主要从事肿瘤病理诊断及消化系统肿瘤的基础应用研究。  
中国人民解放军南京军区科研基金资助项目, No. 10MA107  
作者贡献分布: 此课题由刘伟与余英豪设计; 技术操作由刘伟、王丽、欧阳学农、王烈、武一曼、王旭洲及吴在增完成; 数据分析由刘伟与王丽完成; 本论文写作由刘伟、王丽及余英豪完成。  
通讯作者: 余英豪, 教授, 主任医师, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。yuyinghao0808@126.com  
电话: 0591-83717703 传真: 0591-83717703  
收稿日期: 2010-12-25 修回日期: 2011-02-28  
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-05-08

### Detection of *k-ras* gene mutations in Chinese patients with colorectal cancer

Wei Liu, Li Wang, Ying-Hao Yu, Xu-Zhou Wang, Yi-Man Wu, Zai-Zeng Wu, Xue-Nong Ouyang, Lie Wang

Wei Liu, Ying-Hao Yu, Xu-Zhou Wang, Zai-Zeng Wu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Li Wang, Department of Pathology, Fujian People's Hospital, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Yi-Man Wu, Department of Pathology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Lie Wang, Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China  
Supported by: the Scientific Research Foundation of Nanjing Military Command of Chinese PLA, No. 10MA107  
Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com  
Received: 2010-12-25 Revised: 2011-02-28  
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-05-08

### Abstract

**AIM:** To investigate *k-ras* gene mutations and to

analyze their clinical significance in Chinese patients with colorectal cancer.

**METHODS:** A total of 280 surgical specimens taken from patients with colorectal cancer who were treated at Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command between January 2008 and December 2009 and had complete clinical data were used in the study. Six *k-ras* gene mutations at codon 12 (35G>A, 35G>T, 35G>C, 34G>A, 34G>T, 34G>C) and one at codon 13 (38G>A) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and direct sequencing. A comparison of results obtained by the two methods was then performed.

**RESULTS:** The overall positive rate of *k-ras* gene mutations obtained by direct sequencing was 33.57% (94/280), and the positive rate of mutations at codon 12 [4.29% (12/280) for 35G>A, 0.36% (1/280) for 35G>T, 0.36% (1/280) for 35G>C, 2.86% (8/280) for 34G>A, 3.57% (10/280) for 34G>T, and 0.36% (1/280) for 34G>C] was 14.64% (41/280) and 7.5% (21/280) at codon 13. Of 94 patients who were demonstrated to have *k-ras* gene mutations by direct sequencing, 91 were confirmed by qPCR [sensitivity, 96.8% (91/94)]. Meanwhile, of 186 patients who were demonstrated to have no *k-ras* gene mutation by direct sequencing, 184 were confirmed by qPCR [specificity, 98.9% (184/186)]. The matching rate between the two methods was 98.2%. *K-ras* gene mutations were significantly associated with sex and age (both  $P < 0.05$ ), but not with tumor site, differentiation, depth of invasion, TNM stage, lymph node metastasis, or distant metastasis (all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** A high proportion of *k-ras* gene mutations (33.57%) were detected in Chinese patients with colorectal cancer. qPCR may be an accurate, rapid and simple method for detection of *k-ras* gene mutations in patients with colorectal cancer. There was no significant correlation between *k-ras* gene mutations and biological behavior of colorectal cancer, though a higher rate of gene mutations were detected in female patients older than 60 years.

### ■背景资料

在应用抗EGFR单抗治疗结直肠癌的靶向治疗中, 部分患者的预后能够改善, 而部分患者并未能从中获益, 寻求能够有效预测靶向治疗疗效的指标是临床的迫切需要。

### ■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

## ■ 研发前沿

结直肠癌的治疗仍以手术为主,放化疗为辅,但大部分患者在诊断时已属晚期,化疗效果不明显,寻找有效的化疗药物以提高疗效一直是肿瘤学界的研究方向。

**Key Words:** Colorectal cancer; *k-ras* gene; Gene mutation; Direct sequencing; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; Targeted therapy; Clinicopathological parameters

Liu W, Wang L, Yu YH, Wang XZ, Wu YM, Wu ZZ, Ouyang XN, Wang L. Detection of *k-ras* gene mutations in Chinese patients with colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1367-1374

## 摘要

**目的:** 评价中国结直肠癌患者中*k-ras*基因突变状态及其与临床病理参数的关系。

**方法:** 收集2008-01/2009-12在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的临床资料完整的结直肠癌石蜡包埋组织280例,分别应用实时荧光定量PCR和直接测序法检测结直肠癌中*k-ras*基因外显子2中第12、13编码子上最常见的7种突变类型,即第12编码子的35G>A、35G>T、35G>C、34G>A、34G>T、34G>C及第13编码子的38G>A,同时将两种检测结果进行比对分析。

**结果:** (1)经直接基因测序,确认在280例结直肠癌中,*k-ras*基因测序阳性(基因突变型)94例,阳性率33.57%(94/280),其中第12编码子的35G>A、35G>T、35G>C、34G>A、34G>T及34G>C的突变率分别为14.64%(41/280)、4.29%(12/280)、0.36%(1/280)、2.86%(8/280)、3.57%(10/280)、0.36%(1/280),第13编码子的38G>A的突变率为7.5%(21/280);(2)94例*k-ras*基因测序阳性(基因突变型)病例中,实时荧光定量PCR阳性91例[灵敏度96.8%(91/94)],阴性3例;186例基因测序阴性(野生型)中,实时荧光定量PCR阴性184例[特异性98.9%(184/186)],阳性2例;实时荧光定量PCR法与直接基因测序法符合率为98.2%[(91+184)/280];(3)*k-ras*基因突变与患者性别、年龄相关(均 $P<0.05$ ),而与肿瘤部位、分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移及远处转移无相关性(均 $P>0.05$ )。

**结论:** (1)中国结直肠癌患者中存在较大比例的*k-ras*基因突变(33.57%),在临床选取表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂和抗EGFR单抗靶向药物治疗结直肠癌患者之前均应常规检测*k-ras*基因突变状态,从而为靶向治疗提供可靠的参考依据;(2)实时荧光定量PCR检测结果与基因测序检测结果高度一致,实时荧光定量PCR能够准确、快速、简便的检测出结直肠癌*k-ras*基因突变位点,可用于结直肠癌*k-ras*基因突变的检测;(3)*k-ras*基因突

变与结直肠癌的生物学行为无明显相关性,但在 $\geq 60$ 岁的女性人群中*k-ras*基因突变率较高。

**关键词:** 结直肠癌; *k-ras*基因; 基因突变; 直接基因测序法; 实时荧光定量PCR; 靶向治疗; 临床病理参数

刘伟, 王丽, 余英豪, 武一曼, 王旭州, 吴在增, 欧阳学农, 王烈. *k-ras*基因在中国结直肠癌患者中的突变状态. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1367-1374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1367.asp>

## 0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是严重危害人类生命健康的临床最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球约排第3位,在中国居第4位。目前,其治疗仍以手术为主,放化疗为辅,但大部分患者在诊断时已属晚期,化疗效果不明显,寻找有效的化疗药物以提高疗效一直是肿瘤学界的研究方向。近年来出现的靶向治疗,促进了个体化治疗的发展,明显提高了肿瘤治疗的疗效。在结直肠癌靶向治疗中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂和抗EGFR单抗[西妥昔单抗(cetuximab, C225, 商品名Erbixitux)、帕尼单抗(panitumumab, 商品名Vectibix)]能特异性地抑制具有野生型*k-ras*基因的CRC细胞的生长,使患者的预后得到改善,而具有*k-ras*基因突变型的CRC患者并未能获益,因而,CRC中*k-ras*基因的突变状态是决定靶向治疗是否有效的关键性指标<sup>[1-14]</sup>。本研究采用大宗病例研究,应用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)和直接基因测序法(direct sequencing)检测*k-ras*基因外显子2中第12、13编码子上最常见的7种突变类型,并将两种检测结果进行对比分析,评价*k-ras*基因突变与CRC患者的临床病理参数的关系,以期了解中国CRC人群中*k-ras*基因突变状态,同时为CRC的靶向治疗及预后判断提供可靠的参考依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2008-01/2009-12在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的临床资料完整的CRC组织标本280例,手术标本经40 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,3  $\mu\text{m}$ 厚切片,进行HE染色确认均为结直肠腺癌;所有病例术前均未行放化疗。患者中男170例,女110例,年龄21-92(平均56.5)岁。采用2000年WHO结直肠肿瘤TNM



分期标准进行分类. *k-ras*基因突变检测试剂盒(FQ-PCR法), 购自北京金普嘉医疗科技有限公司; FQ-PCR仪(ABI Step One Real-time PCR System), ABI 3730测序仪(Applied Biosystems), 石蜡切片机(LEICA RM2245), 电热恒温干燥箱(上海-恒科技有限公司).

## 1.2 方法

### 1.2.1 FQ-PCR法检测*k-ras*基因突变:

(1)石蜡样本DNA提取[使用TaKaRa公司的石蜡样本处理试剂(DEXPAT)]: 选取全部为CRC组织的石蜡包埋标本, 连续切3张10  $\mu\text{m}$ 厚切片, 用灭菌小镊子将组织薄片放入1.5 mL EP管中, 包埋组织至少需要6 mm $\times$ 6 mm大小; 颠倒混合DEXPAT试剂, 向装有实验材料的EP管中加入0.5 mL; 盖上EP管盖, 100  $^{\circ}\text{C}$ 加热处理10 min; 加热后立即进行12 000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min; 用移液枪吸取水层, 避免吸取石蜡膜、树脂以及组织残渣; 吸取的水层直接作为PCR反应的模板, 进行PCR反应; (2)PCR扩增: 从试剂盒中取出各反应成分, 在冰上融化并颠倒混匀后短暂离心. 设定所需的PCR反应数量为 $n$ ( $n$  = 样本数+NTC+对照品), 每个PCR反应体系均为27  $\mu\text{L}$ . 将27  $\mu\text{L}$ /反应分装至0.2 mL PCR反应管中, 将PCR反应管转移至样本处理区. 在各设定的PCR反应管中分别加入3  $\mu\text{L}$ 相应DNA模板, 盖紧管盖, 充分混匀后转移到检测区. 将反应管放入荧光PCR检测仪内, 记录样本摆放顺序. 循环条件设置: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min(保温) $\rightarrow$ 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min(变性) $\rightarrow$  (95  $^{\circ}\text{C}$  15 s $\rightarrow$ 69  $^{\circ}\text{C}$  10 s $\rightarrow$ 62  $^{\circ}\text{C}$  1 min), 40次循环; (3)仪器检测通道选择: 本试剂盒中所提供探针均为*K-ras*突变探针与内参基因探针两种荧光探针的混合物, 每个反应中检测通道设置按说明书进行. 参比荧光选择ROX, 荧光信号采集设为62  $^{\circ}\text{C}$ , 反应体系为30  $\mu\text{L}$ .

### 1.2.2 FQ-PCR检测*k-ras*基因突变状态的结果判断标准:

Ct值 $\leq$ 34.0判断为突变阳性; 34.0<Ct值 $\leq$ 38.0判断为突变可疑; Ct值 $>$ 38.0或为“Undet”判断为突变阴性或者低于试剂盒的检测下限.

### 1.2.3 直接测序法检测*K-ras*突变:

将PCR产物在ABI 3730测序仪(Applied Biosystems)上完成测序, 采用DNASTar(Lasergene)软件进行序列分析.

**统计学处理** 采用SPSS16.0软件进行 $\chi^2$ 检验分析.

## 2 结果

### 2.1 直接测序法检测CRC *k-ras*基因突变

经直接

表1 FQ-PCR与基因测序结果的比较 ( $n$ )

FQ-PCR	基因测序		合计
	阳性	阴性	
阳性	91	2	93
阴性	3	184	187
合计	94	186	280

基因测序, 确认在280例CRC中, *k-ras*基因测序阳性(基因突变型)94例, 阳性率33.57%(94/280), 其中第12编码子的35G $>$ A、35G $>$ T、35G $>$ C、34G $>$ A、34G $>$ T及34G $>$ C的突变率分别为14.64%(41/280)、4.29%(12/280)、0.36%(1/280)、2.86%(8/280)、3.57%(10/280)、0.36%(1/280), 第13编码子的38G $>$ A的突变率为7.5%(21/280)(图1).

### 2.2 FQ-PCR法检测CRC *k-ras*基因突变

在280例CRC中, FQ-PCR阳性93例(基因突变型), 阳性率33.21%(93/280); 其中第12编码子的35G $>$ A、35G $>$ T、35G $>$ C、34G $>$ A、34G $>$ T及34G $>$ C的突变率分别为13.93%(39/280)、4.29%(12/280)、0.36%(1/280)、2.86%(8/280)、3.93%(11/280)、0.36%(1/280), 第13编码子的38G $>$ A的突变率为7.5%(21/280)(图2).

### 2.3 FQ-PCR法与基因测序法结果比较

基因测序阳性(突变型)94例, 其中FQ-PCR阳性91例[灵敏度96.8%(91/94)], 阴性3例; 基因测序阴性(野生型)186例, 其中FQ-PCR阴性184例[特异性98.9%(184/186)], 阳性2例; FQ-PCR法与基因测序法符合率为(91+184)/280 = 98.2%(表1). 在两种检测方法中, 各突变位点的阳性一致率和阴性一致率符合性均在90%以上, 其中四个位点的符合率达到100%(表2), 两种方法的检测结果高度一致.

### 2.4 *k-ras*基因检测与CRC患者临床病理参数之间的关系

在280例CRC中, *k-ras*基因测序阳性(基因突变型)94例, 阳性率33.57%; *k-ras*基因突变率在 $\geq$ 60岁的人群中较高(42.4% vs 25.7%,  $P<0.05$ ), 而且女性高于男性(41.8% vs 28.2%,  $P<0.05$ ). 而与肿瘤部位、分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移及远处转移无相关性(均 $P>0.05$ ).

## 3 讨论

*k-ras*基因定位于人类染色体12p12.1, 编码一种具有GTP酶活性的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 定位于细胞膜内侧, 是EGFR功能信号的下游分子, 在膜

## ■ 相关报道

Yunxia等研究认为*k-ras*基因突变与肿瘤的分化程度有一定的相关性, 而与患者的总生存期无关, 不是患者预后的指标.

■创新盘点

本文采用FQ-PCR和直接测序法联合检测*k-ras*基因突变, 综合分析了中国结直肠癌患者中*k-ras*基因突变状态.

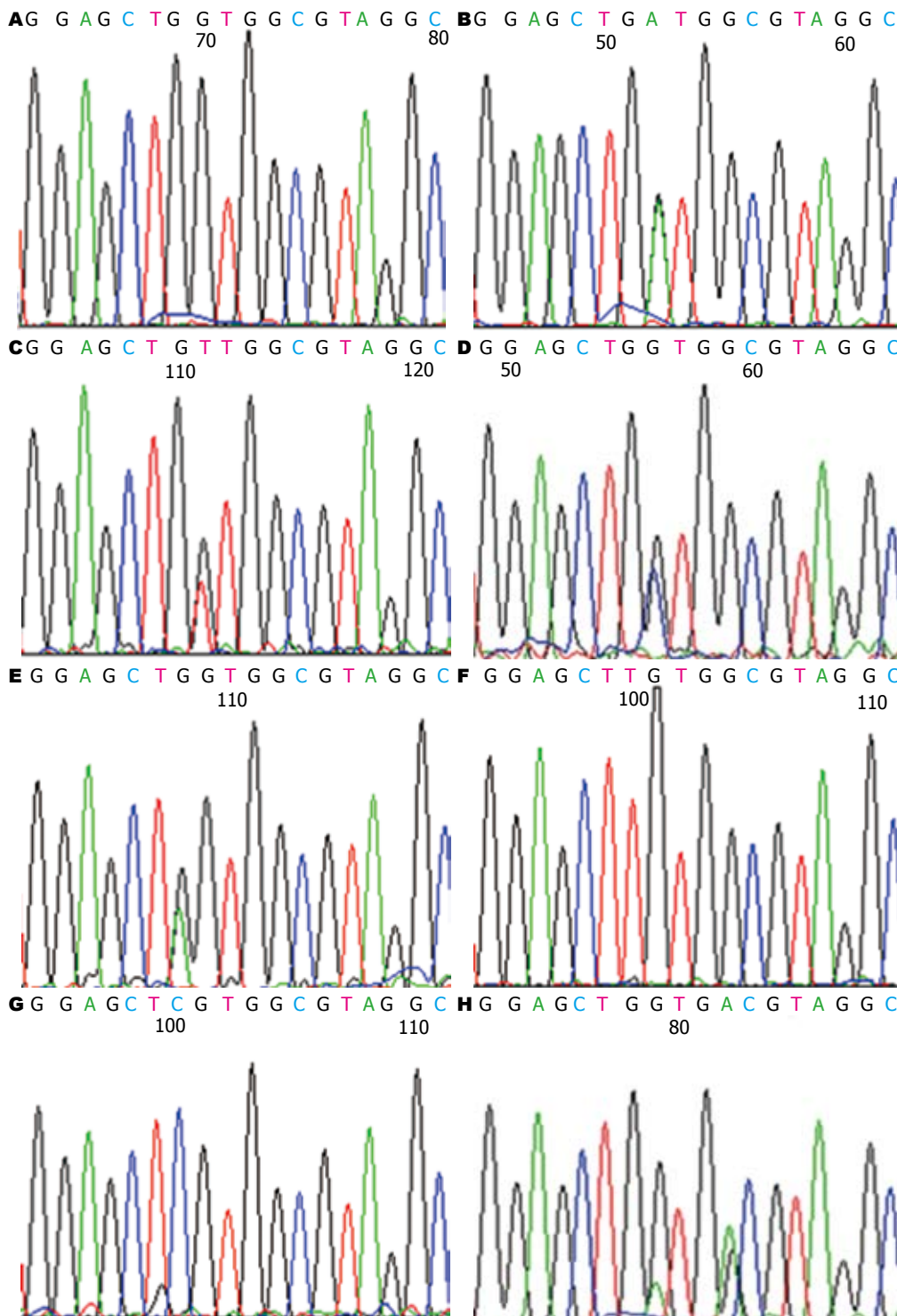


图 1 直接测序法检测*k-ras*基因突变. A: 第12, 13密码子分别为GGT GGC, 未突变(*k-ras*基因野生型); B: 第12密码子突变(35G>A); C: 第12密码子突变(35G>T); D: 第12密码子突变(35G>C); E: 第12密码子突变(34G>A); F: 第12密码子突变(34G>T); G: 第12密码子突变(34G>C); H: 第13密码子突变(38G>A).

受体到腺苷环化酶信号传导中起重要作用<sup>[15-20]</sup>, 相关研究证实, *k-ras*基因状态与EGFR酪氨酸激酶抑制剂和抗EGFR单抗治疗CRC的疗效密切相关. CRYSTAL研究<sup>[21]</sup>显示, 在K-ras野生型患者中, C225+FOLFIRI联合组有效率显著优于FOLFIRI治疗组(59.3% vs 43.2%,  $P = 0.0025$ ), 而

野生型患者中联合化疗组较单用FOLFIRI治疗组未见明显获益; Christos研究发现<sup>[1]</sup>, K-ras野生型患者一线西妥昔单抗联合化疗较单纯化疗能获得显著延长患者的生存期, 而K-ras突变型患者未见疗效获益. 在帕尼单抗运用于CRC三线治疗的III期随机对照试验研究中<sup>[2]</sup>, K-ras野生型

表 2 FQ-PCR与基因测序各突变位点结果统计

FQ-PCR	基因测序检测		合计	一致率(%)
	34G>A阳性	34G>A阴性		
34G>A阳性	8	0	8	100.0
34G>A阴性	0	272	272	100.0
合计	8	272	280	100.0
	34G>C阳性	34G>C阴性		
34G>C阳性	1	0	1	100.0
34G>C阴性	0	279	279	100.0
合计	1	279	280	100.0
	34G>T阳性	34G>T阴性		
34G>T阳性	10	1	11	100.0
34G>T阴性	0	269	269	99.6
合计	10	270	280	99.6
	35G>A阳性	35G>A阴性		
35G>A阳性	39	0	39	95.1
35G>A阴性	2	239	241	100.0
合计	41	239	280	99.3
	35G>C阳性	35G>C阴性		
35G>C阳性	1	0	1	100.0
35G>C阴性	0	279	279	100.0
合计	1	279	280	100.0
	35G>T阳性	35G>T阴性		
35G>T阳性	11	1	12	91.7
35G>T阴性	1	267	268	99.6
合计	12	268	280	99.3
	38G>A阳性	38G>A阴性		
38G>A阳性	21	0	21	100.0
38G>A阴性	0	259	259	100.0
合计	21	259	280	100.0

## ■应用要点

*k-ras*基因突变状态检测可为临床选取在应用针对EGFR的结直肠癌靶向治疗中治疗结直肠癌患者提供参考依据。

患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)风险比突变型者低,且中位PFS和有效率明显较突变型患者高。以上临床试验证实,在CRC治疗过程中,K-ras野生型患者靶向治疗的获益显著优于突变型患者,*k-ras*基因突变状态是靶向治疗疗效的独立预测指标<sup>[22,23]</sup>。

目前,检测CRC中*k-ras*基因突变状态的方法主要有:限制性片段长度多态性分析、DNA单链构象多态性分析、直接基因测序法等。限制性片段长度多态性分析和DNA单链构象多态性分析具有简便、价廉、设备条件要求低,以及一次处理样品数量多等优点,但以上两种方法检出率均较低、对被检片段要求苛刻,故应用范围受到局限。直接基因测序技术是目前临床上*k-ras*基因突变检测的常用方法,因该技术检测结果虽具有客观性和特异性好的优点,从而使直接测序法成为基因突变检测的金标准。

本研究中,经直接基因测序,确认在280

例CRC中,*k-ras*基因测序阳性(基因突变型)94例,阳性率33.57%(94/280),其中第12编码子的35G>A、35G>T、35G>C、34G>A、34G>T及34G>C的突变率分别为14.64%(41/280)、4.29%(12/280)、0.36%(1/280)、2.86%(8/280)、3.57%(10/280)、0.36%(1/280),第13编码子的38G>A的突变率为7.5%(21/280),其中突变率最高的位点为35G>A,这与相关报道基本一致<sup>[2,24-30]</sup>。表明中国CRC患者中亦存在较大比例的*k-ras*基因突变,发生*k-ras*基因突变的患者将不能从针对EGFR的靶向治疗中获益,因此中国CRC患者在应用靶向药物治疗之前亦应常规检测*k-ras*基因突变,从而为靶向治疗提供可靠的参考依据。

虽然直接测序法能够准确、客观、特异地检测出*k-ras*基因突变状态,但其对技术要求高、操作过程复杂、易造成污染以及结果判读耗时费力等缺点也非常明显,并且各级医院中往往无测序设备,需将标本送往相应的公司进

■同行评价

本文设计合理, 研究手段较先进, 对于结直肠癌的分子靶向治疗有重要的指导意义.

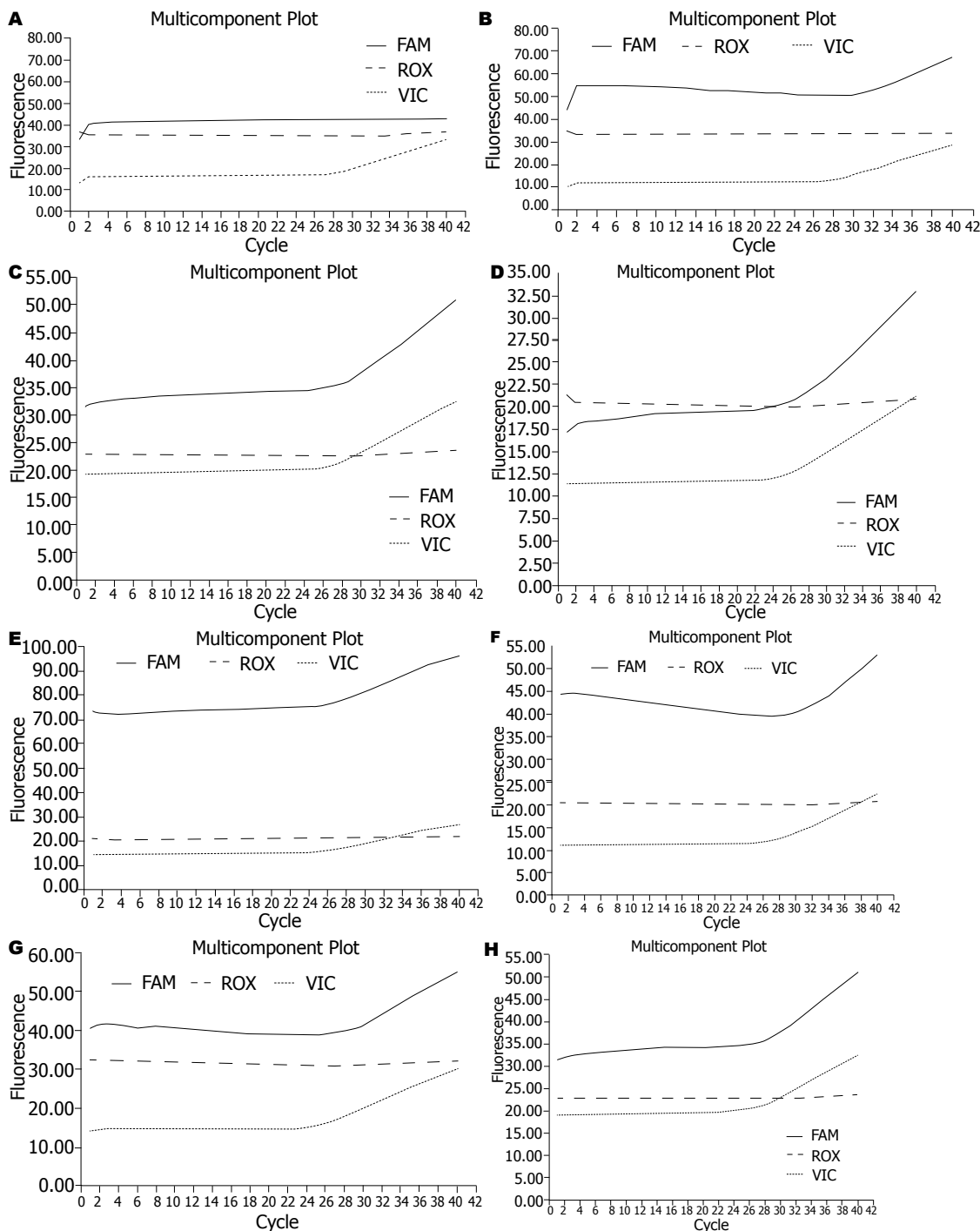


图 2 FQ-PCR法检测*k-ras*基因突变. A: 第12, 13密码子未突变(*k-ras*基因野生型); B: 第12密码子突变(35G>A); C: 第12密码子突变(35G>T); D: 第12密码子突变(35G>C); E: 第12密码子突变(34G>A); F: 第12密码子突变(34G>T); G: 第12密码子突变(34G>C); H: 第13密码子突变(38G>A). FAM: 被测标本曲线; ROX: 背景校正曲线; VIC: 内参对照曲线.

行检测, 导致其既耗费时间长而且成本较高, 故有很大局限性, 因此, 寻求准确、快速、简便的检测CRC中*k-ras*基因的突变状态的方法, 以供临床应用西妥昔单抗等靶向药物是临床的迫切需求.

FQ-PCR技术能够从基因水平进行检测, 其操作简单、检测周期短、灵敏性高、特异性强、重复性好, 显示出很多临床应用的优点. 本

研究中, 在基因测序阳性(突变型)的94例患者中, FQ-PCR阳性91例, 灵敏度96.8%(91/94), 阴性3例; 在基因测序阴性(野生型)的186例患者中, FQ-PCR阴性184例, 特异性98.9%(184/186), 阳性2例. 在两种检测方法中, 各突变位点的阳性一致率和阴性一致率符合性均在90%以上, 其中4个位点的符合率达到100%, 两种方法的检测结果高度一致, 总符合率达98.2%. 这表明FQ-PCR

能够准确、快速、简便的检测CRC中*k-ras*基因的突变状态, 可以作为临床CRC中*k-ras*基因的突变状态的方法, 从而为临床靶向治疗提供参考依据。

在280例CRC标本中, 有5例实时荧光定量PCR检测结果与基因测序检测结果不相符, 包括两种情形: 一种为测序检测结果为野生型, FQ-PCR检测结果为突变型, 这可能是由于石蜡包埋样本制备过程中核酸DNA损伤严重, 断裂为短小的核酸片断或者是由于样本保存不当, 核酸DNA降解为短小片断, 这两种情况均可导致可扩增的核酸片断减少, 降低了测序的灵敏性, 由此可产生阴性测序结果, 导致与本试剂盒检测结果的不一致性; 其次为测序检测结果为突变型, 而FQ-PCR检测结果为野生型, 这可由于石蜡包埋样本制备过程中, 核酸碱基受到固定剂的影响发生转换或颠换, 导致产生新的突变位点或者核酸DNA提取质量不高, 存在影响检测探针杂交的因素, 这两种情况都可导致荧光探针杂交不稳定, 从而使引物延伸过程中探针被替换而非被剪切, 最终无荧光信号发出导致假阴性的产生。

在280例CRC中, *k-ras*基因测序阳性(基因突变型)94例, 阳性率33.57%(94/280); *k-ras*基因突变与患者性别、年龄相关(均 $P < 0.05$ ), 在 $\geq 60$ 岁的女性人群中*k-ras*基因具有更高的突变率, 而与肿瘤部位、分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移及远处转移无相关性(均 $P > 0.05$ )。Yuan等<sup>[31]</sup>应用限制性片段长度多态性方法对153例CRC标本*k-ras*基因外显子2中第12、13编码子的突变情况, *k-ras*基因突变率为37.9%(58/153), 其中35G>A的突变率最高, 为16.33%(25/153), *k-ras*基因突变与性别、分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移及远处转移无相关性, 而与年龄和肿瘤部位相关, 且在年轻人和直肠癌中突变率较高。Yunxia等<sup>[32]</sup>研究认为*k-ras*基因突变与肿瘤的分化程度有一定的相关性, 而与患者的总生存期无关, 不是患者预后的指标; 而在Chang等<sup>[33]</sup>的研究中发现, *k-ras*基因突变率为36%(83/228), 且*k-ras*基因突变与肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移相关, 且与患者的预后密切相关, 是患者预后的参考指标。Poehlmann等<sup>[34]</sup>研究中, *k-ras*基因突变率为27.7%(18/65), 其中35G>A的突变率最高, 为18.5%(12/65), 且在具有*k-ras*基因突变型患者预后较野生型差。关于*k-ras*基因突变与临床病理

参数及预后的关系的报道不一, 这可能与检测方法不同、样本量大小等原因造成的, *k-ras*基因突变与患者的预后的关系仍需多中心的临床随访研究来进一步证实。

#### 4 参考文献

- 1 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765
- 2 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634
- 3 Wierzbicki R, Jonker DJ, Moore MJ, Berry SR, Loehrer PJ, Youssoufian H, Rowinsky EK. A phase II, multicenter study of cetuximab monotherapy in patients with refractory, metastatic colorectal carcinoma with absent epidermal growth factor receptor immunostaining. *Invest New Drugs* 2011; 29: 167-174
- 4 Schimanski CC, Zimmermann T, Schmidtman I, Gockel I, Lang H, Galle PR, Moehler M, Berger MR. K-ras mutation status correlates with the expression of VEGFR1, VEGFR2, and PDGFRalpha in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 181-186
- 5 Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifa J, Hunter DJ, Real FX. CYP1B1 polymorphisms and k-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1417-1421
- 6 Krens LL, Baas JM, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Therapeutic modulation of k-ras signaling in colorectal cancer. *Drug Discov Today* 2010; 15: 502-516
- 7 Codacci-Pisanelli G, Spinelli G, Tomao S. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 835; author reply 835-836
- 8 Gattenlohner S, Germer C, Muller-Hermelink HK. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 835; author reply 835-836
- 9 Meads C, Round J, Tubeuf S, Moore D, Pennant M, Bayliss S. Cetuximab for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Health Technol Assess* 2010; 14 Suppl 1: 1-8
- 10 van Houdt WJ, de Bruijn MT, Emmink BL, Raats D, Hoogwater FJ, Borel Rinkes IH, Kranenburg O. Oncogenic K-ras activates p38 to maintain colorectal cancer cell proliferation during MEK inhibition. *Cell Oncol* 2010; 32: 245-257
- 11 Licar A, Cerkovnik P, Ocvirk J, Novakovic S. KRAS mutations in Slovene patients with colorectal cancer: frequency, distribution and correlation with the response to treatment. *Int J Oncol* 2010; 36: 1137-1144
- 12 Waldner MJ, Neurath MF. The molecular therapy of colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2010; 31: 171-178
- 13 Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJ, Carey FA, Wolf CR. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer* 2010; 102: 693-703
- 14 Turaga K, Shibata D. K-Ras and MSI: potential

- markers of both patient prognosis and treatment efficacy. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 354-355
- 15 Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-1145
- 16 Eng C. K-Ras and sensitivity to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6: 174-175
- 17 Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv Clin Chem* 2010; 51: 71-119
- 18 Bennani B, Gilles S, Fina F, Nanni I, Ibrahim SA, Riffi AA, Nejari C, Benajeh DA, El Abkari M, Martin PM, Ouafik L. Mutation analysis of BRAF exon 15 and KRAS codons 12 and 13 in Moroccan patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2010; 25: 179-184
- 19 Dunn EF, Iida M, Myers RA, Campbell DA, Hintz KA, Armstrong EA, Li C, Wheeler DL. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene* 2011; 30: 561-574
- 20 Winder T, Lenz HJ. Beyond KRAS: a new approach in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2010; 11: 706-707
- 21 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-1417
- 22 Ramos FJ, Tabernero J. K-Ras mutation status as a predictive biomarker in metastatic colorectal cancer. *Biomark Med* 2008; 2: 97-99
- 23 Folprecht G. [Current medicinal treatment of metastasized colorectal carcinoma]. *Chirurg* 2010; 81: 507-515
- 24 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- 25 Cartwright T, Kuefler P, Cohn A, Hyman W, Berger M, Richards D, Vukelja S, Nugent JE, Ruxer RL Jr, Boehm KA, Asmar L. Results of a phase II trial of cetuximab plus capecitabine/irinotecan as first-line therapy for patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2008; 7: 390-397
- 26 Cavallini A, Valentini AM, Lippolis C, Campanella D, Guerra V, Caruso ML. KRAS genotyping as biomarker in colorectal cancer: a comparison of three commercial kits on histologic material. *Anticancer Res* 2010; 30: 5251-5256
- 27 Su N, Xu XY, Chen H, Gao WC, Ruan CP, Wang Q, Sun YP. Increased expression of annexin A1 is correlated with K-ras mutation in colorectal cancer. *Tohoku J Exp Med* 2010; 222: 243-250
- 28 Dempke WC, Heinemann V. Ras mutational status is a biomarker for resistance to EGFR inhibitors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30: 4673-4677
- 29 Onozato W, Yamashita K, Yamashita K, Kuba T, Katoh H, Nakamura T, Sato T, Ihara A, Okayasu I, Watanabe M. Genetic alterations of K-ras may reflect prognosis in stage III colon cancer patients below 60 years of age. *J Surg Oncol* 2011; 103: 25-33
- 30 Tímár J, Hegedüs B, Rásó E. KRAS mutation testing of colorectal cancer for anti-EGFR therapy: dogmas versus evidence. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 813-823
- 31 Yuan Y, Hu HG, Ye XX, Shen H, Zheng S. [K-ras gene mutation in colorectal cancer and its clinicopathologic significance]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2010; 48: 1247-1251
- 32 Yunxia Z, Jun C, Guanshan Z, Yachao L, Xueke Z, Jin L. Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Med Genet* 2010; 11: 34
- 33 Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, Chang JG. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 179
- 34 Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 2007; 203: 489-497

编辑 李军亮 电编 李薇

# 选择性5-HT再摄取抑制剂与胃肠道损害的研究进展

姜宗丹, 张振玉, 钱方

姜宗丹, 张振玉, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006

钱方, 南京医科大学附属南京第一医院药剂科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 本文由姜宗丹综述; 张振玉与钱方审校.

通讯作者: 张振玉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. ahwangzhibing776@163.com  
电话: 025-87726246

收稿日期: 2010-10-31 修回日期: 2011-04-21

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Association between selective serotonin reuptake inhibitors and gastrointestinal damage: advances and prospects

Zong-Dan Jiang, Zhen-Yu Zhang, Fang Qian

Zong-Dan Jiang, Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Fang Qian, Department of Pharmacy Office, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

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

Received: 2010-10-31 Revised: 2011-04-21

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are among the most commonly prescribed drugs in the world and have widely been used in the treatment of depression, because they have similar efficacy to tricyclic antidepressants and demonstrate a favorable safety and tolerability profile. However, with the increase in the number of patients receiving SSRIs, low-frequency adverse effects associated with use of SSRIs have become more prevalent. Since 1990, a number of case reports and epidemiological studies have described the risk of gastrointestinal bleeding in patients after the initiation of SSRI therapy. This article reviews the recent advances and future prospects for understanding the association between SSRIs and upper gastrointestinal bleeding.

Key Words: Selective serotonin reuptake inhibitors;

## Gastrointestinal bleeding; Gastrointestinal damage

Jiang ZD, Zhang ZY, Qian F. Association between selective serotonin reuptake inhibitors and gastrointestinal damage: advances and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1375-1380

## 摘要

选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)是全世界最常见的处方药之一, 目前临床上广泛用于抑郁症治疗, 与三环类抗抑郁药(TCAs)药效相当, 但比TCAs安全且耐受性好. 然而, 随着SSRIs使用人群的增加, 一些病例报道和流行病学研究开始报道SSRIs治疗后出现胃肠道出血并发症. 本文就SSRIs的临床应用与胃肠道出血的相关性及其展望进行探讨与综述.

关键词: 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂; 胃肠道出血; 胃肠道损害

姜宗丹, 张振玉, 钱方. 选择性5-HT再摄取抑制剂与胃肠道损害的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1375-1380

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1375.asp>

## 0 引言

选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)是20世纪80年代末出现的一类新型抗抑郁药<sup>[1]</sup>, 其疗效与传统的抗抑郁药物疗效相当, 不良反应少, 患者依从性高, 有逐渐替代传统抗抑郁药的趋势. 但由于5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的生理功能广泛, SSRIs抑制了5-HT的再摄取, 可能引起患者某些生理功能的紊乱, 如血小板凝集功能异常, 可导致皮肤淤斑、紫癜、鼻衄、血小板计数减少等, 同时也可引起胃肠道出血、脑出血等, 后者常较严重, 甚至威胁生命. 近年来与SSRIs相关的胃肠道损害引起了国内外临床医师的共同关注<sup>[2-5]</sup>. 本文就SSRIs临床应用现状、与胃肠道出血的相关性及其展望作一综述.

## 1 SSRIs抗抑郁作用机制及其临床应用现状

### 1.1 SSRIs抗抑郁的药理学机制 5-HT是中枢神

## ■背景资料

选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)是20世纪80年代末出现的一类新型抗抑郁药, 其疗效与传统的抗抑郁药物疗效相当, 不良反应少, 患者依从性高, 有逐渐替代传统抗抑郁药的趋势. 但由于5-羟色胺(5-HT)的生理功能广泛, SSRIs抑制了5-HT的再摄取, 可能引起患者某些生理功能的紊乱.

## ■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

## ■ 研发前沿

近年来与SSRIs相关的胃肠道损害引起了国内外临床医师的共同关注。

神经系统的重要的神经递质, 在外周组织则是一种重要的调节介质, 5-HT参与许多生物学过程。5-HT受体(5-HT receptor, 5-HTR)有4种主要类型及许多亚型, 主要分布于胃肠黏膜上皮、腺上皮、黏膜下神经组织、肌间神经和平滑肌。不同亚型的受体分布不同, 功能也有差异<sup>[6,7]</sup>。5-HTR3和5-HTR4主要分布于胃肠道和神经系统, 对消化系统功能如胃肠运动、胃酸和黏液分泌、局部黏膜血流等有重要的调节作用。生理状态下, 5-HT从储存部位的神经元、肠黏膜的大颗粒细胞、血小板中释放出来, 与相应受体结合后发挥作用, 未结合的5-HT通过再摄取回到储存部位。抑郁症的发生与单胺[包括5-HT、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和多巴胺(dopamine, DA)]能投射不足有关。当投射额叶皮质的单胺不足时, 可引起抑郁心境和注意迟缓; 当投射边缘区的单胺不足时, 可引起内疚、死亡和自杀想法; 当投射纹状体的单胺不足时, 可引起精神运动性阻滞和激越; 当投射下丘脑的单胺不足时, 可引起植物神经症状(食欲或体质量改变)、愉快感减退及睡眠异常<sup>[8]</sup>。5-HT的再摄取主要通过存在于神经元和血小板上的转运蛋白实现, SSRIs作用于此蛋白阻断5-HT再摄取过程, 使5-HT在突触间隙的浓度升高, 延长并加强5-HTR对5-HT的结合, 从而起到抗焦虑和抗抑郁的作用<sup>[9]</sup>。

1.2 SSRIs抗抑郁治疗的临床应用 抑郁症是一种大脑生化改变所致的疾病, 属精神疾病的范畴。2000年WHO公布, 各种抑郁症的年患病者占全球人口的3%-5%<sup>[10]</sup>。据西方国家统计, 平均每20人就有1人曾患抑郁症, 而目前全球的抑郁症患者已有8 500万人。预计到2005年, 抑郁症发病率将达到总人口的10%<sup>[11]</sup>。抗抑郁药物根据其其对5-HT重摄取机制的抑制作用不同分为3大类, 即SSRIs、非SSRIs和其他抗抑郁剂。SSRIs选择性抑制5-HT转运; 而非SSRIs则是对5-HT与NE重摄取机制均有平衡作用的抗抑郁剂; 其他抗抑郁剂主要包括对NE有选择性抑制作用或对任何摄取机制无作用的抗抑郁剂。SSRIs作为20世纪后期新崛起的新型抗抑郁药物, 其疗效与传统三环类(tricyclic antidepressants, TCAs)抗抑郁药及单胺氧化酶抑制剂类(monoamine oxidase inhibitors, MOAIs)抗抑郁药相当, 而不良反应较轻, 正逐步取代TCAs和MOAIs成为抗抑郁治疗的一线药。SSRIs适用于治疗各种年龄、合并各种疾病的抑郁症以及焦虑症、强迫症、非典型抑郁症、惊

恐症等疾病<sup>[12]</sup>。

SSRIs使用剂量和方法应根据患者状况及病情调整, 做到因人而异, 剂量个体化, 且诊断不同剂量也有差异<sup>[13,14]</sup>。如以氟西汀为例: 治疗抑郁症时, 常用剂量20-40 mg/d, 清晨1次服用, 需要时可用到80 mg/d。因药物在肝脏内代谢, 肝功能不好时可采取隔日疗法或限制在服药范围的低限20 mg/d。在治疗社交恐怖症、焦虑症时, 一般剂量为20 mg/d。服用2-3 wk后, 根据患者反应每周以10 mg量递增, 每日最大量可达50 mg。在治疗强迫性神经症时, 一般剂量为40 mg/d。每周以10 mg量递增, 每日最大量可达60 mg。治疗神经性贪食症时, 剂量为60 mg/d, 可有效控制摄食量。对老年患者剂量更宜酌减, 最大剂量不宜超过40 mg/d, 如果增加剂量, 也应限制在服药范围的低限。维持治疗应有足够长时间, 以巩固疗效。停药时也应逐渐减量, 不宜骤停。总之, 治疗期间应根据患者年龄、身体状况和诊断, 调整剂量, 不能一概而论<sup>[15]</sup>。

## 2 SSRIs抗抑郁治疗与胃肠道出血的相关性及其机制

2.1 SSRIs抗抑郁治疗与胃肠道出血的相关性 随着SSRIs广泛引入临床抑郁症的治疗, 有学者发现SSRIs与某些出血性疾病之间存在联系<sup>[16-24]</sup>。多数情况下SSRIs引起的多为轻度出血, 如淤斑、紫癜、鼻衄、血小板计数的减少、出血时间的延长。但有时也引起一些少见的严重病例, 如胃肠道出血、泌尿道出血、颅内出血等。

de Abajo等<sup>[17]</sup>根据英国全科医学研究数据库中的医学资料, 对1993-04/1997-09年龄40-79岁的1 651例上消化道出血患者和248例消化性溃疡穿孔患者进行了病例对照研究。对照组包括10 000例年龄、性别、就诊年度相匹配的其他未服用5-HT再摄取抑制剂的患者。结果发现: 目前暴露于选择性5-HT再摄取抑制剂患者, 上消化道出血率为3.1%(52/1 651), 对照组只有1.0%(95/10 000)(RR = 3.0, 95%CI: 2.1-4.4); 该指标未按性别、年龄、药物剂量或治疗周期进行校正, 估计初发病率为1例/8 000张处方。非选择性5-HT再摄取抑制剂组与上消化道出血之间有较弱相关性(RR = 1.4, 95%CI: 1.1-1.9); 缺乏这种抑制作用的抗抑郁药则没有此联系。几类抗抑郁药与溃疡穿孔均无联系。同时使用SSRIs和非甾体抗炎药(Non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID), 发现明显增加上消化道出血危



险性, 并超过了他们各自作用之和( $RR = 15.6$ ,  $95\%CI: 6.6-36.6$ ). 在SSRIs和小剂量阿司匹林之间, 观察到一个比较弱的交互作用( $RR = 7.2$ ,  $95\%CI: 3.1-17.1$ ).

丹麦癌症研究学会的一项研究也证实了上述结论<sup>[22]</sup>. 研究者利用丹麦北日德兰半岛药物流行病学处方数据库, 调查了从1991-01/1995-12丹麦国内26 005例抗抑郁药使用者. 26 005例抗抑郁使用者中女性占2/3, 对这些患者于使用抗抑郁剂期间累积随访28 751人, 停用抗抑郁剂后再随访29 823人. 在SSRIs应用期间, 因上消化道出血者55次, 而预期数为15.3次, 因而观察数与预期数比率(O/E)为3.6. 在非SSRIs应用者中O/E仅为2.3. 在其他抗抑郁剂使用期间的患者, 其上消化道出血危险性无明显增加. SSRIs、非SSRIs和其他抗抑郁剂应用者的暴露人群发病率及非暴露人群发病率的差异(RD)分别为3.1/1 000治疗年、1.8/1 000治疗年及0.9/1 000治疗年. 全县149 573例曾单用NSAID时, 因上消化道出血住院206次( $RR = 4.5$ ,  $95\%CI: 3.9-5.2$ ). 26 762例单用小剂量阿司匹林时, 上消化道出血住院204次( $RR = 2.5$ ,  $95\%CI: 2.2-2.9$ ). SSRIs与NSAID联合应用时, 上消化道出血的O/E增至12.2( $95\%CI: 7.1-19.5$ ). SSRIs与小剂量阿司匹林同时应用, O/E增至5.2( $95\%CI: 3.2-8.0$ ). 非SSRIs与NSAID或小剂量阿司匹林联合应用, 上消化道出血的O/E分别为8.2( $95\%CI: 3.7-15.5$ )和4.6( $95\%CI: 1.8-9.4$ ). 所有种类SSRIs均可增加上消化道出血危险性; 非SSRIs亦可增加上消化道危险性, 但较SSRIs降低; 而其他抗抑郁剂应用者中, 除米安色林外均不会增加上消化道出血危险性.

van Walraven等<sup>[24]</sup>利用加拿大安大略省的以人口为基础的行政数据库, 研究了年龄超过65岁的317 824名抗抑郁药使用者, 在1992-07/1998-03随访时观察到974例因上消化道出血入院者. 此队列研究根据SSRIs与转运蛋白结合时的解离常数将SSRIs分类为低、中、高亲和组<sup>[19]</sup>. 结果发现: 随着SSRIs对5-HT再摄取抑制能力的增加, 上消化道出血的校正RR值也显著性的升高10%( $95\%CI: 1.01-1.19$ ), 服用SSRIs者上消化道出血的危险性为每年7.3%; 研究还发现80岁以上老年患者和有上消化道疾病史的人群最易受到伤害.

Layton等<sup>[25]</sup>利用药物安全研究学会1986-11/1998-10的处方药控制数据, 观察3组人

群(SSRIs组、其他精神药物组、不使用精神药物组)在用药1 mo和2-6 mo的胃肠道出血率, 结果发现: 总共有1 229例患者在最初6 mo内发生了出血事件(包括胃肠道出血). 在对年龄、性别进行校正后发现: SSRIs组的出血危险性高于不使用精神药物组( $RR = 1.23$ ,  $95\%CI: 0.91-1.66$ ), 而与其他精神药物组的差异不显著( $RR = 1.14$ ,  $95\%CI: 0.77-1.72$ ). 在此研究中, 学者只是提供了抗抑郁药与总的出血事件的关系, 并没有将出血事件限定为上消化道出血; Layton并没有研究SSRIs与其他药物联用时对出血风险的评估, 此项研究的最大的缺点是所有参加者的应答率仅仅只有51%.

Meijer等<sup>[26]</sup>也进行了一项类似的病例对照研究. 在荷兰对从1992-2000年64 000例新开始使用抗抑郁药者进行观察. 观察到共有196例因出血而入院接受治疗, 其中有31名是上消化道出血患者. 结果显示: 与抑制5-HT再摄取能力低的SSRIs相比, 使用中等强度、高强度抑制5-HT再摄取的SSRIs和出血的风险分别为 $RR = 1.9$ ( $95\%CI: 1.1-3.5$ )、 $2.6$ ( $95\%CI: 1.4-4.8$ ). 根据上消化道出血分层分析得到的结果与之相似: 与抑制5-HT再摄取能力低的SSRIs相比, 使用中等强度、高强度抑制5-HT再摄取的SSRIs和上消化道出血的风险分别为 $RR = 1.7$ ( $95\%CI: 0.4-6.6$ )、 $2.1$ ( $95\%CI: 0.6-8.3$ ), 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

上述5项临床研究的样本量都非常大, 而结论基本一致: 均认为服用SSRIs可能增加胃肠道出血的危险性. 但是, 这些研究都属于回顾性病例-对照研究, 影响因素比较多, 如各种混杂因素之间缺乏均衡性等. 同时, 抑郁症患者经常伴有月经紊乱、关节痛、背部疼痛等, 这些情况可以促使患者自行服用止痛药(如NSAID), 因此, 难以排除这些患者服用其他药物所造成的偏差<sup>[27-31]</sup>. SSRIs可能增加总的出血风险, 但是否增加上消化道出血风险还有争议. 要准确回答这个问题需要更多大样本、多中心、双盲对照研究的结论支持.

2.2 SSRIs应用与胃肠道损害相关的可能机制 血小板释放5-HT、对调节血管损伤时的凝血反应有重要作用<sup>[32,33]</sup>. 血小板本身不能合成5-HT, 而是由其表面的5-HT转运蛋白从血循环中摄取, 并储存在血小板内, 这一过程与在人脑中的类似<sup>[34]</sup>. 当与胶原、抗原-抗体复合物相遇时, 血小板释放出5-HT, 释放的5-HT可促进血管收

#### ■创新盘点

本文就选择性5-HT再摄取抑制剂(SSRIs)与胃肠道损害特别是胃肠道出血的相关性及其机制进行了较全面系统的总结, 同时对新型SSRIs与胃肠道出血的相关性也进行了概述.

### ■同行评价

本文就选择性5-HT再摄取抑制剂与胃肠道损害特别是消化道出血的相关性及其机制进行了较全面系统的总结,对临床工作有较好的指导和警示作用。

缩和血小板聚集<sup>[33]</sup>。大量存在于血小板表面的5-HTR2A能够结合血循环中90%以上的5-HT,血小板活化过程中释放的5-HT与5-HTR结合后,可以扩大血小板的聚集反应。SSRIs抑制了5-HT转运蛋白介导的再摄取5-HT功能,从而使得血小板内储存的5-HT减少,导致血管损伤时血小板的聚集发生障碍,激活纤维蛋白溶解系统,损伤凝血反应<sup>[35,36]</sup>。以下5方面支持这种观点:(1)抑郁患者使用SSRIs治疗2 wk后,血小板中的5-HT减少90%;(2)SSRIs和非选择性5-HT抑制剂都可能增加上消化道的出血的危险性,以SSRIs的危险性尤甚;(3)对5-HT再摄取抑制作用最弱的药物度硫平引起胃肠道出血的危险性也最低;(4)刺激5-HTR2可以介导5-HT引起的血小板聚集,曲唑酮为5-HTR2强有力的阻断剂,其引起胃肠道出血的危险性也最大;(5)NSAID(抑制血小板的聚集)与SSRIs联合使用可以增加胃肠道出血的危险性。

血小板5-HT摄取减少导致外周5-HT的增多。外周5-HT的增多可以损伤血管内皮细胞,引起血管内皮细胞收缩,使血管通透性增加。正常状态时内皮细胞的单胺氧化酶能够降解5-HT,如果在强大的动因作用下血小板遭受大量破坏,短时间内释放出大量5-HT进入血浆,会超过血管内皮单胺氧化酶代谢能力,这时就会引起血管内膜损伤,内膜损伤后单胺氧化酶降解5-HT减少,血管壁前列腺素合成减少,导致血管收缩,血浆5-HT水平进一步升高,从而形成恶性循环。5-HT对内膜损伤后血管的收缩作用显著增强,还可以增强去甲肾上腺素、血管紧张素II、组胺、前列腺素F<sub>2C</sub>等物质的缩血管效应,使全身的小动脉痉挛加重,导致重要脏器缺血、缺氧,出现不同程度的损害,包括胃肠道出血<sup>[37]</sup>。

其他机制可能包括减少血小板因子-4和 $\beta$ -血小板球蛋白,阻断血小板反应的正常化<sup>[38]</sup>、阻断细胞内Ca<sup>2+</sup>的移动;减少血小板特定的黏着位点,减少血小板活化标志物的表达<sup>[39]</sup>。在体外,SSRIs亦可抑制血小板血栓形成,这可以解释其抗凝作用<sup>[40]</sup>。

SSRIs在联合抗凝药时可增加显著出血的危险性。SSRIs可抑制一种或几种CYP450酶,尽管不同的SSRIs对CYP450酶的抑制作用显著不同,但SSRIs的这种作用均可影响抗凝药物的代谢,使抗凝药的血浆浓度明显增高,增加出血的机会。

然而,SSRIs被发现也可以通过活化血小板中的5-HTR2引起血小板的黏附和血栓的形成<sup>[41]</sup>。有研究称SSRIs可能对血小板有双重功能:使用SSRIs对血小板的早期的作用可能增加血栓形成的趋势;然而晚期作用,在重复使用的影响下,有增加出血的趋势<sup>[42]</sup>。

### 3 新型SSRIs与胃肠道出血的相关性及展望

有资料显示,根据文献报道所有第1代SSRIs均与异常出血有关;而第2代SSRIs(如依他普仑)则较第1代SSRIs更加安全<sup>[43]</sup>,尽管基于有限的信息,FDA仍然建议应该给予患者警示,特别是与NSAID、阿司匹林、其他抗凝药物联合使用时。第2代SSRIs作用途径发生变化,并且他们自身结构也不一样,所以现在还不清楚是否应该把他们归类为SSRIs。例如:5-HT、去甲肾上腺素抑制剂文拉法辛<sup>[44]</sup>抑制神经元摄取5-HT和NE,对其他的受体作用微弱,不良反应的发生与TCA类不同,但是和SSRIs更加相似。从药理学来看,文拉法辛抑制5-HT、NE的摄取导致的出血与SSRIs抑制5-HT的摄取而导致的出血相似,故又可以将其视为SSRIs。另一新型抗抑郁药茶法唑酮,结构上和SSRIs、TCAs、MAOIs均不同,他可以抑制中枢摄取5-HT、NE,阻断5-HTR2,还可以微弱的阻断肾上腺素的活化<sup>[45]</sup>。米氮平是一种四环类抗抑郁药,增强了中枢NE和5-HT的活化<sup>[46]</sup>。丁氨苯丙酮属于氨基酮类,在化学结构上与任何已知的抗抑郁药都没有联系,能够微弱的抑制中枢摄取5-HT、NE和DA<sup>[47]</sup>。尽管这些新型抗抑郁药对5-HT的摄取弱于SSRIs或者是对5-HT没有抑制作用,但是他们是否可以减少出血或者是和SSRIs有着同样的出血风险还未知<sup>[48,49]</sup>。最理想的抗抑郁药是同时能够作用于NA、5-HT和DA多个特定作用位点,抑制他们的再摄取而发挥抗抑郁作用,但又不作用于引起不良反应的作用位点<sup>[50]</sup>。由于使用抗抑郁药人数的不断增加,需要进行大量的前瞻性临床试验和流行病学研究来关注胃肠道出血这一事件。

### 4 结论

根据文献[51,52]的数据,提示使用SSRIs类药物可以增加上消化道出血的发生率。患者上消化道出血的风险在特定的危险因素下将会增高,这些危险因素包括有溃疡病史或者胃肠道出血史、老年人和患者有合并症的(如肿瘤、酒精

中毒、出血体质)和/或联合用药(如NSAID、阿司匹林、皮质类固醇、抗凝剂)。对医生来说,根据患者的个体情况处方不同剂量的抗抑郁药物以减少上消化道不良事件的发生非常重要。对于那些处于高风险出血危险的患者,应尽可能地减少NSAID和阿司匹林的联合使用<sup>[53]</sup>。随着SSRIs与消化系并发症相关性发生机制研究的深入,SSRIs治疗的消化系风险将会得到进一步控制。

## 5 参考文献

- 1 Reseland S, Bray I, Gunnell D. Relationship between antidepressant sales and secular trends in suicide rates in the Nordic countries. *Br J Psychiatry* 2006; 188: 354-358
- 2 Dalton SO, Sørensen HT, Johansen C. SSRIs and upper gastrointestinal bleeding: what is known and how should it influence prescribing? *CNS Drugs* 2006; 20: 143-151
- 3 Halperin D, Reber G. Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; 9: 47-59
- 4 de Abajo FJ, Montero D, Rodríguez LA, Madurga M. Antidepressants and risk of upper gastrointestinal bleeding. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 304-310
- 5 Helin-Salmivaara A, Huttunen T, Grönroos JM, Klaukka T, Huupponen R. Risk of serious upper gastrointestinal events with concurrent use of NSAIDs and SSRIs: a case-control study in the general population. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 403-408
- 6 Nemeroff CB, Owens MJ. Pharmacologic differences among the SSRIs: focus on monoamine transporters and the HPA axis. *CNS Spectr* 2004; 9: 23-31
- 7 Rothrock JF. Triptans, SSRIs/SNRIs and serotonin syndrome. *Headache* 2010; 50: 1101-1102
- 8 Katzman MA. Current considerations in the treatment of generalized anxiety disorder. *CNS Drugs* 2009; 23: 103-120
- 9 Hosenbocus S, Chahal R. SSRIs and SNRIs: A review of the Discontinuation Syndrome in Children and Adolescents. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2011; 20: 60-67
- 10 傅敏, 吴敏生, 翁晖亮. 抗抑郁药治疗功能性胃肠病的临床研究. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 21
- 11 瞿发林, 丁青龙. 我院1998年-2001年抗抑郁药物的应用分析. *中国药房* 2002; 13: 220-221
- 12 周再丽, 贾平. 抗抑郁药物及其临床应用. *中国医刊* 2004; 39: 47-51
- 13 Gourion D. [Antidepressants and their onset of action: a major clinical, methodological and pronostical issue]. *Encephale* 2008; 34: 73-81
- 14 Deshauer D, Moher D, Fergusson D, Moher E, Sampson M, Grimshaw J. Selective serotonin reuptake inhibitors for unipolar depression: a systematic review of classic long-term randomized controlled trials. *CMAJ* 2008; 178: 1293-1301
- 15 刘贝妮, 于皆平, 于红刚. 胃镜检查出老年消化性溃疡124例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 411-413
- 16 de Abajo FJ, García Rodríguez A, Montero D. Antidepressant drugs: a potential new drug cause of upper gastrointestinal bleeding. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 455-457
- 17 de Abajo FJ, Rodríguez LA, Montero D. Association between selective serotonin reuptake inhibitors and upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. *BMJ* 1999; 319: 1106-1109
- 18 Skop BP, Brown TM. Potential vascular and bleeding complications of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *Psychosomatics* 1996; 37: 12-16
- 19 Lake MB, Birmaher B, Wassick S, Mathos K, Yelovich AK. Bleeding and selective serotonin reuptake inhibitors in childhood and adolescence. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2000; 10: 35-38
- 20 Nelva A, Guy C, Tardy-Poncet B, Beyens MN, Ratrema M, Benedetti C, Ollagnier M. [Hemorrhagic syndromes related to selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants. Seven case reports and review of the literature]. *Rev Med Interne* 2000; 21: 152-160
- 21 Weinrieb RM, Auriacombe M, Lynch KG, Lewis JD. Selective serotonin re-uptake inhibitors and the risk of bleeding. *Expert Opin Drug Saf* 2005; 4: 337-344
- 22 Dalton SO, Johansen C, Mellekjær L, Nørgård B, Sørensen HT, Olsen JH. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of upper gastrointestinal tract bleeding: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 59-64
- 23 Higham J, Kang JY, Majeed A. Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. *Gut* 2002; 50: 460-464
- 24 van Walraven C, Mamdani MM, Wells PS, Williams JI. Inhibition of serotonin reuptake by antidepressants and upper gastrointestinal bleeding in elderly patients: retrospective cohort study. *BMJ* 2001; 323: 655-658
- 25 Layton D, Clark DW, Pearce GL, Shakir SA. Is there an association between selective serotonin reuptake inhibitors and risk of abnormal bleeding? Results from a cohort study based on prescription event monitoring in England. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 167-176
- 26 Meijer WE, Heerdink ER, Nolen WA, Herings RM, Leufkens HG, Egberts AC. Association of risk of abnormal bleeding with degree of serotonin reuptake inhibition by antidepressants. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2367-2370
- 27 Dickinson T, Malhi S, Painter S, Pyott J, Sawhney A. Association between SSRIs and upper gastrointestinal bleeding. Self treatment with non-steroidal drugs may be confounding factor. *BMJ* 2000; 320: 1406
- 28 Dunn NR, Pearce GL, Shakir SA. Association between SSRIs and upper gastrointestinal bleeding. SSRIs are no more likely than other drugs to cause such bleeding. *BMJ* 2000; 320: 1405-1406
- 29 Williams D, Kelly A, Feely J. Association between SSRIs and upper gastrointestinal bleeding. Coprescription of antiulcer drugs with SSRIs is fairly common. *BMJ* 2000; 320: 1405; author reply 1406
- 30 Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* 1997; 340: 249-258
- 31 Po AL. Antidepressants and upper gastrointestinal bleeding. *BMJ* 1999; 319: 1081-1082
- 32 Westphal RS, Sanders-Bush E. Differences in agonist-independent and -dependent 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor-mediated cell division. *Mol*

- Pharmacol* 1996; 49: 474-480
- 33 Li N, Wallén NH, Ladjevardi M, Hjemsdahl P. Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 517-523
- 34 Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* 1993; 60: 2319-2322
- 35 Wgner A, Montero D, Mårtensson B, Siwers B, Asberg M. Effects of fluoxetine treatment of platelet 3H-imipramine binding, 5-HT uptake and 5-HT content in major depressive disorder. *J Affect Disord* 1990; 20: 101-113
- 36 Ross SB, Aperia B, Beck-Friis J, Jansa S, Wetterberg L, Aberg A. Inhibition of 5-hydroxytryptamine uptake in human platelets by antidepressant agents in vivo. *Psychopharmacology (Berl)* 1980; 67: 1-7
- 37 刘霞, 王承党. 5-羟色胺再摄取抑制剂增加消化道出血的危险性吗? *国外医学·消化系疾病分册* 2005; 25: 171-174
- 38 Nemeroff CB, Musselman DL. Are platelets the link between depression and ischemic heart disease? *Am Heart J* 2000; 140: 57-62
- 39 Malinin AI, Callahan KP, Serebruany VL. Paradoxical activation of major platelet receptors in the methadone-maintained patients after single pill of aspirin. *Thromb Res* 2001; 104: 297-299
- 40 Maurer-Spurej E. Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 159-170
- 41 Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, Aloisi G. 5HT<sub>2</sub>-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. *Life Sci* 1993; 53: 209-215
- 42 Kurne A, Ertugrul A, Anil Yağcıoğlu AE, Yazici KM. Venous thromboembolism and escitalopram. *Gen Hosp Psychiatry* 2004; 26: 481-483
- 43 Croom KF, Plosker GL. Escitalopram: a pharmacoeconomic review of its use in depression. *Pharmacoeconomics* 2003; 21: 1185-1209
- 44 Effexor. Revised label FDA approved on 05/13/2004. Accessed July 13, 2005. Available from: [http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/20151slr028,030,032,20699slr041,048,052\\_effexor\\_lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/20151slr028,030,032,20699slr041,048,052_effexor_lbl.pdf)
- 45 Serzone. Revised label approved on 05/27/2004. Accessed July 13, 2005. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4065b1-25-tab11F-Serzone-SLR034.pdf>
- 46 Remeron. Revised label FDA approved on 06/01/2004. Accessed July 13, 2005. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4065b1-26-tab11G-Remeron-Tabs-SLR016.pdf>
- 47 Wellbutrin. Revised label FDA approved on 05/27/2004. Accessed July 13, 2005. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4065b1-20-tab11A-Wellbutrin-Tabs-SLR028.pdf>
- 48 Yuan Y, Tsoi K, Hunt RH. Selective serotonin reuptake inhibitors and risk of upper GI bleeding: confusion or confounding? *Am J Med* 2006; 119: 719-727
- 49 Loke YK, Trivedi AN, Singh S. Meta-analysis: gastrointestinal bleeding due to interaction between selective serotonin uptake inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 31-40
- 50 Opatrny L, Delaney JA, Suissa S. Gastro-intestinal haemorrhage risks of selective serotonin receptor antagonist therapy: a new look. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 76-81
- 51 Kumar D, Saaraswat T, Sengupta SN, Mehrotra S. Upper gastrointestinal bleeding in a patient with depression receiving selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *Indian J Pharmacol* 2009; 41: 51-53
- 52 Zhao SL, Li P, Ji M, Zong Y, Zhang ST. Upper gastrointestinal hemorrhage caused by superwarfarin poisoning. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1680-1682
- 53 Mort JR, Aparasu RR, Baer RK. Interaction between selective serotonin reuptake inhibitors and nonsteroidal antiinflammatory drugs: review of the literature. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1307-1313

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次。另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, WJG 位于第 174 名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

# 乙型病毒性肝炎的免疫动力学

胡敏鹏, 郑琦, 江家骥

胡敏鹏, 郑琦, 江家骥, 福建医科大学附属第一医院肝病中心 福建省福州市 341000

作者贡献分布: 本文综述由胡敏鹏与郑琦完成; 江家骥审校。  
通讯作者: 江家骥, 教授, 主任医师, 341000, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院肝病中心. jiang\_jjc@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-04-21  
接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Kinetics of immune responses to hepatitis B virus infection

Min-Li Hu, Qi Zheng, Jia-Ji Jiang

Min-Li Hu, Qi-Zheng, Jia-Ji Jiang, Clinical and Research Center for Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 341000, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Jia-Ji Jiang, Clinical and Research Center for Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 341000, Fujian Province, China. jiang\_jjc@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-22 Revised: 2011-04-21

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

The pathogenesis of hepatitis B is mainly triggered by the host's cellular immune responses to hepatitis B virus (HBV) infection, and the immune responses against the virus depends on the interaction of various immune cells. Current research of immunity to hepatitis B infection mainly focuses on understanding the differences between patients who can control HBV infection and those with persistent infection. In this paper, we analyze how immunological events influence the development of innate and adaptive immunity needed to control HBV infection and explore the mechanisms by which high levels of viral antigens, CD4<sup>+</sup> T cells, programmed death 1 (PD-1), the presence of regulatory T cells, and impaired dendritic cell functions maintain the HBV-specific immunological failure.

Key Words: Hepatitis B virus; Natural killer cells; CD4<sup>+</sup> T cells; CD8<sup>+</sup> T cells; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; Programmed death 1; Dendritic cells

Hu ML, Zheng Q, Jiang JJ. Kinetics of immune responses to hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1381-1388

## 摘要

乙型肝炎的发病机制主要是机体清除乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)而引发的细胞免疫病理改变, 机体对病毒的免疫应答有赖于一系列免疫活性细胞的相互作用。目前国内外主要就HBV感染控制者和感染持续者间的免疫差异原因进行研究。本文就乙型肝炎病毒感染状态下机体控制HBV感染下各相关免疫细胞间的作用机制以及对导致HBV特异免疫缺陷的因素(如高病毒抗原、CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞、程序死亡-1、调节性T淋巴细胞和损伤的树突状细胞)作一综述。

关键词: 乙型肝炎病毒; 自然杀伤细胞; CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞; CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T淋巴细胞; 程序死亡1; 树突状细胞

胡敏鹏, 郑琦, 江家骥. 乙型病毒性肝炎的免疫动力学. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1381-1388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1381.asp>

## 0 引言

乙型肝炎的发病机制主要是机体清除乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)而引发的细胞免疫病理改变, 机体对病毒的免疫应答有赖于一系列免疫活性细胞的相互作用, 包括: 非特异性免疫反应细胞如自然杀伤(natural killer, NK)T细胞、单核巨噬细胞在病毒感染早期阶段起重要作用。树突状细胞(dendritic cell, DC)是诱导适应性免疫所必须, 在T淋巴细胞的发育中起重要作用, 启动和诱导病毒特异性T淋巴细胞应答。病毒特异性T淋巴细胞是抗病毒应答的主要效应细胞, 通过诱导病毒感染靶细胞凋亡和分泌炎症细胞因子清除病毒。病毒和宿主免疫系统两方面相互作用决定HBV感染的临床结局<sup>[1-3]</sup>。大部分宿主可有效控制病毒感染, 彻底清除病毒而缓解; 另一部分宿主却因不能形成有效的免疫应答清除病毒, 导致病毒的慢性持续感染。机体免疫系统的各个免疫成分密切相关, 不同成分间相互联系, 其中一种功能受损都会影响到其他免疫成分的作用。

## ■背景资料

人是乙型肝炎病毒(HBV)易感的主要物种。目前对HBV感染相关疾病的研究着重在免疫学方面, 乙型肝炎的发病机制主要是机体清除HBV引发的细胞免疫病理改变, 机体对病毒的免疫应答有赖于一系列免疫活性细胞的相互作用。

## ■同行评议者

王江滨, 教授, 吉林大学中日联谊医院消化内科

## ■ 研发前沿

HBV感染导致的  
急慢性感染机制是  
目前的研究热点。

## 1 急性HBV感染

**1.1 天然免疫** 急性乙型肝炎患者的发病过程与感染猩猩模型极相似, HBV感染大约4-7 wk后, 病毒开始活跃复制, 约8 wk时肝内的HBV DNA和cccDNA达到峰值, 此后迅速降低; 第8周出现干扰素(interferon, IFN) $\gamma$  mRNA, 14-16 wk达峰值, 病毒清除与肝内IFN- $\gamma$ 产生一致. 这个过程清除了90%以上的病毒却不伴ALT的升高或肝组织病变<sup>[4]</sup>. 病毒感染早期产生的IFN- $\gamma$ 主要来源是NK/NKT淋巴细胞, 控制早期病毒的复制, 并促使病毒特异性和非特异性细胞聚集到肝内发挥免疫应答功能<sup>[5-7]</sup>. Fisticaro等<sup>[8]</sup>发现NK/NKT淋巴细胞在HBV DNA升至峰值前迅速活化, 表现为表面活化受体(CD69和NKG2D)的表达在感染早期显著升高, 同期伴随NK/NKT淋巴细胞的细胞毒功能和分泌IFN- $\gamma$ 的水平显著升高. 由此证明了HBV感染的早期, NK/NKT的功能活化对控制HBV感染起重要的作用.

急性乙型肝炎患者发病的潜伏期, 循环中大量的NK细胞先于HBV复制的高峰出现, HBV复制的高峰伴随着一个典型的产生IFN- $\gamma$ 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白介素-2(interleukin-2, IL-2)的自限性感染过程, 随后开始出现HBV特异的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的应答, 但较微弱, 直至HBV复制和NK/NKT淋巴细胞的应答下降, 适应性免疫才完全被激活<sup>[8,9]</sup>. 而发展成慢性感染的动物模型缺乏这一急性期反应, 不能产生足够的适应性免疫. 因此, 天然免疫对于控制早期HBV感染非常重要. 感染早期NK/NKT淋巴细胞分泌大量的免疫活化成分IFN- $\gamma$ 和IL-2, 是后续形成有效的适应性免疫的重要因素.

**1.2 适应性免疫** 急性自限性肝炎患者外周血HBV DNA下降之后, HBV特异性的T淋巴细胞应答高峰延迟出现, HBV特异性的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞对病毒抗原应答发生的时间是基本一致的, 表现为分泌IFN- $\gamma$ 、IL-2等效应细胞因子的细胞频数显著增加, 而分泌IFN- $\gamma$ 的CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞频数峰值高于CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞<sup>[8,9]</sup>; 这种情况同样见于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)感染的小鼠模型. 这可能是CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞自身有更强的分化增殖能力, 更有效的抗原提呈, IL-2和IL-15更好地促进其早期的增殖活化等因素有关<sup>[10]</sup>. HBV特异性的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌IL-2的高峰先于IFN- $\gamma$ , 这意味着急性自限性

的HBV感染患者, IL-2是感染宿主早期控制病毒和抗原清除所必需的. CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌的IL-4和IL-10逐渐升高, 当Th1型细胞因子(IL-2、IFN- $\gamma$ 等)消失后, IL-4和IL-10达到峰值, 血清中可测到抗-HBs抗体<sup>[6]</sup>. HBV感染被清除之后, 病毒特异的抗体和特异的记忆性T淋巴细胞应答在几年内仍可以检测到.

## 2 慢性HBV感染

**2.1 天然免疫** NK/NKT淋巴细胞作为天然免疫的效应细胞, 不但参与HBV的控制, 同时也是致肝损害的原因<sup>[11-13]</sup>; 在急性HBV感染早期抑制病毒的复制, 并诱导适应性免疫应答进一步清除病毒, 但在慢性HBV感染中的作用及机制仍不确定.

Zou等<sup>[14]</sup>利用MHV-3诱导的暴发性肝衰竭小鼠模型探讨了肝脏NK细胞在病毒诱导的肝衰竭中作用, 发现Balb/cJ小鼠感染MHV-3后, NK细胞在肝脏迅速大量募集和活化, 且杀伤活性显著增强, 分泌IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的水平也显著上调, 而且可通过Fas/FasL和NKG2D/NKG2DL途径损伤肝细胞, 表明肝脏NK细胞在MHV-3诱导的小鼠暴发性肝衰竭中可能发挥重要作用. 另一项研究发现肝脏NK细胞在多聚胞嘧啶核苷酸(polyinosinic: polycytidylic acid, poly I:C)诱导HBV转基因小鼠肝脏损伤中发挥决定性作用, 该损伤依赖于IFN- $\gamma$ 的产生, 用低剂量Con A诱导HBV转基因小鼠肝细胞损伤实验发现, 肝脏NK细胞利用NKG2D识别肝细胞表面相应配体而造成肝细胞损伤<sup>[15]</sup>. 对HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者的研究发现, 在肝脏炎症突然加剧的时候, 肝脏NK细胞可能通过TRAIL/TRAIL-R途径诱导肝细胞死亡, 这一发现为肝脏NK细胞在HBV引起的肝细胞损伤中的作用提供了直接的证据<sup>[16]</sup>. HBeAg是抑制TRAIL介导凋亡的抑制因子, HBeAg的过表达显著降低TRAIL介导的肝细胞凋亡, 从而有利于慢性感染的形成<sup>[17]</sup>.

HBV感染的转基因鼠模型中NKT细胞的活化产生IFN- $\gamma$ 来抑制病毒的复制<sup>[18]</sup>, 然而NKT在HBV慢性乙型肝炎中的作用仍需要探讨, 因为NKT细胞高表达于实验动物鼠的肝脏, 约20%-30%; 在人类, 经典的NKT细胞偶有超过1%, 因此, 更倾向于认为NK细胞是产生IFN- $\gamma$ 控制病毒感染的主要来源.

**2.2 适应性免疫** 适应性免疫的各类效应细胞组成一个复杂的网络, 每一类效应细胞在对HBV

的免疫中均有重要作用。

CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞主要由MHC II类分子限制, 可产生多种淋巴因子, 有效抑制HBV的复制<sup>[19-21]</sup>。同时CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞促使CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞增殖, 诱导细胞毒活性, 有效抑制HBV的复制; 并支持B淋巴细胞的激活和增殖以产生病毒特异性抗体<sup>[22-24]</sup>。此外, 还包括具有负相调节作用的调节性T淋巴细胞(regulatory T cell, Tregs)和Th17细胞亚群。已有研究显示<sup>[25]</sup>, HBV感染自发缓解和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的应答密切相关。慢性HBV携带者在接受了同种HLA配对的HBV自然免疫的捐赠者的骨髓后, 实现了HBsAg的转换伴HBcAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答显著增加, 经PCR证实供者和受者的HBcAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞是同一来源, 因此认为HBcAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答是实现血清学转换的关键<sup>[25]</sup>。慢性乙型肝炎患者急性发作, 自发HBcAg血清转换前, 可出现HBcAg特异的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答的显著增加<sup>[26,27]</sup>。这些都提示HBcAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答在控制HBV实现血清学转换的重要作用。HBsAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答在HBV感染中的应答水平不如HBcAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞应答强烈; HBsAg特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的有限扩增, 并不表明HBsAg是弱的免疫原, 重组HBsAg疫苗免疫接种时可产生强烈的辅助T淋巴细胞应答<sup>[28,29]</sup>。

CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞识别病毒抗原表位后活化, 经分泌穿孔素/颗粒酶依赖的途径杀伤被病毒感染的靶细胞或通过Fas/FasL途径启动感染细胞的凋亡, 造成肝细胞的损伤; 通过释放细胞因子的非细胞毒途径抑制病毒的复制, 主要是细胞毒性T淋巴细胞分泌的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-2发挥的一种转录后的抗病毒作用机制<sup>[30,31]</sup>。研究认为, 病毒特异的CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌细胞因子清除病毒是控制HBV的主要作用机制<sup>[30]</sup>。

尽管细胞免疫是HBV清除的主要效应机制, 体液免疫在控制HBV中也有重要的作用。HBV清除与外膜抗体产生有关, B淋巴细胞产生抗体中和游离的病毒颗粒, 阻止感染。

### 3 慢性HBV感染中适应性免疫的缺陷

在慢性感染的动物模型(如旱獭和大猩猩), 观察到慢性感染的形成常常缺乏典型的类似自限性感染过程产生IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的高峰<sup>[32,33]</sup>, 无法形成有效的特异性抗病毒免疫应答。急性自限性乙型肝炎针对病毒的特异性的CD8<sup>+</sup>细胞毒性T

淋巴细胞表现为多克隆、多特异性<sup>[21,34-35]</sup>, 而慢性HBV感染患者特异性CD8<sup>+</sup>细胞毒性T淋巴细胞往往只能识别单一抗原位点, 应答范围往往窄又弱<sup>[36]</sup>, 影响病毒的有效清除, 导致HBV感染慢性化。

HBV感染未能控制转为慢性之后, 适应性免疫功能进行性减低, 表现为血循环和肝内病毒特异性的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数量很少, 病毒特异性抗体水平很低。HBV感染的特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的功能存在缺陷, 产生IFN- $\gamma$ 及扩增的能力下降, 穿孔素含量减少, 杀伤靶细胞的能力降低<sup>[37-39]</sup>。尽管用覆盖HBV蛋白的肽段体外扩增外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 慢性乙型肝炎患者外周血抗原特异性CD8<sup>+</sup> T和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的应答相对自限性肝炎患者仍很微弱<sup>[39]</sup>。慢性乙型肝炎的患者, HBV特异性T淋巴细胞应答的强度与病毒负荷呈负相关性<sup>[39]</sup>。只有在低病毒血症的患者才能检测到病毒特异性T淋巴细胞应答; 当HBV DNA > 10<sup>10</sup> copies/L偶尔能测到外膜特异性或聚合酶特异性的CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞<sup>[40]</sup>。

慢性活动性肝炎时肝脏局部的病毒特异CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数增多, 但同时会募集大量的非特异性免疫细胞浸润肝脏, 导致肝内特异的CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞浸润比例降低; 特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞无法控制病毒清除, 却因为非特异性免疫细胞在肝脏内的大量聚集造成肝脏炎症损害, 病变累积最终发生严重的慢性肝病<sup>[37]</sup>。慢性乙型肝炎患者外周血和肝内病毒特异性T淋巴细胞分泌不同类型的细胞因子, 外周血分泌TH1(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2)细胞因子的病毒特异性T淋巴细胞数多于分泌IL-10的特异性T淋巴细胞数, 而肝内浸润的CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞则产生更多的IL-10。说明肝内的IL-10<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数增加, 可能是限制肝脏炎症同时也是病毒持续感染的机制<sup>[41]</sup>。在肝内的IL-10<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数增多的情况下, 肝内CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌的前炎症因子TNF- $\alpha$ 仍然明显升高, 与肝脏炎症、纤维化直接相关。慢性乙型肝炎患者外周血分泌细胞因子的HBV特异性T淋巴细胞数比例很低, 占总CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的0.00%-1.93%, 这低于其他慢性病毒感染(如HIV-1), 分泌细胞因子的HIV特异T淋巴细胞占总CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的0.8%-18.0%<sup>[41,42]</sup>。

### 4 适应性免疫缺陷的机制

慢性乙型肝炎发生机制仍不明确, 包括持续高

#### ■ 相关报道

在急性HBV感染研究中, Fisticaro等发现NK/NKT淋巴细胞在HBV DNA升至峰值前迅速活化, 表现为表面活化受体(CD69和NKG2D)的表达在感染早期显著升高, 同期伴随NK/NKT淋巴细胞的细胞毒功能和分泌IFN- $\gamma$ 的水平显著升高。而在慢性感染中发现特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞无法控制病毒清除, 是因为非特异性免疫细胞在肝脏内的大量聚集造成肝脏炎症损害, 病变累积最终发生严重的慢性肝病, 提出是适应性免疫机制缺陷导致HBV感染慢性化的观点。

### ■创新盘点

本综述对近两年的研究报道做了概述,认为适应性免疫机制缺陷导致HBV感染慢性化是近年来较新研究方向,并且总结了导致适应性免疫缺陷的可能原因,如高滴度的病毒抗原、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的数量、PD-1或Tregs的表达上调、DC功能的缺陷等。特别是提出肝脏炎症损害可能是非特异性免疫细胞造成的,这与过去认为的主要是特异性免疫细胞导致肝脏损害的观点不同。

滴度的病毒抗原、CD4<sup>+</sup>T细胞的数量、程序死亡1(programmed death 1, PD-1)或Tregs的表达上调、DC功能的缺陷等。

4.1 高病毒抗原 在LCMV感染的小鼠模型中,持续高滴度的病毒抗原导致T淋巴细胞功能逐渐丧失,先是IL-2产生的耗竭,随之是细胞毒功能和TNF- $\alpha$ 产生的耗竭,最后丧失的是IFN- $\gamma$ 的效应功能。这样T淋巴细胞功能的逐渐丧失称之为T淋巴细胞耗竭。不断地接触病毒抗原被认为是HBV感染T淋巴细胞功能耗竭的机制<sup>[43]</sup>。慢性乙型肝炎患者中检测到核心抗原和聚合酶抗原特异性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞应答,而缺乏外膜抗原特异性的T淋巴细胞应答,这与急性肝炎患者中常测到外膜抗原特异性T淋巴细胞的情况是不同的<sup>[39]</sup>;这是否意味着慢性HBV感染外膜抗原特异的T淋巴细胞的严重缺乏是因为外周血高水平的外膜抗原的持续暴露;提示不同抗原特异性T淋巴细胞亚群功能紊乱的差异,与环境中不同的病毒抗原的持续暴露有关。

HBV特异性T淋巴细胞应答中的优势表位的排序会因病毒持续感染而改变。Core18-17抗原表位是急性肝炎时HLA-A2限制性的优势表位,但不是绝对的;在许多患者pol455-63、Env181-91以及Env335-43都可能是特异性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞应答的优势表位<sup>[9,44,45]</sup>。在慢性乙型肝炎患者HBV DNA水平高于 $1 \times 10^7$  copies/L时,无论体外直接检测还是体外培养扩增都检测不到Core18-17抗原表位特异的T淋巴细胞应答<sup>[40,45]</sup>。这种HBV特异性T淋巴细胞群功能的差异认为与T淋巴细胞受体、T淋巴细胞靶表位病毒序列的不同以及抗原提呈细胞对T淋巴细胞的提呈等有关,在慢性感染中,针对T淋巴细胞应答的优势表位趋于消失,次优势表位增加。

CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞通过CD40依赖的共刺激分子直接活化DC和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞,或者通过分泌细胞因子如IL-4和IL-2间接地辅助B细胞和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞应答。HBcAg特异的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的激活和抑制,严格依赖CD4<sup>+</sup>Th细胞。在LCMV诱导的小鼠肝炎模型,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞没有提供辅助作用,会阻碍CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞发育成效应性T淋巴细胞应答,增加CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞功能的耗竭<sup>[46,47]</sup>。

4.2 病毒对免疫的影响 病毒蛋白对病毒和宿主间的免疫动力学产生影响,患者外周血的病毒抗原调节宿主的免疫应答。HBx蛋白是多功能蛋白,调节各种细胞内信号的传导通路,HBx改

变了感染肝细胞对免疫介导的肝细胞凋亡的敏感性。研究进一步证实HBx蛋白可能既是肝细胞的凋亡前体,也是抗凋亡的因素,取决于NF- $\kappa$ B<sup>[48,49]</sup>。HBV可产生大量仅包含HBsAg的非感染性亚病毒颗粒,可以是病毒颗粒的 $10^3$ - $10^6$ 倍,大量亚病毒颗粒会消耗掉许多病毒特异性T淋巴细胞,从而使特异性T淋巴细胞克隆性缺失,T淋巴细胞应答更趋低下<sup>[50]</sup>。核心蛋白的分泌形式-HBeAg,不是HBV感染或复制所必须,但在HBV慢性感染中起重要作用。HBeAg会下调单核细胞上TLR2的表达,减少炎症因子TNF- $\alpha$ 的表达<sup>[51]</sup>。HBeAg缺失或HBeAg转换为HBeAb会导致IL-12和IFN- $\gamma$ 的升高,从而增强CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞功能<sup>[27,52]</sup>。这些研究证明HBeAg会抑制Th1型的免疫应答,HBeAg消失会增强CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的活化。HBsAg/HBeAg持续存在引起新产生的免疫活性细胞不断发生耐受性。

慢性HBV感染者适应性免疫细胞进行性的功能减退和数量减少,在很大程度上影响了感染者中病毒群体的组成。由于慢性HBV感染者未能迅速地控制病毒复制,逃避T和B淋巴细胞的变异病毒不断增加。在慢性HBV感染中,可检测到具有辅助性T淋巴细胞和细胞毒性T淋巴细胞和B淋巴细胞表位变异的HBV变异株<sup>[53]</sup>。据推测这种选择主要发生在HBV感染的起始阶段。在后期,T和B淋巴细胞表位似乎被限定在病毒群体中,进一步提示在慢性HBV感染者中,免疫应答的削弱导致体内的T和B淋巴细胞活化不能对病毒产生选择性压力。病毒逃逸免疫会影响到胞内T淋巴细胞表位的处理提呈,包括与MHC分子的结合和T淋巴细胞受体的活化<sup>[54]</sup>。病毒逃逸变异也影响到对特异性抗体的识别。这种变异多见于HCV感染,因为HBV有更多相关的重叠读码框。

4.3 PD-1对CD8<sup>+</sup>T细胞的作用 PD-1分子信号传导通路,是抑制病毒特异性T淋巴细胞功能的一个主要的内在机制,可在T淋巴细胞、B淋巴细胞和髓样细胞上表达。配体PD-L1表达在肝脏的抗原提呈细胞,如肝血窦内皮细胞、Kupffer细胞和星状细胞,在肝脏浸润T淋巴细胞上PD-1和PD-L1相互结合抑制抗病毒功能和相应T淋巴细胞的凋亡。

HBV感染小鼠模型的研究将HBV特异性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞输入HBV转基因小鼠,这些特异性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞移行至肝脏,识别肝细胞上的同源性抗原,很快失去了分泌IFN- $\gamma$ 的能力,



同时出现PD-1表达上调<sup>[55]</sup>, 可见病毒特异性T淋巴细胞功能与PD-1表达的直接相关性. 急性乙型肝炎发病早期外周血HBV特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞上PD-1表达明显升高, 随着疾病恢复, HBV特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞上PD-1表达逐渐下降, 这提示早期PD-1上调有效抑制了过强的免疫反应, 减轻了CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞介导的免疫病理损伤. 而在急性肝衰竭患者发病早期, PD-1表达却无明显上调, 这与急性肝衰竭的免疫病理损害的发生密切相关<sup>[56]</sup>.

与急性HBV恢复期的患者相比, 慢性乙型肝炎患者pentamer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞上PD-1的表达显著上调, 而且与血HBV-DNA复制水平呈正相关, 配体PD-L1在PBMC上也显著上调. 阻断PD-1/PD-L1途径后, 体外重组HBV抗原刺激HBV特异性T淋巴细胞, 其增殖功能和IFN- $\gamma$ 的产生显著增加. 由此提示PD-1上调参与了T淋巴细胞功能紊乱, 通过阻断PD-1/PD-L1途径, 病毒特异性T淋巴细胞功能增强. Evans等<sup>[57]</sup>的研究进一步说明HBV病毒复制水平与CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞上PD-1的表达直接相关. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎患者, 血HBV DNA下降的同时, HBV特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞表达PD-1显著下降, 伴有病毒特异性T淋巴细胞应答的进一步改善. 同时HBeAg的消失与PD-1表达下降直接相关, 独立于病毒载量因素. 慢性HBV感染患者, PBMC上PD-L1的表达水平高于健康对照组, PD-L1的表达与免疫抑制因子IL-10相关, 与血转氨酶水平负相关<sup>[58]</sup>. 这与慢性病毒感染中, PD-1/PD-L1途径下调病毒特异性T淋巴细胞应答并限制免疫介导的肝损伤有关.

**4.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs的调节作用** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs通过调节机体免疫应答中CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup>效应T淋巴细胞的功能, DC和NK细胞等免疫细胞的功能, 在病毒感染中起重要作用. Tregs在HBV和宿主的抗病毒免疫效应细胞间起着免疫调控作用, 一方面抑制肝脏过度免疫病理损伤, 另一方面也可能减缓了宿主特异性T淋巴细胞对病毒的清除, 从而有利于病毒的持续感染; 影响着宿主免疫应答的结局.

急性乙型肝炎患者外周血Tregs频数在发病初期低于正常值, 进入恢复期后Tregs数量逐渐增加, 在病愈后恢复正常水平. 发病初期较低的Tregs数量有利于特异性细胞免疫应答对病毒的清除, 而恢复期Tregs数量的增加则有利于抑制感染组织的炎症损伤. 慢性乙型肝炎的患者外

周血Tregs频数, 较健康人和HBV感染恢复期患者增高, 与外周血HBV病毒载量成正相关<sup>[59,60]</sup>, PBMC和肝脏炎症浸润细胞高频率表达FOXP3 mRNA<sup>[60,61]</sup>. 病毒复制越活跃, 机体Tregs比例越高, 说明机体因为Tregs的免疫抑制, 促进了病毒的复制<sup>[43]</sup>.

Tregs的功能研究发现, Tregs本身对抗-CD3抗体和HBV抗原刺激没有明显的增殖反应和IFN- $\gamma$ 分泌, 但可产生IL-10, 抑制自体的PBMC增殖和IFN- $\gamma$ 分泌, 其中对HBV抗原引起的细胞免疫应答抑制作用较强<sup>[59,60]</sup>. Tregs可抑制HBV特异的Th细胞应答和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的免疫应答. 慢性乙型肝炎患者外周血的PBMC去除Tregs细胞后, 予HBcAg或HBsAg刺激, PBMC增殖明显增强; 重新加入这些Tregs后, PBMC的增殖和IFN- $\gamma$ 的产生则明显被抑制. 说明Tregs会抑制HBV特异的细胞毒性T淋巴细胞细胞应答, 引起免疫应答下降<sup>[59-61]</sup>. 同样, 外周血Tregs能够抑制由CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞介导的抗病毒免疫反应, 去除Tregs后PBMC中的HBV特异性CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞的数量增加、功能增强, 此现象不仅限于慢性乙型肝炎患者, 也可见于感染HBV恢复后的患者<sup>[62,63]</sup>.

慢性乙型肝炎患者肝脏局部FOXP3<sup>+</sup> Tregs的表达和病情轻重相关, 免疫组织化学可见在肝脏汇管区的淋巴细胞核上表达FOXP3. 慢性重型乙型肝炎患者和免疫清除期的慢性乙型肝炎患者肝内FOXP3的表达高于免疫耐受期的患者, 说明Tregs调节机体对HBV的清除和肝脏炎症的损伤起重要作用.

**4.5 DC在慢性感染中的作用** DC细胞是专职的抗原提呈细胞, 是诱导适应性免疫所必须. 由于他们在T淋巴细胞发育中的重要作用, DC群的功能改变解释慢性乙型肝炎患者T和B淋巴细胞的免疫的低反应状态. 虽然, DC可能被动物模型的嗜肝病毒感染, 但排除了HBV在人类DC内的复制<sup>[64,65]</sup>. 浆样DC(plasmacytoid dendritic cell, pDC)在人类病毒感染的免疫应答中, 是产生IFN- $\alpha$ 的主要细胞, 是活化天然免疫和适应性免疫的活化分子, DC提呈抗原至T淋巴细胞, 产生细胞因子IL-12和TNF- $\alpha$ , 诱导T淋巴细胞活化, 抑制病毒<sup>[66]</sup>. DC功能的损伤会抑制宿主特异的T淋巴细胞免疫应答. 在慢性HBV感染中, pDC和髓样DC(myeloid dendritic cell, mDC)的表型和功能受损, 外周血中mDC和pDC的细胞因子释放能力明显降低. 循环DC亚群的数量减低可能

#### ■应用要点

本文对HBV感染导致慢性肝炎的基础免疫方面的研究做了概述, 对急慢性肝炎患者发病主要机制有更新的认识, 各类相关免疫细胞在机体抗HBV感染中起着不可忽视的作用, 同时也可能导致感染的进一步加重, 那么如何处理这些免疫细胞为将来的免疫治疗HBV感染提供了可能的参考价值.

### ■同行评价

本文选题较好, 具有较好的科学性和可读性。

是DC从血液迁移到肝脏的结果<sup>[67]</sup>。慢性乙型肝炎患者的成熟mDC表达CD80、CD86降低, 成熟障碍, mDC对T淋巴细胞的刺激能力降低, 导致HBV特异性T淋巴细胞反应性不足<sup>[68]</sup>。

## 5 结论

HBV感染促发的机体免疫反应是一个各类效应细胞组成复杂的网络体系, 每一类效应细胞在HBV感染的免疫中都起着不可忽视的作用<sup>[69,70]</sup>, 任何一类细胞的数量或功能的改变都会导致不同的感染结局, 这为乙型肝炎的免疫治疗的拓展提供新的策略和思路。

## 6 参考文献

- Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 851-863
- Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther* 2010; 15 Suppl 3: 15-24
- Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 16-23
- Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829
- Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001; 194: 1755-1766
- Chen Y, Wei H, Gao B, Hu Z, Zheng S, Tian Z. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. *J Viral Hepat* 2005; 12: 38-45
- Hui CK, Lau GK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S44-S48
- Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, Orlandini A, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 2009; 58: 974-982
- Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertoletti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117-1124
- Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol* 2010; 184: 287-295
- Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 513-528
- Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin Immunol* 2009; 130: 16-26
- Yamagiwa S, Kamimura H, Ichida T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 1-8
- Zou Y, Chen T, Han M, Wang H, Yan W, Song G, Wu Z, Wang X, Zhu C, Luo X, Ning Q. Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure. *J Immunol* 2010; 184: 466-475
- Chen Y, Wei H, Sun R, Dong Z, Zhang J, Tian Z. Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells. *Hepatology* 2007; 46: 706-715
- Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, Das A, Lopes AR, Borrow P, Williams K, Humphreys E, Afford S, Adams DH, Bertoletti A, Maini MK. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007; 204: 667-680
- Du J, Liang X, Liu Y, Qu Z, Gao L, Han L, Liu S, Cui M, Shi Y, Zhang Z, Yu L, Cao L, Ma C, Zhang L, Chen Y, Sun W. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death Differ* 2009; 16: 219-229
- Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921-930
- Wang FS, Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3: 499-512
- Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 258-266
- Tan AT, Koh S, Goh V, Bertoletti A. Understanding the immunopathogenesis of chronic hepatitis B virus: an Asian prospective. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 833-843
- Panther E, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Rösler K, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R. [The role of the virus specific T-cell response in acute and chronic HBV and HCV infection]. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 39-46
- Dienes HP, Dreber U. Pathology of immune-mediated liver injury. *Dig Dis* 2010; 28: 57-62
- Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Gerlach TJ, Diepolder HM, Schirren CA, Hoffmann R, Wächter M, Backmund M, Pape GR. Hepatitis C virus eradication associated with hepatitis B virus superinfection and development of a hepatitis B virus specific T cell response. *J Hepatol* 2002; 37: 866-869
- Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-624
- Tsai SL, Chen PJ, Lai MY, Yang PM, Sung JL, Huang JH, Hwang LH, Chang TH, Chen DS. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implications for hepatitis B e

- antigen seroconversion. *J Clin Invest* 1992; 89: 87-96
- 27 Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997; 99: 3025-3033
- 28 Böcher WO, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer zum Büschenfeld KH, Löhr HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology* 1999; 29: 238-244
- 29 Celis E, Ou D, Otvos L. Recognition of hepatitis B surface antigen by human T lymphocytes. Proliferative and cytotoxic responses to a major antigenic determinant defined by synthetic peptides. *J Immunol* 1988; 140: 1808-1815
- 30 Cao XY, Liu J, Lian ZR, Clayton M, Hu JL, Zhu MH, Fan DM, Feitelson M. Differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma induced by woodchuck hepatitis B virus in mice. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 575-578
- 31 Li H, Li RC, Liao SS, Gong J, Zeng XJ, Li YP. Long-term effectiveness of infancy low-dose hepatitis B vaccine immunization in Zhuang minority area in China. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 122-124
- 32 Cote PJ, Toshkov I, Bellezza C, Ascenzi M, Roneker C, Ann Graham L, Baldwin BH, Gaye K, Nakamura I, Korba BE, Tennant BC, Gerin JL. Temporal pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection. *Hepatology* 2000; 32: 807-817
- 33 Menne S, Roneker CA, Roggendorf M, Gerin JL, Cote PJ, Tennant BC. Deficiencies in the acute-phase cell-mediated immune response to viral antigens are associated with development of chronic woodchuck hepatitis virus infection following neonatal inoculation. *J Virol* 2002; 76: 1769-1780
- 34 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76
- 35 Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3099-3105
- 36 Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: can we clear the virus and prevent drug resistance? *Antivir Chem Chemother* 2004; 15: 299-305
- 37 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280
- 38 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002; 195: 1089-1101
- 39 Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertolotti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-4225
- 40 Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertolotti A. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; 78: 5707-5719
- 41 Chang JJ, Thompson AJ, Visvanathan K, Kent SJ, Cameron PU, Wightman F, Desmond P, Locarnini SA, Lewin SR. The phenotype of hepatitis B virus-specific T cells differ in the liver and blood in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2007; 46: 1332-1340
- 42 Betts MR, Casazza JP, Koup RA. Monitoring HIV-specific CD8+ T cell responses by intracellular cytokine production. *Immunol Lett* 2001; 79: 117-125
- 43 Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003; 77: 4911-4927
- 44 Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003; 60: 61-66
- 45 Michel ML, Mancini-Bourgine M. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S108-S114
- 46 Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 4-13
- 47 Urbani S, Boni C, Amadei B, Fiscaro P, Cerioni S, Valli MA, Missale G, Ferrari C. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology* 2005; 41: 826-831
- 48 Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-kappaB and the mitochondrial permeability transition pore. *J Virol* 2009; 83: 4718-4731
- 49 Clippinger AJ, Bouchard MJ. Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential. *J Virol* 2008; 82: 6798-6811
- 50 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- 51 Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S, Kurtovic J, Chang J, Lewin S, Desmond P, Locarnini S. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 2007; 45: 102-110
- 52 Ren FY, Jin H, Piao XX, Piao FS. Ribavirin and IFN-alpha combination therapy induces CD4+ T-cell proliferation and Th1 cytokine secretion in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5440-5445
- 53 Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- 54 Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H, Ruppert T, Rispeter K, Henklein P, Sijts A, Hengel H, Kloetzel PM, Rehmann B. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 2004; 114: 250-259
- 55 Isogawa M, Furuichi Y, Chisari FV. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 2005; 23: 53-63

- 56 Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS, Zhang SY, Li BS, Wang HF, Wu H, Lau GK, Fu YX, Wang FS. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology* 2008; 134: 1938-1949, 1938-1949
- 57 Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769
- 58 Geng L, Jiang G, Fang Y, Dong S, Xie H, Chen Y, Shen M, Zheng S. B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14+ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels. *J Viral Hepat* 2006; 13: 725-733
- 59 Peng G, Li S, Wu W, Sun Z, Chen Y, Chen Z. Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 2008; 123: 57-65
- 60 Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- 61 Stoop JN, van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology* 2007; 361: 141-148
- 62 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 63 Yang G, Liu A, Xie Q, Guo TB, Wan B, Zhou B, Zhang JZ. Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. *Int Immunol* 2007; 19: 133-140
- 64 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Böcher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836
- 65 Untergasser A, Zedler U, Langenkamp A, Hösel M, Quasdorff M, Esser K, Dienes HP, Tappertzhofen B, Kolanus W, Protzer U. Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 43: 539-547
- 66 Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275-306
- 67 Duan XZ, Wang M, Li HW, Zhuang H, Xu D, Wang FS. Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J Clin Immunol* 2004; 24: 637-646
- 68 van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, de Jong EC, Niesters HG, Kusters JG, Kwekkeboom J, Janssen HL. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 40: 738-746
- 69 Das A, Maini MK. Innate and adaptive immune responses in hepatitis B virus infection. *Dig Dis* 2010; 28: 126-132
- 70 Hadziyannis SJ. Milestones and perspectives in viral hepatitis B. *Liver Int* 2011; 31 Suppl 1: 129-134

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology(WJG)*(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。( *WJG*编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

# 益生菌制剂在肠病治疗中的应用进展

赵维俊, 吕嘉彬

赵维俊, 吕嘉彬, 陕西科技大学生命科学与工程学院 陕西省西安市 710021  
陕西省“13115”基金资助项目, No. 2009ZDKG-20  
作者贡献分布: 本文综述由赵维俊完成; 吕嘉彬审核。  
通讯作者: 吕嘉彬, 教授, 710021, 陕西省西安市未央区, 陕西科技大学生命科学与工程学院. lujl@sust.edu.cn  
收稿日期: 2010-12-31 修回日期: 2011-03-02  
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-05-08

## Application of probiotics in the treatment of intestinal diseases

Wei-Jun Zhao, Jia-Li Lv

Wei-Jun Zhao, Jia-Li Lv, College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China  
Supported by: the "13115" Project of Shaanxi Province, No. 2009ZDKG-20  
Correspondence to: Professor Jia-Li Lv, College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Weiyang District, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China. lujl@sust.edu.cn  
Received: 2010-12-31 Revised: 2011-03-02  
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-05-08

### Abstract

Probiotics has been widely applied to medical treatment and health and food industries thanks to its regulatory effect on the micro-ecological balance of the human body. Recent advances in research of intestinal diseases have led to a better understanding of the effectiveness of probiotics in the treatment of these diseases. This paper summarizes the beneficial functions of probiotics and mechanisms involved. Meanwhile, we review its application in the treatment of intestinal diseases.

Key Words: Probiotics; Intestinal diseases; Mechanism; Application; Prospect

Zhao WJ, Lv JL. Application of probiotics in the treatment of intestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1389-1393

### 摘要

目前, 益生菌在医疗、保健和食品等领域备受欢迎, 这得益于其调节人体生态平衡的独特

之处。随着肠道疾病研究的逐步深入, 益生菌的治疗效用越发引起关注。本文主要综述了益生菌的功能和作用机制, 在肠病治疗中的应用及其展望。

关键词: 益生菌; 肠道疾病; 作用机制; 应用; 展望

赵维俊, 吕嘉彬. 益生菌制剂在肠病治疗中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(13): 1389-1393  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1389.asp>

### 0 引言

近30年来益生菌制剂的研制取得了较大的进展, 并已广泛应用于临床研究借以调整人体内微生物群落或种群结构, 保持菌群平衡, 促进内环境的稳定, 提高宿主的健康状态, 对消化系统疾病的防治起到了一定的作用。目前, 益生菌制剂开始被广泛地应用于炎症性肠病的治疗中, 他可以直接或间接的通过调节内源性的微生态系统或免疫系统作用于肠道, 以不良反应小、治疗效果显著、适合长期服用等优点备受消费者的青睐, 因此, 在治疗炎症性肠病方面正突显其难以替代的作用。

### 1 益生菌的功能和作用机制

大量研究表明, 益生菌具有以下功能: 改善制品风味; 提高蛋白质、脂类和维生素等的代谢; 改善胃肠道功能; 增强免疫力; 防癌和抗癌作用; 降低胆固醇及改善血脂等。另外, 益生菌对人体的生理活性还包括缓解乳糖不耐症; 防止有害物质产生、延缓人体衰老; 促进生殖泌尿系统健康; 抑制有害菌、防止腹泻; 抗高血压、减少心血管疾病的发病率; 降低与酒精中毒性肝病相关的内毒素的作用等, 这些作用至今已得到了不同程度的证实和临床验证<sup>[1-5]</sup>。尤其是在益生菌治疗肠道性疾病方面, 现在已有大量文献报道。钟燕等<sup>[6]</sup>经研究认为, 双歧杆菌能够耐受胃肠的酸碱环境在结肠内存活和繁殖, 并影响内源性双歧杆菌和其他细菌组的数量, 改变结肠菌群的构成, 尤其以双歧杆菌更为明显, 这对

### ■背景资料

肠病在如今是困扰我们生活的常见病之一, 研究者们为寻求其解决办法做了很多研究。通常运用化学药物治疗, 但是化学药物具有不良反应等问题, 因此生物制剂即益生菌制剂治疗肠病以不良反应小、治疗效果显著等优点受到研究者的普遍关注。

### ■同行评议者

王江滨, 教授, 吉林大学中日联谊医院消化内科

## ■ 相关报道

Bengmark认为, 益生菌最为重要的功能有: 减少或清除多种潜在的致病微生物或多种毒素、致变物、致癌物等; 调节先天性与获得性免疫屏障的机制; 促进细胞程序性死亡; 释放大量的营养物质、抗氧化剂、促生长因子、凝集因子以及其他生长必要的因子。

减轻乳糖不耐受症状起到重要作用。Bengmark<sup>[7]</sup>认为, 益生菌至少有5方面的功能, 其中对于患者最为重要的有: 减少或清除多种潜在的致病微生物或多种毒素、致变物、致癌物等; 调节先天性与获得性免疫屏障的机制; 促进细胞程序性死亡; 释放大量的营养物质、抗氧化剂、促生长因子、凝集因子以及其他生长必要的因子。另外, 益生菌能够提供营养物质, 促进机体生长。益生菌如果能在体内正常发挥代谢活性, 就能直接为宿主提供可利用的必需氨基酸和各种维生素(维生素B和K族等), 还可提高矿物元素的生物活性, 进而达到为宿主提供必需营养物质、增强动物的营养代谢、直接促进生长的作用<sup>[8-10]</sup>。益生菌产生的酸性代谢产物使肠道环境偏酸性, 而一般消化酶的最适pH值为偏酸性(淀粉酶6.5、糖化酶4.4), 这样就有利于营养素的消化吸收。有机酸的产生还可加强肠道的蠕动和分泌, 也可促进消化吸收养分。

## 2 益生菌制剂在肠病治疗中的应用

正常人体的肠道中生存着100万亿微生物, 包括细菌、真菌、病毒、原虫等。在正常人体肠道菌群中数量上占优势的仅有十几种, 如: 拟杆菌属、乳酸杆菌属、梭状芽孢杆菌属、双歧杆菌属、真菌属、肠球菌属和埃希菌属等。如果上述细菌数量波动在正常生理范围内, 则能维持正常的生理、免疫功能, 即构成人体的正常微生态环境。现如今, 肠道疾病的发生率骤增, 受到了很多医疗研究者的重视。随着乳酸菌等益生菌群研究的发展, 益生菌在肠病治疗中的应用越来越广泛。益生菌被应用于很多炎症性疾病的治疗, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩病、腹泻、化疗引起的黏膜炎、胰腺炎、关节炎、遗传性过敏症的湿疹、憩室炎、甾体抗炎药引起的肠病等<sup>[11-13]</sup>。

**2.1 益生菌制剂在UC中的应用** 在形成UC的个体中, 肠道菌群失调或宿主对肠道菌群应答的异常, 是此病特征性免疫失调关键的始动因子和维持因子<sup>[14]</sup>。益生菌可能通过生物拮抗、加强肠道上皮屏障功能及调节肠道免疫系统功能等机制参与防治UC。Resta-Lenert<sup>[15]</sup>研究显示活的嗜热葡萄球菌和嗜酸乳杆菌能够抑制肠侵袭型大肠埃希菌对人肠细胞系的黏附和侵袭, 这些益生菌促进上皮细胞紧密连接区肌动蛋白和咬合蛋白的磷酸化。Yan<sup>[16]</sup>研究显示鼠李糖乳杆菌通过抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis fac-

tor, TNF)诱导促凋亡P38丝裂原活化蛋白激酶的活化而预防细胞因子诱导的肠上皮细胞凋亡。Madsen<sup>[17]</sup>通过评价短路电流、经上皮电位差和离体组织的D-甘露醇流量, 显示益生菌能使结肠生理功能和屏障完整性正常化。益生菌能够区分非致病菌和致病菌, 传递特定的细胞因子对基础免疫细胞产生应答, 通过刺激巨噬细胞和自然杀伤细胞, 增加巨噬细胞和淋巴细胞的活性以及肠道黏膜白介素(interleukin, IL)-10的产生和减少TNF- $\alpha$ 和干扰素 $\gamma$ 的分泌, 因而加强肠道黏膜免疫系统的活性。霍丽娟等<sup>[18]</sup>通过对UC大鼠的研究, 发现益生菌可通过抑制IL-1 $\beta$  mRNA和TNF- $\alpha$  mRNA炎症因子的表达而减轻大鼠结肠黏膜的损伤, 达到治疗UC的作用。在国外的相关益生菌治疗UC的研究中发现, 非致病性大肠杆菌与美沙拉秦同样对治疗有效<sup>[19]</sup>。另外, 以双歧杆菌为主的微生态制剂、酵母菌和混有益生菌的合生元制剂治疗UC的研究表明, 其作用都很显著<sup>[20-27]</sup>。通过实验表明<sup>[28,29]</sup>, 益生菌有治疗肠炎的能力主要因为他能阻止结肠病原菌的定植, 降低炎症性细胞因子的表达, 增强上皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡以及为肠细胞提供新陈代谢的能量。很多研究表示, 益生菌能够转变动物体内肠道微生物的组成, 但在很多情况下, 微生物的如此转变仅仅持续很短的时间, 随后便随着益生菌的变化而停止。

**2.2 益生菌制剂在克罗恩病治疗中的应用** Guslandi<sup>[30]</sup>研究了酵母菌对克罗恩病缓解治疗中的作用, 结果表明酵母菌对克罗恩病的缓解有较好的协同疗效。Guandalini<sup>[31]</sup>对鼠李糖乳酸杆菌在儿科领域中对克罗恩病的治疗作用进行了研究, 发现其同样具有显著效果。另外, 非致病的*E.coli* Nissle 1917相对于安慰剂也能更有效地抑制克罗恩病<sup>[19]</sup>。对于益生菌治疗克罗恩病的机制主要来源于对动物疾病模型的研究, 可能的机制包括益生菌对黏膜内T淋巴细胞的调节以及控制对外源菌发挥效应的黏膜细胞因子的转运<sup>[32,33]</sup>。

### 2.3 益生菌制剂在治疗腹泻中的应用

**2.3.1 益生菌治疗儿童腹泻:** 儿童的急性腹泻主要是因为感染了轮状病毒。在婴儿配方奶粉的标准中, 双歧杆菌嗜热链球菌结合, 被证实可以降低轮状病毒腹泻的发病率<sup>[34]</sup>。鼠李糖乳杆菌被人们反复证实能够减少腹泻持续时间约50%。虽然该作用机制暂时还未被充分了解, 但是, 有可能涉及到黏膜的完整性被增强或者激发了免

疫应答反应, 比如通过增加免疫球蛋白IgA<sup>[35]</sup>. 通过喂养研究展示, 鼠李糖乳杆菌既能减少腹泻的发病率也不影响安慰剂的水平<sup>[36]</sup>. 研究证明, 双歧杆菌能抑制痢疾杆菌、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌等, 对治疗小儿细菌性腹泻、重症急性细菌性肠炎、UC、伪膜性肠炎、菌痢、霉菌性肠炎、糖尿病性腹泻、顽固性难治腹泻均有良好的疗效, 对各种肠炎及腹泻疗效均在90%以上<sup>[37-41]</sup>. 李玉娟等<sup>[42]</sup>认为, 益生菌制剂具体应用时应根据临床特点和每一种益生菌制剂的生物特性来选择药物. 临床治疗时, 如需给患儿建立正常的肠道菌群或者治疗儿童腹泻、消化不良, 可选用活菌复合制剂, 因其含有多维乳酸菌, 既能调整肠道菌群、助消化, 又能提供多种维生素和微量元素.

**2.3.2 益生菌治疗抗生素引起的腹泻和旅行者腹泻:** 经抗生素治疗的患者大约有20%会引发腹泻, 这是由于抗生素可能通过抑制肠道微生物定植和促进病原微生物生长的方式直接影响肠道微生物的组成, 如艰难梭菌和产酸克雷伯菌. 益生菌对于降低运用抗生素以从胃中根除幽门螺杆菌引发的“三重治疗”的不良反有很好的效果. 如: 鼠李糖乳杆菌能降低腹泻、呕心以及味觉紊乱的发病率<sup>[43]</sup>. 有人证实了利用其他的益生菌包括嗜酸乳杆菌、双歧杆菌和乳链球菌也有类似的结果. Dupont<sup>[44]</sup>的研究表示, 利用鼠李糖乳杆菌能够降低旅行者的腹泻发病率. 但是此类研究还存在着一些问题和未知机制, 因为这种腹泻的发生不仅在与恶劣环境还有多种病原微生物, 包括致病性大肠杆菌、沙门氏菌、弯曲杆菌、志贺氏菌以及病毒等. 因此, 在体内运用单一的益生菌抑制如此广谱的病原微生物是不大可能的. 然而, 运用多种益生菌的组合以治疗旅行者腹泻的试验却大多以失败告终.

**2.4 益生菌制剂在其他疾病治疗中的应用** 在某些基层医院滥用抗生素的现象较为严重, 从而引起多种并发症, 如由幽门螺杆菌感染引起的肠黏膜炎症, 使得相关疾病治疗难度急剧增大. 研究者们已将滥用抗生素等问题提上了议事日程. 体外实验研究表明, 乳酸杆菌和双歧杆菌通过产生乳酸或释放细菌素可抑制幽门螺杆菌生长. 动物活体实验研究显示治疗前供给益生菌可减少幽门螺杆菌定植, 减轻黏膜炎症<sup>[45,46]</sup>. 益生菌可减少幽门螺杆菌对胃上皮细胞的黏附及IL-8释放, 从而稳定胃黏膜屏障功能减轻黏膜炎症. 益生菌刺激胃肠道免疫系统, 增强全身和黏

膜免疫反应, 其机制还可能与特异性刺激自然杀伤(natural killer, NK)细胞和先天性防御体系如防御素和IL-10等有关<sup>[47]</sup>. 如乳酸杆菌的硫酸脑昔脂结合蛋白能与幽门螺杆菌竞争结合幽门螺杆菌糖脂受体分子和硫酸脑昔脂, 有助于宿主防御幽门螺杆菌定植<sup>[48]</sup>. 在临床应用方面, 也有证据表明乳酸杆菌能抑制幽门螺杆菌感染, 减少复发的危险. 国外学者报道<sup>[49,50]</sup>, 丁酸梭菌能保持肠道内必需厌氧菌不被抗生素减少, 可逆转“三联”药物(阿莫西林、克拉霉素、雷贝拉唑)根除幽门螺杆菌治疗后大肠杆菌被克雷白菌和肠球菌取代的状况, 维持肠道正常的微生态平衡.

胡锦涛等<sup>[51]</sup>认为, 益生菌-中药复合制剂能恢复肠道微生态平衡, 降低内毒素, 可保护肝功能. 在胰腺炎治疗方面, 很多研究认为, 绝大多数患有胰腺炎的患者完全丢失了乳酸菌群, 但是所丢失的菌群可以通过补充相关的益生菌得以成功补偿<sup>[52,53]</sup>. 李咏梅等<sup>[54-56]</sup>在益生菌对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的辅助治疗作用研究中表示, 益生菌对肠道黏膜屏障有保护作用, 对SAP可能具有重要的辅助治疗作用. 临床研究报道, 采用乳酸杆菌制剂治疗急性胰腺炎可减轻患者的病症<sup>[57]</sup>. 使感染性坏死和脓肿等并发症的发生率显著降低<sup>[58,59]</sup>. 在应用益生菌制剂治疗全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)方面, Shimizu等<sup>[60,61]</sup>研究发现, SIRS患者口服含有益生菌的制剂后, 易感染的并发症比例下降并且病原菌的数目有所降低. 在SIRS的治疗研究中所应用的益生菌的益生机制可能是菌体能够黏附于肠道黏膜以建立肠壁屏障. 除此之外, 益生菌的DNA序列对先天免疫系统有广泛的活性, 这些序列称之为免疫刺激DNA序列或CpG基序, 已经证实其通过抗凋亡和抗炎机制而减轻实验性结肠炎. Jijon等<sup>[62]</sup>显示自益生菌中提取的DNA能抑制小鼠脾细胞NF- $\kappa$ B活化及P38蛋白激酶活性促炎症细胞因子的分泌, 并且减少肠黏膜TNF和干扰素 $\gamma$ 的分泌. 总之, 益生菌可能经多种不同的机制发挥抗炎及其他保护作用.

### 3 结论

近年来, 国内外已开发了许多益生菌制剂, 以适用于不同人群及各种疾病. 其中, 在肠道疾病治疗中的应用最为广泛, 并且在临床应用中暂没有负面的病例出现. 益生菌治疗能调节受体增

#### ■创新盘点

本文概括了益生菌制剂在多种肠病治疗中的应用实例, 并分析了可能的作用机制.

### ■应用要点

本文阐明益生菌制剂在肠病治疗中的作用,有望为肠病的治疗提供依据,并开发新的药物。

效剂的表达并且能降低TNF- $\alpha$ 的产生,这对于慢性疾病尤其是肝病以及其他急性病都是一种便捷有力的工具。益生菌用于调整动物体内独特的肠道菌群平衡及改善病症变的越来越必要。但目前有关益生菌治疗疾病的研究依然不充分,主要体现在:作用机制、疗效维持时间、多种益生菌组合治疗及数据统计等方面。因此,我们需要对益生菌的益生机制有更多的了解,对相关疾病的治疗做更长期的调查研究,以及研究者在临床上的不断探索,为将来开发多种高效的益生菌制剂奠定理论基础和实践经验。

### 4 参考文献

- 肖平, 吕嘉彬, 沈文. 益生菌的保健功能及其在食品中的应用概述. *食品科技* 2009; 34: 23-26
- 洪黎民. 微生物学及微生态制剂. *水产科技情报* 2006; 33: 208-211
- 王敏, 占秀安, 潘晓东. 提高益生菌作用效果的研究进展. *中国畜牧杂志* 2007; 43: 45-47
- Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000; 1: 13-24
- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S39-S49
- 钟燕, 黄承钰, 何涛, Harmsen HMJ, Vonk RJ. 益生菌和酸奶对乳糖不耐受者结肠菌群作用研究. *卫生研究* 2006; 35: 587-591
- Bengmark S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 833-848
- Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 426-430
- Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr Res Rev* 2000; 13: 229-254
- Viljanen M, Pohjavuori E, Haahtela T, Korpela R, Kuitunen M, Sarnesto A, Vaarala O, Savilahti E. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1254-1259
- 诸琦, 崔英. 微生态疗法与炎症性肠病. *中国实用内科杂志(临床版)* 2006; 26: 974-976
- Douglas LC, Sanders ME. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J Am Diet Assoc* 2008; 108: 510-521
- Bengmark S, Martindale R. Prebiotics and synbiotics in clinical medicine. *Nutr Clin Pract* 2005; 20: 244-261
- 梁生林, 唐志鹏. 益生菌制剂在溃疡性结肠炎治疗中的作用. *中国新药与临床杂志* 2006; 25: 449-452
- Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003; 52: 988-997
- Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959-50965
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591
- 霍丽娟, 赵和平. 益生菌对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜中IL-1和TNF- $\alpha$ 表达的影响. *山西医科大学学报* 2004; 35: 341-343
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635-639
- Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 817-822
- Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 697-698
- Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-249
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53: 108-114
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546
- Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Voudouris A, Kazamias P, Eleftheriadis E. Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial. *World J Surg* 2006; 30: 1848-1855
- Spindler-Vesel A, Bengmark S, Vovk I, Cerovic O, Kompan L. Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007; 31: 119-126
- Bengmark S. Synbiotics to strengthen gut barrier function and reduce morbidity in critically ill patients. *Clin Nutr* 2004; 23: 441-445
- Tooley KL, Howarth GS, Lymn KA, Lawrence A, Butler RN. Oral ingestion of streptococcus thermophilus diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 593-600
- Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1521-1525
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1462-1464
- Gandalini S. Use of *Lactobacillus-GG* in paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002; 34 Suppl 2: S63-S65
- Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 107-115
- Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti PJ, Pédrón T. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 1228-1237



- 34 Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344: 1046-1049
- 35 Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr* 2005; 24: 339-352
- 36 Marteau P, Seksik P, Jian R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S51-S57
- 37 刘谦典, 李长虹, 刘鹭. 微生态制剂的作用机理与临床应用. *中国医院药学杂志* 1998; 18: 280-281
- 38 Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 59-65
- 39 Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schöpfer H, Böckler HM, Wells J. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 36-42
- 40 Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 371-378
- 41 Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 809-818
- 42 李玉娟, 林芸竹, 曹幼红, 周凤, 张伶俐. 微生态制剂在治疗小儿腹泻中的应用. *华西药学杂志* 2007; 22: 716-717
- 43 Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V, Cammarota G, Anti M, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169
- 44 DuPont HL. *Lactobacillus GG* in Prevention of Traveler's Diarrhea: An Encouraging First Step. *J Travel Med* 1997; 4: 1-2
- 45 Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D, Bielanski W, Kwiecien S, Konturek SJ, Stachura J, Pawlik WW, Hahn EG. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2006; 11: 10-20
- 46 Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1077-1086
- 47 杨昭徐. 益生菌防治幽门螺杆菌感染的作用. *中华消化杂志* 2006; 26: 850-851
- 48 Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658-672
- 49 Di Mario F, Cavallaro LG, Scarpignato C. 'Rescue' therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis* 2006; 24: 113-130
- 50 Canducci F, Cremonini F, Armuzzi A, Di Caro S, Gabrielli M, Santarelli L, Nista E, Lupascu A, De Martini D, Gasbarrini A. Probiotics and *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Liver Dis* 2002; 34 Suppl 2: S81-S83
- 51 胡锦涛, 张奇志, 吴力克, 张娟, 杨舸, 王宇明. 益生菌-中药复合制剂对大鼠急性肝损伤模型的保护作用. *山东医药* 2007; 47: 28-29
- 52 原庆, 王惠吉. 微生态制剂对肝硬化并发症的治疗作用. *北京医学* 2005; 27: 115-117
- 53 邵祥稳, 张庆华, 刘占海. 微生态调节剂治疗肝硬化自发性腹膜炎临床研究. *中华医院感染学杂志* 2002; 12: 677-678
- 54 李咏梅. 益生菌辅助治疗重症急性胰腺炎14例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 302-304
- 55 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 953-957
- 56 秦环龙, 苏振东, 范小兵, 杭晓敏. 益生菌对急性胰腺炎大鼠肠道微生态及紧密连接的影响. *中国临床营养杂志* 2006; 14: 82-86
- 57 Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 464-468
- 58 Kecskés G, Belágyi T, Oláh A. [Early jejunal nutrition with combined pre- and probiotics in acute pancreatitis--prospective, randomized, double-blind investigations]. *Magy Seb* 2003; 56: 3-8
- 59 Giamarellou-Bourboulis EJ, Bengmark S, Kanellakopoulou K, Kotzampassi K. Pro- and synbiotics to control inflammation and infection in patients with multiple injuries. *J Trauma* 2009; 67: 815-821
- 60 Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Matsushima A, Tasaki O, Fujita K, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Synbiotics decrease the incidence of septic complications in patients with severe SIRS: a preliminary report. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1071-1078
- 61 Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Yoshiya K, Matsushima A, Sumi Y, Kuwagata Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS. *J Trauma* 2006; 60: 126-133
- 62 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-1373

#### 同行评价

本文内容全面, 使读者能全面了解益生菌制剂在肠病治疗中的应用价值。

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

# $\beta$ -榄香烯对人胃癌SGC7901/Adr细胞ERK通路的活化和GST- $\pi$ 表达的影响

张晔, 曲秀娟, 刘云鹏, 侯科佐, 刘静

## ■背景资料

研究表明 $\beta$ -榄香烯能够诱导细胞凋亡和分化、逆转肿瘤多药耐药、抗肿瘤转移和血管生成、与放疗联合增敏, 同时不良反应小, 因此应用前景较好。

张晔, 曲秀娟, 刘云鹏, 侯科佐, 刘静, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001  
国家自然科学基金资助项目, No. 30901736  
辽宁省教育厅一般基金资助项目, No. L2010641  
中国医科大学附属第一医院科学研究基金资助项目, No. fsh1002  
作者贡献分布: 此课题由刘云鹏与曲秀娟设计; 研究过程由张晔与刘静操作完成; 研究所用试剂及分析工具由侯科佐提供; 数据分析由张晔完成; 本论文写作由张晔完成。  
通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科。  
cmuliuyunpeng@yahoo.cn  
电话: 024-83282312 传真: 024-83282543  
收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-04-15  
接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-05-08

## Treatment with $\beta$ -elemene inhibits ERK activation and down-regulates GST- $\pi$ expression in human gastric cancer cell line SGC7901/Adr

Ye Zhang, Xiu-Juan Qu, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Jing Liu

Ye Zhang, Xiu-Juan Qu, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Jing Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901736; the Scientific Research Foundation of Liaoning Provincial Education Department, No. L2010641; and the Scientific Research Fund of the First Hospital of China Medical University, No. fsh1002

Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, 155 North Nanjing Avenue, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn

Received: 2011-03-09 Revised: 2011-04-15

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of treatment with  $\beta$ -elemene on the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and expression of glutathione transferase- $\pi$  (GST- $\pi$ ) in human gastric cancer cell line SGC7901/Adr.

**METHODS:** After SGC7901/Adr cells were treated with different concentrations of  $\beta$ -elemene for different durations, cell proliferation was mea-

sured by MTT assay, and protein expression was detected by Western blot. All experimental data were analyzed with the SPSS 13.0 software package.

**RESULTS:**  $\beta$ -elemene inhibited the proliferation of SGC7901/Adr cells in a time-dependent manner. The half maximal inhibitory concentrations of  $\beta$ -elemene at 24, 48, and 72 h in SGC7901/Adr cells were 53.48, 28.78 and 14.78 mg/L, respectively. In untreated control cells, ERK was basically phosphorylated. Treatment with  $\beta$ -elemene (50 mg/L) for 24 h significantly decreased the expression of phosphorylated ERK and GST- $\pi$  in SGC7901/Adr cells.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -elemene could inhibit the activation of the ERK signaling pathway and thereby down-regulate the expression of GST- $\pi$  in SGC7901/Adr cells.

**Key Words:**  $\beta$ -elemene; Gastric cancer; Extracellular signal-regulated kinase; Glutathione transferase- $\pi$

Zhang Y, Qu XJ, Liu YP, Hou KZ, Liu J. Treatment with  $\beta$ -elemene inhibits ERK activation and down-regulates GST- $\pi$  expression in human gastric cancer cell line SGC7901/Adr. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1394-1397

## 摘要

**目的:** 探讨 $\beta$ -榄香烯对人胃癌细胞SGC7901/Adr细胞外信号调节激酶(ERK)通路的活化和谷胱甘肽转移酶 $\pi$ (GST- $\pi$ )表达的影响。

**方法:** MTT法检测细胞的药物敏感性, Western blot检测蛋白表达, 应用SPSS13.0进行统计学分析。

**结果:**  $\beta$ -榄香烯以时间依赖的方式抑制SGC7901/Adr细胞增殖, 24、48和72 h的 $IC_{50}$ 浓度分别为53.48、28.78和14.78 mg/L。对照组即有ERK的磷酸化, 50 mg/L的 $\beta$ -榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 明显下调了ERK的磷酸化水平, 同时GST- $\pi$ 蛋白的表达显著下调。

## ■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

**结论:**  $\beta$ -榄香烯通过抑制胃癌细胞SGC7901/Adr中ERK信号转导通路的活化, 进而下调了GST- $\pi$ 蛋白的表达。

**关键词:**  $\beta$ -榄香烯; 胃癌; 细胞外信号调节激酶; 谷胱甘肽转移酶 $\pi$

张晔, 曲秀娟, 刘云鹏, 侯科佐, 刘静.  $\beta$ -榄香烯对人胃癌SGC7901/Adr细胞ERK通路的活化和GST- $\pi$ 表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1394-1397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1394.asp>

## 0 引言

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率居我国消化系统恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>. 多数患者在诊断时已经是晚期, 5年生存率只有10%左右. 尽管化疗药物的应用使晚期患者的生存期有所提高, 但中位总生存时间仍然不超过1年<sup>[2]</sup>. 榄香烯是从中药莪术中提取的抗癌药物,  $\beta$ -榄香烯是其主要活性成分, 属非细胞毒性药物. 目前研究表明 $\beta$ -榄香烯能够诱导细胞凋亡和分化<sup>[3]</sup>、逆转肿瘤多药耐药<sup>[4,5]</sup>、抗肿瘤转移和血管生成<sup>[6]</sup>、与放化疗联合增敏<sup>[7,8]</sup>, 同时不良反应小, 因此应用前景较好. 本实验旨在探讨 $\beta$ -榄香烯对人胃癌SGC7901/Adr细胞细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路的活化和谷胱甘肽转移酶 $\pi$ (glutathione transferase- $\pi$ , GST- $\pi$ )表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\beta$ -榄香烯( $\beta$ -elemene)购于大连金港制药有限公司, RPMI 1640培养基购自Gibco公司, 胎牛血清购自天津血液病研究所. 鼠抗人GST- $\pi$ 和兔抗人 $\beta$ -Actin抗体购自Santa Cruz公司, 兔抗人磷酸化ERK(p-ERK)和ERK抗体购自Cell Signaling公司. 辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, ECL试剂盒购自PIERCE公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 胃癌耐药细胞SGC7901/Adr由中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化病研究所惠赠, 在含100 mL/L胎牛血清、12 kU/L庆大霉素、含1 mg/L阿霉素的RPMI 1640培养液中, 37 °C、饱和湿度及50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵育箱内传代培养, 2.5 g/L胰酶消化液消化传代, 2-3 d传代1次, 实验前2 wk将细胞置于无阿霉素的培养基中培养。

**1.2.2 MTT法进行细胞活力检测:** 取对数生长期

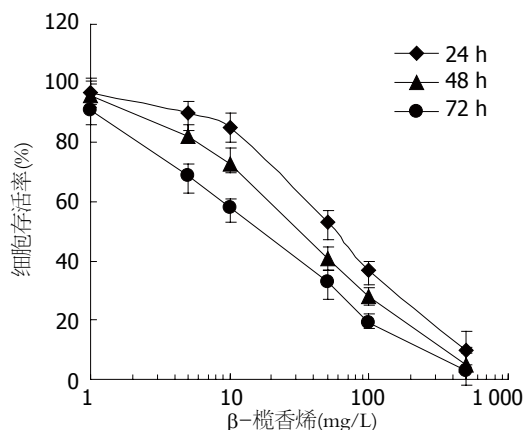


图1  $\beta$ -榄香烯对SGC7901/Adr细胞活力的影响。

细胞接种于96孔板, 培养12 h后分别加入不同浓度的 $\beta$ -榄香烯, 每组设3个复孔, 每孔终体积为200 mL. 培养24、48、72 h后每孔加入MTT溶液(5 g/L)25  $\mu$ L, 继续孵育4 h后吸去上清, 每孔加入200  $\mu$ L DMSO, 振荡摇匀. 用酶标仪于570 nm波长条件下测定吸光度值。

**1.2.3 Western blot检测蛋白表达:** 取对数生长期细胞接种于6孔板, 收集不同处理组作用24 h的SGC7901/Adr细胞, 将其裂解于200  $\mu$ L含有蛋白酶抑制剂(100 mg/L PMSF, 2 mg/L Aprotinin)的裂解液中[1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>], 4 °C裂解40 min, 15 000 r/min离心20 min, 取上清, Bradford法进行蛋白定量. 与3 $\times$ 样品缓冲液混合后, 煮沸5 min. 将样品在10%的SDS-聚丙烯酰胺胶中进行电泳3 h, 然后转印至硝酸纤维素膜上. 用5%脱脂牛奶封闭1 h后, 分别加入一抗, 4 °C过夜. TTBS洗4次后加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温作用30 min, ECL法显色, GIS凝胶图像分析系统照相并分析处理。

**统计学处理** 所有数据均为3次独立实验结果, 以mean $\pm$ SD表示. 采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析. 两组之间比较采用t检验,  $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1  $\beta$ -榄香烯对SGC7901/Adr细胞活力的影响** 1-500 mg/L的 $\beta$ -榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24、48、72 h, 结果显示 $\beta$ -榄香烯以时间依赖的方式抑制SGC7901/Adr细胞活力, IC<sub>50</sub>浓度分别为53.48、28.78、14.78 mg/L(图1)。

**2.2  $\beta$ -榄香烯对SGC7901/Adr细胞ERK磷酸化**

### ■ 相关报道

Tsai等研究发现大蒜提取物通过活化ERK通路, 增强AP-1与GST- $\pi$ 基因的结合, 诱导结肠癌细胞中GST- $\pi$ 蛋白的表达, 抑制ERK活性后, 下调GST- $\pi$ 蛋白表达。

### ■ 创新盘点

本实验证实 $\beta$ -榄香烯通过抑制ERK信号通路的活化, 可下调GST- $\pi$ 蛋白表达, 进而可能增强铂类药物对胃癌细胞的杀伤作用。

### ■应用要点

中西医结合治疗是肿瘤治疗今后发展的方向,如何提高敏感性和特异性是亟待解决的问题之一。本研究为临床上联合β-榄香烯与铂类化疗药物治疗胃癌提供了分子理论基础。

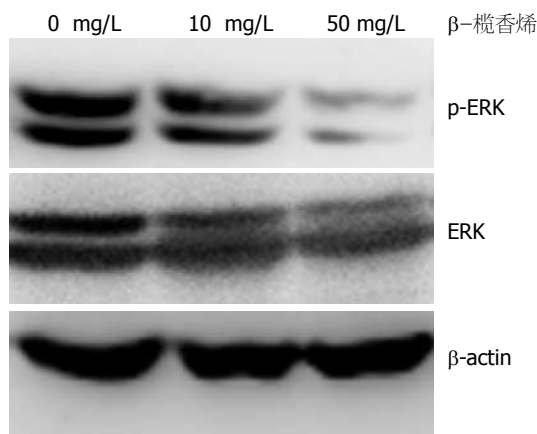


图2 β-榄香烯作用SGC7901/Adr细胞24 h后, p-ERK、ERK蛋白的表达。

的影响 用10 mg/L和50 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 检测ERK的磷酸化状态。结果显示, 对照组SGC7901/Adr细胞即有ERK的磷酸化, 50 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 明显下调了ERK的磷酸化水平, 从而抑制了ERK信号转导通路(图2)。

2.3 β-榄香烯对SGC7901/Adr细胞GST-π表达的影响 用10、50 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 检测GST-π蛋白的表达。结果显示, 10 mg/L的β-榄香烯处理组较对照组细胞相比, GST-π蛋白的表达显著下调; 50 mg/L的β-榄香烯处理组进一步下调了GST-π的表达(图3)。

### 3 讨论

ERK是一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 是传递丝裂原信号的信号转导蛋白, 正常定位在胞质, 当激活后转位到胞核, 调节转录因子活性, 控制着细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应<sup>[9-11]</sup>。在许多人类肿瘤中(如乳腺癌、黑色素瘤等)都可以发现ERK的过度激活, 目前, 很多学者正在寻找针对ERK途径中各个环节的抑制物以切断信号转导途径, 从而达到治疗肿瘤的目的, 一些实验结果显示这种治疗手段不良反应小而明显优于传统的化疗<sup>[12,13]</sup>。

榄香烯是我国自行研发的抗肿瘤新药, 其主要成分是β-榄香烯。主要作用为: 抑制癌细胞DNA的合成; 增强T淋巴细胞亚群的功能; 对放疗引起的白细胞下降有一定的保护作用; 放疗协同作用; 缓解癌性疼痛; 改善微循环; 镇静作用等, 不良反应小, 适合临床应用。本研究探讨了β-榄香烯对人胃癌SGC7901/Adr细胞ERK通路的活化影响。首先检测了β-榄香烯

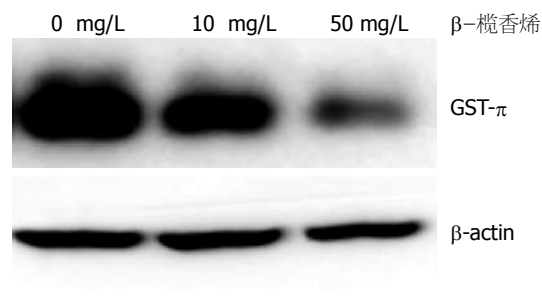


图3 β-榄香烯作用SGC7901/Adr细胞24 h后, GST-π蛋白的表达。

对SGC7901/Adr细胞活力的影响: 1-500 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24、48和72 h, 结果显示β-榄香烯以时间依赖的方式抑制SGC7901/Adr细胞活力, IC<sub>50</sub>浓度分别为53.48、28.78和14.78 mg/L。进一步选用10 mg/L和50 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 检测ERK的磷酸化状态。结果显示, 对照组SGC7901/Adr细胞即有ERK的磷酸化, 50 mg/L的β-榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 明显下调了ERK的磷酸化水平, 从而抑制了ERK信号转导通路。

GST-π是一种药物代谢酶, 通过催化还原型谷胱甘肽和多种亲电子化合物结合, 使其更具极性而加强药物的排出; 其次, GST-π可通过非酶结合的方式将细胞内的毒性化学药物排出, 从而达到解毒的目的。有研究学者<sup>[14]</sup>提出在氧化应激条件下肿瘤细胞启动细胞保护机制, 通过ERK通路的活化使转录因子NF-E2相关因子2磷酸化, 导致其与胞质蛋白伴侣分子Keap1蛋白的解离, 进入细胞核内与Maf家族蛋白形成杂二聚体与抗氧化剂反应元件结合从而促进GST-π的基因转录。此外, 研究发现大蒜提取物通过活化ERK通路, 增强AP-1与GST-π基因的结合, 诱导结肠癌细胞中GST-π蛋白的表达, 抑制ERK活性后, 下调了GST-π蛋白表达<sup>[15]</sup>。我们以往的研究证实<sup>[16]</sup>: ERK抑制剂PD98059作用胃癌BGC-823细胞24 h, p-ERK蛋白表达明显下调, GST-π蛋白表达亦明显下调, 同时伴有对顺铂的药物敏感性增加。因此我们用榄香烯处理SGC7901/Adr细胞24 h, 检测了GST-π蛋白的表达。结果显示, 10 mg/L的β-榄香烯处理组较对照组细胞相比, GST-π蛋白的表达显著下调; 50 mg/L的β-榄香烯处理组进一步下调了GST-π的表达。由此我们推测β-榄香烯通过抑制ERK信号通路的活化, 下调GST-π蛋白表达, 进而可能增强铂类药物对肿瘤细胞的杀伤作用。

中西医结合治疗是肿瘤治疗今后发展的方向, 如何提高敏感性和特异性是亟待解决的问题之一. 本研究为临床上联合 $\beta$ -榄香烯与铂类化疗药物治疗胃癌提供了分子理论基础.

志谢: 感谢“CSCO-金港榄香烯肿瘤学研究生课题启动奖励基金”对本实验的大力资助.

#### 4 参考文献

- Peng J, Wang Y. Epidemiology, pathology and clinical management of multiple gastric cancers: a mini-review. *Surg Oncol* 2010; 19: e110-e114
- Fujii M, Kochi M, Takayama T. Recent advances in chemotherapy for advanced gastric cancer in Japan. *Surg Today* 2010; 40: 295-300
- Li QQ, Wang G, Zhang M, Cuff CF, Huang L, Reed E. beta-Elementene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis. *Oncol Rep* 2009; 22: 161-170
- Li X, Wang G, Zhao J, Ding H, Cunningham C, Chen F, Flynn DC, Reed E, Li QQ. Antiproliferative effect of beta-elementene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 894-904
- Li QQ, Wang G, Huang F, Banda M, Reed E. Antineoplastic effect of beta-elementene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 1018-1027
- Chen W, Lu Y, Wu J, Gao M, Wang A, Xu B. Beta-elementene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67: 799-808
- Zhao J, Li QQ, Zou B, Wang G, Li X, Kim JE, Cuff CF, Huang L, Reed E, Gardner K. In vitro combination characterization of the new anticancer plant drug beta-elementene with taxanes against human lung carcinoma. *Int J Oncol* 2007; 31: 241-252
- Rui D, Xiaoyan C, Taixiang W, Guanjian L. Elementene for the treatment of lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: CD006054
- Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2707-2719
- Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 726-731
- Kim WJ, Lee SJ, Choi YD, Moon SK. Decursin inhibits growth of human bladder and colon cancer cells via apoptosis, G1-phase cell cycle arrest and extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Mol Med* 2010; 25: 635-641
- Sánchez A, Setién F, Martínez N, Oliva JL, Herranz M, Fraga MF, Alaminos M, Esteller M, Rojas JM. Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas. *Oncogene* 2008; 27: 4969-4972
- Marampon F, Gravina GL, Di Rocco A, Bonfili P, Di Staso M, Fardella C, Polidoro L, Ciccarelli C, Festuccia C, Popov VM, Pestell RG, Tombolini V, Zani BM. MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 159-168
- Kim SG, Lee SJ. PI3K, RSK, and mTOR signal networks for the GST gene regulation. *Toxicol Sci* 2007; 96: 206-213
- Tsai CW, Chen HW, Yang JJ, Sheen LY, Lii CK. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1019-1026
- 荆薇, 张晔, 刘云鹏, 侯柯佐. ERK通路对胃癌细胞顺铂敏感性的调节作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2931-2935

#### ■同行评价

本文对榄香烯的抑癌作用提供了一定分子基础, 但新颖性一般.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

## 补托法对肝源性胃溃疡愈合质量的影响

扈晓宇, 张 扬, 白松林, 胡彰勇, 钟 森, 范昕建

### ■背景资料

近年来发现, 肝源性溃疡发病率可达20%-30%, 因其存在门静脉高压等病理基础, 故标准的抗酸治疗后有效率仅63.64%, 治愈后3 mo内肝源性胃溃疡复发率可达76.09%(35/46), 与普通溃疡有明显差别。

扈晓宇, 钟森, 成都中医药大学附属医院感染科 四川省成都市 610072

张 扬, 范昕建, 成都中医药大学 四川省成都市 610075

白松林, 成都中医药大学第二附属医院 四川省成都市 610041

胡彰勇, 成都医学院第一附属医院 四川省成都市 610500

四川省科技厅重大科技招标基金资助项目, No. 310312

作者贡献分布: 扈晓宇为此课题做主要贡献; 课题由扈晓宇、钟森及范昕建共同设计; 研究过程由扈晓宇、张 扬、白松林、胡彰勇、钟森及范昕建共同完成; 数据分析由扈晓宇完成; 本论文写作由扈晓宇与张 扬完成。

通讯作者: 扈晓宇, 副教授, 副主任医师, 610072, 四川省成都市, 成都中医药大学附属医院感染科. meddmail@yahoo.com.cn  
电话: 028-87765459

收稿日期: 2011-02-24 修回日期: 2011-04-20

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

### BuTuo method improves the quality of ulcer healing in patients with hepatogenic gastric ulcer

Xiao-Yu Hu, Yang Zhang, Song-Lin Bai,  
Zhang-Yong Hu, Sen Zhong, Xin-Jian Fan

Xiao-Yu Hu, Sen Zhong, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Yang Zhang, Xin-Jian Fan, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Song-Lin Bai, the Second Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Zhang-Yong Hu, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China

Supported by: the Major Scientific and Technological Research Program of Science and Technology Department of Sichuan Province, No. 310312

Correspondence to: Associate Professor Xiao-Yu Hu, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. meddmail@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-24 Revised: 2011-04-20

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of BuTuo method in improving the quality of ulcer healing in patients with hepatogenic gastric ulcer.

**METHODS:** This was a randomized controlled study. One hundred and forty-three patients with hepatogenic gastric ulcer who had blood

stasis due to Qi deficiency were randomly divided into two groups: experimental group and control group. The experimental group ( $n = 72$ ) was given TuoliTouNong Decoction, omeprazole and propranolol, while the control group ( $n = 71$ ) was treated with omeprazole and propranolol. The treatment lasted for 4 wk. The response rate, S2-stage shift rate, and short- and long-term recurrence rates were compared between the two groups.

**RESULTS:** After treatment, the total response rate achieved in the experimental group was significantly higher than that in the control group (95.83% vs 80.28%,  $Q = 4.260$ ,  $P < 0.05$ ). The S2-stage shift rate was also significantly higher in the experimental group than in the control group (82.69% vs 30.95%,  $\chi^2 = 25.826$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, long-term (6-mo) recurrence rate was significantly lower in the experimental group than in the control group (26.92% vs 47.62%,  $\chi^2 = 4.310$ ,  $P < 0.05$ ). No adverse effects were observed during the entire treatment course.

**CONCLUSION:** BuTuo method can significantly improve the quality of ulcer healing and reduce ulcer recurrence in patients with hepatogenic gastric ulcer.

**Key Words:** BuTuo method; Hepatogenic gastric ulcer; Healing quality; S2-stage shift rate; Recurrence rate of ulcer

Hu XY, Zhang Y, Bai SL, Hu ZY, Zhong S, Fan XJ. BuTuo method improves the quality of ulcer healing in patients with hepatogenic gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1398-1402

### 摘要

**目的:** 探讨补托法治疗肝源性胃溃疡愈合质量的临床疗效及安全性。

**方法:** 采用随机对照的方法, 将中医辨证属于气虚血瘀证的肝源性胃溃疡患者随机分成治疗组和对照组, 治疗组72例患者给予补托法代表方“托里透脓汤”+奥美拉唑+心得安治疗; 对照组71例患者给予奥美拉唑+心得安治疗,

### ■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

疗程均为4 wk. 观察两组肝源性胃溃疡患者的临床有效率, S2期获得率和近期、远期复发率.

**结果:** 在“标准疗程”结束后, 治疗组和对照组临床总有效率分别为95.83%(69/72)、80.28%(57/71), 差异显著( $q = 4.260, P < 0.05$ ); S2获得率分别为82.69%(43/52)、30.95%(13/42), 差异显著( $\chi^2 = 25.826, P < 0.01$ ); 疗程结束6 mo后, 两组溃疡复发率分别为26.92%(14/52)、47.62%(20/42), 差异显著( $\chi^2 = 4.310, P < 0.05$ ). 治疗组治疗前后, 血、尿、大便常规、肝、肾功及心电图等检查, 均未见明显不良反应.

**结论:** 补托法可显著提高肝源性胃溃疡的愈合质量、改善近期疗效、降低溃疡的复发, 安全有效.

**关键词:** 补托法; 肝源性胃溃疡; 愈合质量; S2期获得率; 溃疡复发率

扈晓宇, 张扬, 白松林, 胡彰勇, 钟森, 范昕建. 补托法对肝源性胃溃疡愈合质量的影响. 世界华人消化杂志. 2011; 19(13): 1398-1402  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1398.asp>

## 0 引言

肝硬化合并消化性溃疡被称为肝源性溃疡(hepatogenic ulcer, HU), 是肝硬化门脉高压患者发生消化道出血的三大原因之一, 仅次于食管胃底静脉曲张破裂和胃黏膜病变出血, 其发病率占肝硬化患者的18.6%-49.2%, 大约是正常人群的2-3倍<sup>[1,2]</sup>. 近年来的研究表明, 消化性溃疡愈合质量的好坏与溃疡复发密切相关, 改善溃疡愈合质量可减少溃疡复发<sup>[3-5]</sup>. 肝源性胃溃疡是消化性溃疡的一种特殊类型, 发生率高, 发病机制不明, 采用“标准疗法”后溃疡愈合质量差, 容易复发, 这一诊疗难题长期无法解决. 2006-05/2009-10, 我们应用中医补托法联合奥美拉唑、心得安治疗肝源性胃溃疡, 以观察补托法对提高肝源性胃溃疡的愈合质量、并减少其复发的临床疗效及安全性, 现将内容报道如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 患者均经临床确诊为慢性乙型肝炎肝硬化, 同时符合肝硬化气虚血瘀证的中医证候诊断标准<sup>[6]</sup>: 疲倦乏力、食欲不振、肝区不适、或胀或痛、面色晦暗、舌质暗红、舌下静脉曲张、脉细涩等; 内镜下均见活动性胃溃疡, 且溃

疡直径 $\geq 0.5$  cm符合入选标准的患者, 全部病例均为成都中医药大学附属医院住院患者, 均在24-72 h内胃镜确诊溃疡在A1期; 患者签署临床试验知情同意书. 病例排除标准: (1)既往有胃溃疡病史; (2)TBIL  $> 54 \mu\text{mol/L}$ , 诊断为慢性乙型肝炎重型或有重型肝炎倾向者; (3)合并严重的心血管、肾、内分泌、血液系统、神经系统疾病及精神病患者; (4)酒精性、药物性、感染性、遗传性、免疫性、其他病毒性肝脏疾病; (5)妊娠、哺乳期妇女; (6)肝功能按Child-Push分级为C级的患者; (7)近1 mo内服用抗生素、非甾体抗炎药, 2 wk内服用抑酸药及胃黏膜保护剂. 病例剔除标准: 未按规定用药和观察, 或因非药物因素而中断治疗, 无法判断疗效, 或因资料不全, 影响疗效和安全性判断者.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 采用随机、平行对照方法进行试验, 按患者就诊的先后顺序进行编号, 使用DPS统计软件的完全随机分组功能, 指定样本数为180, 随机分为试验组、对照组.

**1.2.2 给药方法及疗程:** 奥美拉唑20 mg, 每日1次; 心得安10 mg, 每日3次, 并适当调整心得安剂量至心率下降约25%, 但最低心率不低于60次/min; 托里透脓汤(见《医宗金鉴》卷六十三): 人参5 g, 白术15 g, 穿山甲(炒, 研, 分吞)1.5 g, 白芷15 g, 升麻3 g, 生甘草10 g, 当归6 g, 生黄芪30 g, 皂角刺10 g, 青皮15 g(炒). 用法: 用水600 mL, 煎至300 mL, 100 mL/次, 3次/d, 口服. 治疗组: 补托法(托里透脓汤)+奥美拉唑+心得安(补托法+西药标准治疗); 对照组: 奥美拉唑+心得安(西药标准治疗). 所有*H.pylori*阳性患者均给予丽珠胃三联(铋剂0.22 g+替硝唑0.5 g+克拉霉素0.25 g, 2次/d)治疗1 wk. 以上药物治疗4 wk为1个“标准疗程”.

**1.2.3 疗效判定:** 肝源性胃溃疡近期疗效评定: 参照《中药新药临床研究指导原则》中《中药新药治疗消化性溃疡的临床研究指导原则》疗效标准拟订<sup>[7]</sup>. 愈合: 溃疡灶愈合进入瘢痕期, 疼痛消失; 有效: 溃疡灶缩小 $1/2$ 以上, 苔膜变薄, 疼痛明显减轻; 无效: 溃疡灶缩小 $< 1/2$ 或无变化, 疼痛无改善. 肝源性胃溃疡愈合质量的评价: 判断标准采用日本内镜判断溃疡的分期标准进行评估<sup>[8]</sup>. S1期: 原溃疡底部苔膜消失, 完全被红色上皮覆盖. 再生上皮红色, 呈向心性放射状排列. S2期: 再生上皮红色消失, 与周围黏膜颜色接近, 遗留白色瘢痕. 分别于疗程结束时、疗程结束

### ■ 研发前沿

补托法肇始于中医外科, 是中医外科消、托、补三大“外病内治”特色疗法范畴, 近年来其运用逐渐拓展到内科领域, 是补托法临床应用的创新、突破.

## ■相关报道

大量的临床资料证明中药可提高消化性溃疡愈合质量, 汤立东等以痛论治肝源性溃疡, 将120例肝源性溃疡患者按来诊顺序随机分为两组. 治疗组60例口服自拟中药消痈溃得康、奥美拉唑、心得安, 对照组60例予奥美拉唑、心得安口服. 两组均以4 wk为1个疗程, 共观察1个疗程. 结果: 治疗组总有效率为96.7%, 明显优于对照组的83.3% ( $P < 0.05$ ).

表 1 治疗组与对照组的疗效比较  $n(\%)$

分组	$n$	愈合	有效	无效	总有效
治疗组	72	52(72.22)	17(23.61)	3(4.17)	69(95.83) <sup>a</sup>
对照组	71	42(59.15)	15(21.13)	14(9.72)	57(80.28)
合计	143	94(65.73)	32(22.38)	17(11.89)	126(88.11)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

后3、6 mo进行胃镜的复查及随访.

1.2.4 安全性评价: 观察服药后受试者新出现的症状和体征(如皮疹、发热、腹泻、恶心、食欲不振等). 血、尿、大便常规、肝、肾功及心电图检查均于治疗前后各检查1次.

**统计学处理** 采用SPSS14.0进行分析, 计量资料用mean±SD表示, 用正态性检验、方差齐性检验、独立 $t$ 检验,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义; 计数资料用 $\chi^2$ 检验、Ridit分析,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 观察患者的一般情况

2.1.1 病例入组选择、删失及试验完成情况: 所有入组病例均符合入组条件审核, 无剔除病例. 按照试验方案, 入组病例158例, 删失15例, 其中治疗组7例, 对照组8例, 实际完成病例数143例, 删失率为9.5%. 11例删失的病例均系疗程完成后拒绝胃镜复查或随访者, 无法统计疗效, 故作为删失病例.

2.1.2 治疗前两组病例的比较: 在进入疗效统计的143例病例中, 治疗组(A组)72例, 其中男53例, 女19例. 年龄35-65(平均41.37±8.31)岁; 肝功能按Child-Push分级: A级40例, B级32例. *H.pylori*感染27例. 对照组(B组)71例, 其中男55例, 女16例. 年龄32-67(平均42.07±7.45)岁, 肝功能Child-Push分级: A级42例, B级29例. *H.pylori*感染25例. 两组年龄用正态性检验、方差齐性检验、独立 $t$ 检验, 性别、病情程度、*H.pylori*感染情况等用 $\chi^2$ 检验, 两组资料差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明两组资料具有可比性.

### 2.2 临床疗效分析

2.2.1 两组近期疗效比较: 治疗组总有效率为95.83%(69/72), 明显高于对照组的80.28%(57/71), 经Ridit法比较, 两者差异有统计学意义 ( $q = 4.297$ ,  $P < 0.05$ , 表1).

2.2.2 溃疡愈合及S2获得情况: 疗程结束后复查胃镜, 肝源性胃溃疡愈合率: 治疗组、对照组S2

表 2 治疗组与对照组的愈合质量  $n(\%)$

分组	$n$	S1期	S2期
治疗组	52	9(17.31)	43(82.69) <sup>a</sup>
对照组	42	29(69.05)	13(30.95)
合计	94	38(40.43)	56(59.57)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

期获得率分别为82.69%(43/52)、30.95%(13/42), 经 $\chi^2$ 检验比较, 两者差异有显著性意义 ( $\chi^2 = 25.826$ ,  $P < 0.01$ ). 治疗组、对照组愈合率分别为72.22%(52/72)、59.14%(42/71), 经 $\chi^2$ 检验比较, 两者差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.710$ ,  $P > 0.05$ , 表2).

2.2.3 溃疡复发情况: 疗程结束3 mo后复查胃镜, 肝源性胃溃疡复发率: 治疗组、对照组分别为21.15%(11/52)、21.43%(9/42), 经 $\chi^2$ 检验比较, 两者差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.540$ ,  $P > 0.05$ ); 疗程结束6 mo后复查胃镜, 肝源性胃溃疡复发率: 治疗组、对照组分别为26.92%(14/52)、47.62%(20/42), 经 $\chi^2$ 检验比较, 两者差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.310$ ,  $P < 0.05$ , 表3).

2.2.4 安全性及不良反应观察: 治疗组治疗后有恶心5例, 腹胀3例; 对照组治疗后有恶心4例, 腹胀5例, 此外, 试验过程中未发现其他与试验药物有关的不良反应症状, 均未停药自行缓解. 治疗组治疗前后, 进行了血、尿、大便常规、肝、肾功及心电图检查, 未见明显不良反应.

## 3 讨论

本研究结果表明, 采用补托法+奥美拉唑+心得安与奥美拉唑+心得安治疗肝源性胃溃疡4wk, 临床总有效率分别为95.83%(69/72)、80.28%(57/71); 肝源性胃溃疡S2获得率分别为82.69%(43/52)、30.95%(13/42); 治疗6 mo后肝源性胃溃疡复发率分别为26.92%(14/52)、47.62%(20/42), 提示: 采用补托法+奥美拉唑+心得安治疗肝源性胃溃疡, S2获得率、临床总有



表 3 治疗组与对照组愈合患者的溃疡复发率比较  $n(\%)$

分组	$n$	3 mo	6 mo
治疗组	52	11(21.15)	14(26.92) <sup>a</sup>
对照组	42	9(21.43)	20(47.62)
合计	94	20(21.28)	34(37.78)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

效率、治疗6mo后肝源性胃溃疡复发率均优于对照组, 差异有统计学意义.

肝源性胃溃疡是临床肝硬化上消化道出血的常见原因, 其形成机制复杂, 除与公认的胃酸、胃蛋白酶、胆汁、*H.pylori*等有关外, 还与门静脉高压致门脉淤血、肝硬化致动-静脉短路、肝硬化时的内毒素血症有关等<sup>[9]</sup>. 肝硬化门脉高压时胃壁毛细血管血流增加78%-100%, 黏膜下胃动、静脉短路使组织充血水肿, 但黏膜层血流减少; 削弱了黏膜防御因子的作用, 增加了对攻击因子的敏感性<sup>[10]</sup>. 肝功能减弱促胃液分泌物(胃泌素、组织胺、5-HT等)灭活减少, 使胃酸分泌亢进, 增加了胃、十二指肠酸负荷; 肝硬化时肠源性内毒素血症可增加内皮素-1的分泌, 进一步加重门静脉高压和循环高动力状态, 加剧门静脉淤血形成的恶性循环使黏膜糜烂形成溃疡等, 所以用治疗消化性溃疡的方法处理HU愈合率低、复发率高<sup>[11,12]</sup>. 从Tamawski等首次提出溃疡愈合质量的概念以来, 人们逐渐发现溃疡愈合质量是以溃疡复发有极大的相关性. 为了提高HU的溃疡愈合质量, 可以在进行*H.pylori*根除治疗<sup>[13]</sup>、使用质子泵抑制剂、降门脉高压治疗的同时, 可通过改善胃黏膜局部血液循环及增强胃黏膜屏障作用来促进溃疡愈合. 正常的胃黏膜血流是保持黏膜完整的重要因素, 胃黏膜血流灌注不足可以直接导致胃黏膜的损伤, 最终导致溃疡的发生及复发, 溃疡周围黏膜的血流灌注的增加, 可以使细胞的氧供增加进而加速黏膜修复和提高溃疡愈合质量<sup>[14]</sup>; 胃黏液具有保护胃黏膜的功能, 黏液-碳酸氢盐屏障是胃黏膜的第一道“防线”. 有研究证明, 益气健脾法可通过提高消化性溃疡患者的细胞和体液免疫功能, 减少H<sup>+</sup>的回渗而加强溃疡的修复和防止复发; 活血化瘀法能明显改善溃疡局部的微循环, 增加局部血流量及氧供, 从而加速溃疡愈合、提高溃疡愈合质量<sup>[15]</sup>.

肝源性胃溃疡的发病机制主要与肝硬化门静脉高压引起的胃黏膜屏障功能减弱有关, 另

外还与肝功能不全、内毒素血症、免疫调节失衡等有关. 现阶段治疗HU须遵循3个基本原则<sup>[1]</sup>: (1)抑酸治疗; (2)降门静脉高压治疗; (3)抗*H.pylori*治疗. 本研究采用质子泵抑制剂奥美拉唑抑制胃酸, 以减轻胃-十二指肠的酸负荷; 以普萘洛尔降门静脉高压治疗, 阻滞心脏 $\beta$ 受体, 减慢心率, 降低心排血量及内脏血量, 继而降低门静脉压力, 阻滞血管壁的 $\beta_2$ 受体及使 $\alpha$ 受体的兴奋性增高, 使内脏循环阻力增高, 内脏循环阻力增高使胃肠血流量减少, 门静脉压力下降, 改善门静脉高压患者胃黏膜的淤血状态; 丽珠胃三联抗*H.pylori*治疗, 以排除*H.pylori*对肝源性胃溃疡愈合质量的影响. 托里透脓汤出自《医宗金鉴》由人参、白术、炮山甲、白芷、升麻、甘草、当归、生黄芪、皂角刺、青皮组成, 具有益气健脾, 托里透邪、化瘀排脓的功效. 本方原为中医“外痈”正虚邪实而设, 本研究将其引入内科使用, 意在针对肝源性胃溃疡正虚邪实、血瘀肉腐之中医病机, 意在扶正解毒并施, 一则益气健脾以增强胃黏膜屏障作用, 二则活血化瘀改善溃疡局部的微循环, 正如古典文献所谓“托里则气壮而脾胃盛, 使脓秽自排, 毒气自解, 新肉自生, 饮食自进, 疮口自敛”(《外科正宗》). 方中炮山甲咸而微寒, 归肝、胃经, 有祛瘀散结, 消肿透脓的功效, 可使痈肿未成者消肿, 已成脓者速溃, 为治疗内痈、外痈的要药, 虽然《本草经疏》谓本品“痈疽已溃者不宜服”, 《现代中药大辞典》亦认为“气血不足、痈疽已溃者慎服.”但从历代临床应用来看, 不论疮痈溃与未溃, 正气虚与未虚均可通过配伍而应用, 并无禁忌<sup>[13]</sup>. 同时, 炮山甲功效具有双重性, 能通能塞, 能散能收. 既能破血, 又有收敛、止血、堵漏、补益的功效, 有报道其内服可以治疗溃疡性结肠炎所致下消化道出血, 消毒外用将其均匀撒在出血部位(包括小动脉出血)可治疗手术后(胃次全切、截肢等)出血. 收敛寓于行散, 走窜中见补塞, 相反相成, 止血而不留瘀, 软坚而能止血<sup>[16]</sup>. 皂角刺的功效和主治: 其功能消肿散结、拔毒透脓, 用于疮疡初期和脓熟不溃. 如《本草汇言》曰: “皂角刺, 拔毒祛风, 凡痈疽未成者, 能引之以消散; 将破者, 能引之以出头”, 说明其功为消散和透脓. 此外, 从皂角刺木质部分中提取的黄颜木素有较好的抗肝纤维化作用<sup>[17]</sup>. 两者相须为用, 共奏消肿散结和托毒透脓之功, 与其他补托生肌的中药联用治疗肝源性胃溃疡, 既符合肝硬化正虚血瘀

**■应用要点**  
补托法可显著提高肝源性胃溃疡的愈合质量、改善近期疗效、降低溃疡的复发, 安全有效.

### ■同行评价

本文选题较好,具有一定的临床实用性和潜在的临床推广应用价值。

的全身病机特点<sup>[18]</sup>,又符合A1期HU气虚邪实不能托毒外出的局部情况<sup>[19]</sup>。(1)“补托法+西药标准治疗”与“西药标准治疗”都是治疗肝源性胃溃疡的有效方法,在“标准疗程”结束后加用补托法的中西医结合治疗组对肝源性胃溃疡的总体疗效优于单纯的“西药标准治疗组”,两者差异有统计学意义( $P<0.05$ );(2)在“西药标准治疗”的基础上加用补托法可显著提高肝源性胃溃疡的愈合质量、有助于减少肝源性胃溃疡的复发;加用补托法与否并不影响“标准疗程”结束时肝源性胃溃疡的愈合率及“标准疗程”结束后3 mo胃溃疡的复发率,但可明显降低“标准疗程”结束后6 mo胃溃疡的复发率,两者差异有统计学意义( $P<0.05$ );(3)补托法治疗肝源性胃溃疡安全性良好:“标准疗程”到“标准疗程”结束后6 mo,均未发现明显的不良反应。

### 4 参考文献

- 1 龙会宝,王连源.肝源性胃溃疡的临床研究现状.新医学 2008; 39: 137-138, 140
- 2 刘伟,周贤,夏国栋.肝源性溃疡212例分析.现代实用医学 2010; 22: 389-390
- 3 周虹,吕农华.消化性溃疡并出血高危因素的研究进展.世界华人消化杂志 2010; 18: 3544-3547
- 4 Opoka W, Adamek D, Plonka M, Reczynski W, Bas B, Drozdowicz D, Jagielski P, Sliwowski Z, Adamski P, Brzozowski T. Importance of luminal and mucosal zinc in the mechanism of experimental gastric ulcer healing. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 581-591
- 5 Young Oh T, Ok Ahn B, Jung Jang E, Sang Park J, Jong Park S, Wook Baik H, Hahm KB. Accelerated Ulcer Healing and Resistance to Ulcer Recurrence with Gastroprotectants in Rat Model of Acetic Acid-induced Gastric Ulcer. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42: 204-214
- 6 中国中西医结合学会肝病专业委员会.肝纤维化中西医结合诊疗指南.中华肝脏病杂志 2006; 14: 866-870
- 7 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则.北京:中国医药科技出版社,2002: 143-151
- 8 陈灏珠,林果为.实用内科学.北京:人民卫生出版社,2009: 1986
- 9 McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, Triger DR. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut* 1985; 26: 1226-1232
- 10 乔冠恩,杨新利,李俊平,高欣光,车筑萍.肝源性溃疡患者胃黏膜防御屏障的研究.临床消化病杂志 2009; 21: 44-45
- 11 韦秋敏,梁列新.肝源性溃疡与门脉高压性胃病、肝功能关系的研究.广西医学 2009; 31: 1431-1432
- 12 廖化禹,房殿春,陈磊,孙永刚.肝源性溃疡83例临床分析.第三军医大学学报 2009; 31: 104, 112
- 13 Dore MP, Mura D, Deledda S, Maragkoudakis E, Pironti A, Realdi G. Active peptic ulcer disease in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: the role of Helicobacter pylori infection and portal hypertensive gastropathy. *Can J Gastroenterol* 2004; 18: 521-524
- 14 余勇.参附注射液对消化性溃疡愈合质量的影响观察.辽宁中医杂志 2009; 36: 1932-1933
- 15 陆凤鸣,李春婷.中医药提高消化性溃疡愈合质量的研究进展.河南中医 2009; 29: 30 6-308
- 16 雷载权,张廷模.中华临床中医学.北京:人民卫生出版社,1998: 1171
- 17 陈海霞,肖顺汉.皂角刺抗肿瘤作用有效成分研究进展.四川生理科学杂志 2010; 32: 35-37
- 18 洪艳,杨锐华,许晴,贾洪章,史小林.植物药洪天肝康防治肝硬化的作用机制.世界华人消化杂志 2009; 17: 17-23
- 19 汤立东,王垂杰.以痛论治肝源性溃疡疗效观察.中华中医药学刊 2010; 28: 944-945
- 20 王凯琴.肝源性溃疡46例临床分析.中原医刊 2003; 30: 7

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任:李军亮 2010-11-28)

# RASAL1基因在胃癌组织中的表达及其临床意义

夏挺松, 陈洪, 钱建忠, 徐洪明, 陆枫林

夏挺松, 东南大学附属江阴医院消化科 江苏省江阴市 214400  
陈洪, 陆枫林, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009  
钱建忠, 徐洪明, 东南大学附属江阴医院病理科 江苏省江阴市 214400  
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008301  
通讯作者: 陈洪, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院消化科.  
njchenhong66@yahoo.com.cn  
电话: 025-83272034  
收稿日期: 2011-02-13 修回日期: 2011-04-22  
接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Clinical significance of expression of RASAL1 in gastric cancer

Ting-Song Xia, Hong Chen, Jian-Zhong Qian, Hong-Ming Xu, Feng-Lin Lu

Ting-Song Xia, Department of Gastroenterology, Jiangyin People's Hospital, Medical College of Southeast University, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China  
Hong Chen, Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China  
Jian-Zhong Qian, Hong-Ming Xu, Department of Pathology, Jiangyin People's Hospital, Medical College of Southeast University, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. 2008301  
Correspondence to: Associate Professor Hong Chen, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. njchenhong66@yahoo.com.cn  
Received: 2011-02-13 Revised: 2011-04-22  
Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of Ras protein activator like 1 (RASAL1) in gastric cancer and to analyze its clinicopathological significance.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect RASAL1 expression in 50 cases of normal gastric tissue, 50 cases of low intraepithelial neoplasia, 50 cases of high intraepithelial neoplasia and early gastric carcinoma, and 50 cases of advanced gastric carcinoma. The correlation between RASAL1 expression and clinicopathological features of gastric cancer was then analyzed.

**RESULTS:** The positive rate of RASAL1 expression had significant differences among each group. The positive rate of RASAL1 expression was 94.0% (47/50) in normal gastric tissue, 70.0% (35/50) in low intraepithelial neoplasia, 42.0% (21/50) in intraepithelial neoplasia and early gastric carcinoma, and 18.0% (9/50) in advanced gastric carcinoma. The positive rate of RASAL1 expression was not correlated with sex, age, or tumor site, but was correlated with tumor size, differentiation, invasive depth and lymph node metastasis in high intraepithelial neoplasia and early gastric carcinoma and advanced gastric carcinoma (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Decreased expression of RASAL1 correlates with the development of gastric cancer. The lower expression of RASAL1 underlies bigger tumor size, lower degree of differentiation, deeper invasion, and more metastatic lymph nodes in patients with gastric cancer.

**Key Words:** Ras protein activator like 1; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Xia TS, Chen H, Qian JZ, Xu HM, Lu FL. Clinical significance of expression of RASAL1 in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1403-1407

## 摘要

**目的:** 探讨Ras蛋白激活物类似物-1(RASAL1)基因在胃癌组织中的表达情况及临床意义。

**方法:** 应用免疫组织化学SP法分别检测50例正常组织、50例低级别上皮内瘤变组织、50例高级别上皮内瘤变组织+早期胃癌组织及50例进展期胃癌组织中RASAL1基因的表达,并结合其临床病理资料进行综合分析。

**结果:** RASAL1基因在正常组、低级别上皮内瘤变组、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组的阳性率分别为94.0%(47/50)、70.0%(35/50)、42.0%(21/50)及18.0%(9/50),各组之间的差异有统计学意义(均 $P < 0.05$ );各组RASAL1基因的表达与性别、年龄、生长部位等均无相关性;高级别上皮内瘤变组织+早期胃癌组和进展期胃癌

## 背景资料

胃癌是我国发病率较高的恶性肿瘤之一,居消化系统恶性肿瘤的首位,明确其病因与发病机制、寻找早期诊断及有效药物靶点是医学研究领域的一个重要课题。目前已明确Ras基因家族活性异常增高是人类恶性肿瘤形成的关键因素之一,因而围绕Ras基因及其信号转导通路的研究一直是分子肿瘤学的研究热点。

## 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

RASAL1是近年新发现的基因,研究发现其功能失活可能与部分恶性肿瘤的发生发展有关,被认为是候选的抑癌基因.但迄今为止,有关RASAL1基因表达改变与胃癌关系的研究报告极少.

组中RASAL1基因的表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度及淋巴结转移有相关性(均 $P<0.05$ ).

**结论:** RASAL1基因的低表达与胃癌的发生及进展有密切关系,检测胃癌组织中RASAL1的表达可反映肿瘤大小、分化程度、浸润深度及有无淋巴结转移.

**关键词:** Ras蛋白激活物类似物-1; 胃癌; 免疫组织化学

夏挺松, 陈洪, 钱建忠, 徐洪明, 陆枫林. RASAL1基因在胃癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1403-1407

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1403.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,占全球癌症死亡原因的第2位,而我国属胃癌高发区,每年死于胃癌的患者居恶性肿瘤死亡原因的首位<sup>[1]</sup>.目前,对胃癌的发生发展机制研究虽取得了一定的进展,但具体分子机制仍不清楚. Ras蛋白激活物类似物-1(Ras protein activator like 1, RASAL1, 也称Ras GTP酶激活蛋白1, Ras GTPase-activating-like protein 1, Ras GAPs)基因是近年新发现的一种钙离子依赖性Ras活性调节基因,位于第12号染色体(12q24.13)<sup>[2]</sup>,其编码蛋白激活Ras GTP酶,继而使与Ras P21蛋白结合的GTP转变为GDP,使Ras P21蛋白失活,从而参与细胞的增殖、分化、凋亡. 迄今为止, RASAL1基因与胃癌的关系研究甚少. 本文以胃镜活检组织及胃癌手术标本为研究对象,检测组织中RASAL1基因的表达,探讨RASAL1基因在正常胃组织、低级别上皮内瘤变组织、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组织和进展期胃癌组织中的表达改变及其临床意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-01/2010-09行胃镜检查、治疗或外科手术治疗的病人,所有病例均有完整的病理资料和临床资料(性别、年龄、生长部位、肿瘤大小、淋巴转移、浸润深度及分化程度,术前未进行任何放疗及生物治疗. 正常组胃组织标本取自距胃癌组织边缘5 cm以上( $n = 50$ ); 低级别上皮内瘤变组均为胃镜下活检组织( $n = 50$ ); 高级别上皮内瘤变+早期胃癌组标本来源于胃镜下活检组织、内镜下黏膜切除术(endo-

scopic mucosal resection, EMR)、内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)及外科手术标本( $n = 50$ ); 进展期胃癌组标本均为外科手术标本( $n = 50$ ).

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色:** 利用免疫组织化学法检测RASAL1在4组标本中的表达. 病理组织蜡块经4  $\mu\text{m}$ 连续切片、常规脱蜡、微波低火抗原修复,分别作抗RASAL1免疫组织化学染色. 染色方法按免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物有限公司)说明书步骤进行; 一抗RASAL1羊抗人多克隆抗体购自英国Abcam公司,工作浓度为1:200; 二抗为兔抗羊IgG-HRP. 以正常山羊血清代替一抗作阴性对照.

**1.2.2 结果判断:** RASAL1阳性染色者在细胞胞质或(和)细胞膜有棕黄色颗粒沉着; 根据染色程度和染色细胞百分率进行评定和分析<sup>[3]</sup>: 基本不着色者为0分,着色淡者为1分,着色适中者为2分,着色深者为3分; 着色细胞占计数细胞的百分率阳性率 $\leq 5\%$ 记0分,6%-25%记1分,26%-50%记2分, $\geq 51\%$ 记3分. 将每张切片的染色程度与染色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分. 0-1分为阴性(-), 2-3分为弱阳性(+), 4-6分为中等阳性(++), >6分为强阳性(+++); 由两位高级职称病理医师无序2次重复阅片.

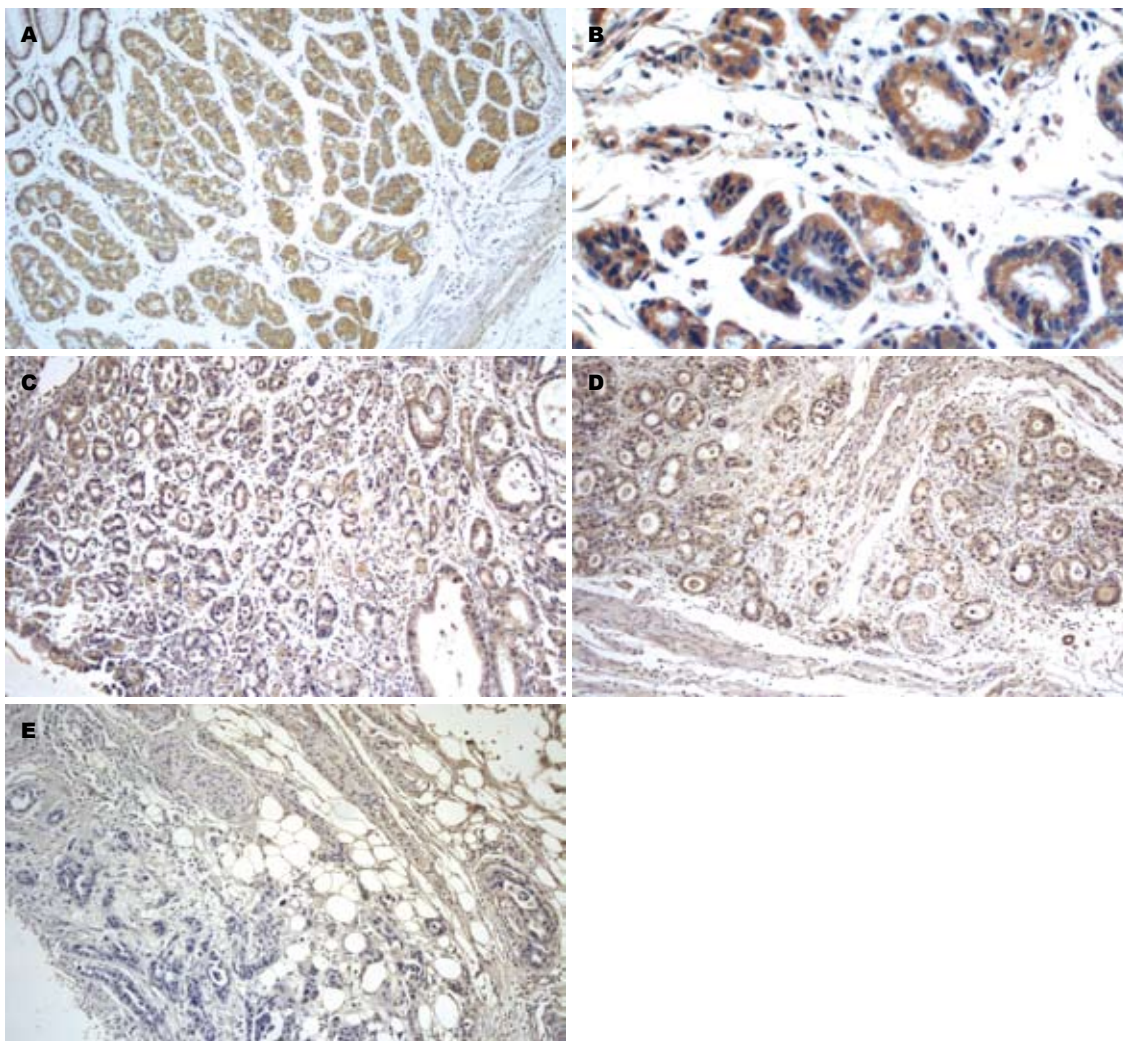
**统计学处理** 用SPSS13.5统计软件进行处理,计数资料采用两个(或多个)样本率比较的 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

免疫组织化学染色结果显示, RASAL1蛋白在正常组、低级别上皮内瘤变组、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组的阳性率分别为94.0%(47/50)、70.0%(35/50)、42.0%(21/50)及18.0%(9/50)(图1), 4组RASAL1蛋白的阳性率呈递减趋势,经两两比较及统计分析,显示各组之间差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ , 表1). 4组中强阳性的例数同样呈递减趋势,差异有统计学意义(均 $P<0.05$ ); 中度阳性的例数也呈递减趋势,但差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ); 弱阳性的例数各组间的差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ). 分析提示,各组RASAL1蛋白的表达与性别、年龄、生长部位等均无相关性(均 $P>0.05$ , 表2). 高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组中RASAL1蛋白的表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移均有明显相关性(均

### ■相关报道

Seto等报道,在10种胃癌细胞株中,有6种细胞株RASAL1的表达降低.



**■创新盘点**  
 本文应用免疫组化化学法检测RASAL1基因在正常组、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组的表达改变,并探讨其临床意义,目前在国内外尚无相关报道。

图 1 各组中RASAL1蛋白的表达(SP染色×100)。A: 正常胃黏膜组织RASAL1表达阳性+++; B: 低级别上皮内瘤变RASAL1表达阳性++; C: 高级别上皮内瘤变RASAL1表达阳性+; D: 早期高分化胃癌RASAL1表达阳性+; E: 进展期胃癌RASAL1表达阴性-。

表 1 各组中RASAL1蛋白的表达结果 n(%)

分组	强阳性(+++)	中度阳性(++)	弱阳性(+)	合计
正常组	32(64.0)	12(24.0)	3(6.0)	47(94.0)
低级别上皮内瘤变组	22(44.0)	8(16.0)	5(10.0)	35(70.0) <sup>a</sup>
高级别上皮内瘤变+早期胃癌组	10(20.0)	7(14.0)	4(8.0)	21(42.0) <sup>ac</sup>
进展期胃癌组	2(4.0)	3(6.0)	4(8.0)	9(18.0) <sup>ace</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常组; <sup>b</sup>P<0.05 vs 低级别上皮内瘤变组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 高级别上皮内瘤变+早期胃癌组。

P<0.05, 表3)。

### 3 讨论

癌基因不可逆的积累突变和失调是恶性肿瘤发生的重要分子机制,其中ras基因突变、过量表达与肿瘤发生发展的关系密切,一直受到人们的关注。ras是最早发现的人类原癌基因,编码相对分子量为21 000 Da的蛋白,即Ras蛋白,是一

类重要的功能蛋白,对细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程发挥重要调节作用。当Ras蛋白保持持续活化状态,则能激活下游的信号分子,造成细胞生长失控、无限制增殖,进而引起肿瘤的发生。近年研究表明,除了ras基因突变及过量表达,还存在着一些Ras蛋白活性调节因子,如Ras GAPs,这些Ras蛋白活性调节因子的功能缺失也会使得Ras蛋白活性异常增高,继而促进

### ■应用要点

本文检测了RAS-AL1基因在正常组、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组的表达情况,并分析其与胃癌临床病理特征的关系,为胃癌的早期诊断及治疗提供了新的思路。

表 2 胃癌组织中RASAL1蛋白表达与临床病理资料的关系

临床资料	正常组			低级别上皮内瘤变组			高级别上皮内瘤变+早期胃癌组			进展期胃癌组		
	n	阳性n(%)	P值	n	阳性n(%)	P值	n	阳性n(%)	P值	n	阳性n(%)	P值
性别												
男	35	33(94.3)	>0.05	27	19(70.4)	>0.05	31	13(41.9)	>0.05	33	6(18.2)	>0.05
女	15	14(93.3)		23	16(69.6)		19	8(42.1)		17	3(17.6)	
年龄(岁)												
>40	32	30(93.8)	>0.05	39	27(69.8)	>0.05	36	15(41.7)	>0.05	40	7(17.5)	>0.05
≤40	18	17(94.4)		11	8(72.7)		14	6(42.9)		10	2(20.0)	
标本部位												
胃底	9	8(88.9)	>0.05	7	5(71.4)	>0.05	10	4(40.0)	>0.05	12	2(16.7)	>0.05
胃体	26	25(96.2)		18	13(72.2)		13	6(46.2)		15	3(20.0)	
胃窦	15	14(93.3)		25	17(68.0)		27	11(40.7)		23	4(17.4)	

表 3 肿瘤组织中RASAL1蛋白表达与病理特征的关系

病理特征	高级别上皮内瘤变+早期胃癌组			进展期胃癌组		
	n	阳性n(%)	P值	n	阳性n(%)	P值
肿瘤直径(cm)						
<4	40	20(50.0)	<0.05	8	5(62.5)	<0.05
≥4	10	1(10.0)		42	4(9.5)	
分化程度						
高、中分化	28	19(67.9)	<0.05	16	7(43.8)	<0.05
低分化、印戒细胞	22	2(9.1)		34	2(5.9)	
浸润深度						
黏膜	32	18(56.3)	<0.05	0	0(0.0)	<0.05
黏膜下	18	3(16.7)		0	0(0.0)	
肌层	0	0(0.0)		22	7(31.8)	
浆膜及浆膜外	0	0(0.0)		28	2(7.1)	
淋巴结转移						
无	39	20(51.3)	<0.05	5	3(60.0)	<0.05
有	11	1(9.1)		45	6(13.3)	

肿瘤发生发展的可能性提高<sup>[4,5]</sup>。

Ras GAPs具有GTP酶活性,能将Ras蛋白结合的GTP水解成GDP而使Ras蛋白失活。因Ras GAPs缺失导致Ras活化进而引起恶性肿瘤的假说,已经在前列腺癌、乳癌、肺癌、肝癌、结肠癌等多种肿瘤中得到证实<sup>[6-8]</sup>。RASAL1作为Ras GAPs具有GTP酶活性,可使Ras蛋白失活,进而抑制肿瘤的发生发展,起到抑癌基因的作用<sup>[9]</sup>。正常情况下RASAL1基因在内分泌组织高表达,如肾上腺、唾液腺以及垂体;而在髓样细胞、肌肉、神经和基质组织中RASAL1呈低表达<sup>[10]</sup>。Jin等<sup>[2]</sup>的研究结果提示, RASAL1基因在多种正常组织可正常表达,而在鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、食管癌、淋巴瘤等6种肿瘤细胞株以及鼻咽癌、口腔鳞癌肿瘤组织中的表达均有

下调。进一步研究提示,肿瘤细胞株中RASAL1基因表达降低的机制与RASAL1基因启动子甲基化有关,基因启动子甲基化后该基因的功能被沉默,从而使Ras GTPs酶活性减弱,继而Ras活性上调<sup>[2,11]</sup>。因此, RASAL1基因及其编码蛋白具有肿瘤抑制功能。胃癌的发生同其他肿瘤一样,有癌基因的过度表达和/或抑癌基因的失活<sup>[12]</sup>。最近Seto等<sup>[13]</sup>通过免疫印迹法发现10个胃癌细胞系中有6个细胞系的RASAL1表达降低;通过基因转染使胃癌细胞RASAL1表达上调后,胃癌细胞的增殖减慢;同时还检测到所有RASAL1表达下调的细胞株均有RASAL1基因启动子的甲基化。研究结果说明了Ras信号通路在胃癌发生中的重要性。

WHO确定的胃黏膜上皮内瘤变分为低级别

和高级别, 低级别上皮内瘤变即传统的轻度及中度异型增生, 除非内镜活检偏离靶点造成漏诊, 经随访研究低级别上皮内瘤变转变成胃癌的几率较低<sup>[14]</sup>, 而高级别上皮内瘤变在病理学上包括重度异型增生及原位癌, 与胃癌关系极为密切, 其细胞肿瘤性与高分化癌无本质区别, 故本研究中将其与早期胃癌列为同组. 本研究提示, RASAL1基因在正常组、低级别上皮内瘤变组、高级别上皮内瘤变+早期胃癌组及进展期胃癌组的阳性率分别为94.0%、70.0%、42.0%及18.0%, 4组中RASAL1基因的阳性率呈递减趋势, 经两两比较及统计分析, 各组之间的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ). 据此我们推测RASAL1基因的低表达与胃癌的发生及进展有密切关系. 另外本研究还提示RASAL1蛋白表达与临床病理特征也有一定关系, 各组中RASAL1蛋白的表达情况与性别、年龄无相关性( $P>0.05$ ); 来源于胃体部的标本其阳性表达率高于来源于胃底及胃窦部的标本, 可能与胃体富含分泌功能的壁细胞有关, 但差异并无统计学意义( $P>0.05$ ). 在高级别上皮内瘤变+早期胃癌组和进展期胃癌组中, RASAL1基因的表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移均有明显相关性( $P<0.05$ ), 据此我们可推测肿瘤体积的增大、分化程度的降低、浸润深度的加深及淋巴转移的出现均可通过胃癌组织中RASAL1的表达下降表现出来.

本研究提示, RASAL1基因的表达下降在胃癌发生发展中起着重要的作用, 进一步深入研究RASAL1基因的分子功能可以为胃癌的早期诊断以及分子靶向治疗提供实验依据.

#### 4 参考文献

1 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1880

- 2 Jin H, Wang X, Ying J, Wong AH, Cui Y, Srivastava G, Shen ZY, Li EM, Zhang Q, Jin J, Kupzig S, Chan AT, Cullen PJ, Tao Q. Epigenetic silencing of a Ca(2+)-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12353-12358
- 3 张声, 林华, 李莉, 林建银. 胃癌淋巴转移相关因素的多元分析. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 399-402
- 4 Bernards A, Settleman J. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* 2005; 23: 143-149
- 5 Kupzig S, Deaconescu D, Bouyoucef D, Walker SA, Liu Q, Polte CL, Daumke O, Ishizaki T, Lockyer PJ, Wittinghofer A, Cullen PJ. GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins. *J Biol Chem* 2006; 281: 9891-9900
- 6 Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, Yano M, Ouchida M, Doihara H, Suzuki M, Chen H, Hsieh JT, Gazdar AF, Shimizu N. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2082-2089
- 7 Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, Dote H, Ouchida M, Hanabata T, Aoe M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N. Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers. *Int J Cancer* 2005; 113: 59-66
- 8 Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, Yano M, Ota T, Murakami M, Naito M, Toyota M, Gazdar AF, Shimizu N. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour. *Br J Cancer* 2005; 92: 1117-1125
- 9 Bernards A, Settleman J. Loss of the Ras regulator RASAL1: another route to Ras activation in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 46-48
- 10 Der CJ, Van Dyke T. Stopping ras in its tracks. *Cell* 2007; 129: 855-857
- 11 Ohta M, Seto M, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Mohri D, Asaoka Y, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Kanai F, Kawabe T, Omata M. Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression. *Gastroenterology* 2009; 136: 206-216
- 12 房静远. 胃癌发生中后生修饰的异常. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 749-752
- 13 Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K, Otsuka M, Hirata Y, Maeda S, Koike K, Omata M. Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 1293-1302
- 14 吴云林. 提高早期胃癌诊断水平的几项关键点. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 175-176

#### 同行评价

本文设计合理, 可读性较好, 有助于了解RASAL1在胃癌进展中的表达变化及可能的临床意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

# 糖尿病合并甲状腺功能减退患者胃排空能力与幽门螺杆菌感染率的变化

吴标良, 王民登, 周喜汉, 韦华, 何明杰

## ■背景资料

糖尿病常导致多种并发症, 胃轻瘫是其常见的并发症之一, 严重影响着患者的生活质量; 甲状腺功能减退是常见的甲状腺疾病, 消化不良是其常见的症状之一。临床上糖尿病合并甲状腺功能减退并不少见, 两者导致消化系统功能障碍的机制尚未完全明确。

吴标良, 王民登, 韦华, 何明杰, 右江民族医学院附属医院内分泌科 广西壮族自治区百色市 533000

周喜汉, 右江民族医学院附属医院消化科 广西壮族自治区百色市 533000

作者贡献分布: 此课题由吴标良设计; 王民登指导; 研究过程由吴标良、周喜汉、韦华及何明杰操作完成; 资料分析及统计由吴标良完成。

通讯作者: 王民登, 教授, 533000, 广西壮族自治区百色市中山二路18号, 右江民族医学院附属医院内分泌科。

yywangmd@163.com

电话: 0776-2855264, 0776-2836050

收稿日期: 2011-02-28 修回日期: 2011-04-20

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Changes in gastric emptying ability and *Helicobacter pylori* infection rate in patients with diabetes mellitus and hypothyroidism

Biao-Liang Wu, Min-Deng Wang, Xi-Han Zhou, Hua Wei, Ming-Jie He

Biao-Liang Wu, Min-Deng Wang, Hua Wei, Ming-Jie He, Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Xi-Han Zhou, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Min-Deng Wang, Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, 18 Zhongshan Road, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yywangmd@163.com

Received: 2011-02-28 Revised: 2011-04-20

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the changes in gastric emptying ability and *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection rate in patients with diabetes mellitus (DM) and hypothyroidism.

**METHODS:** Ninety-six subjects were divided into three groups: normal group ( $n = 30$ ), DM group ( $n = 45$ ), and DM plus hypothyroidism group ( $n = 21$ ). The digestive tract symptoms, gastric emptying time and *H.pylori* infection rate were compared among the three groups.

**RESULTS:** The grade of digestive tract symptoms, gastric half emptying time, and gastric emptying time were significantly higher in the DM plus hypothyroidism group than in the normal group and DM group ( $12.67 \pm 3.10$  vs  $4.30 \pm 2.65$ ,  $10.98 \pm 2.51$ ;  $35.00 \pm 8.83$  vs  $25.53 \pm 4.83$ ,  $29.76 \pm 9.54$ ;  $60.57 \pm 15.65$  vs  $45.53 \pm 10.33$ ,  $52.53 \pm 16.74$ , all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The rate of *H.pylori* infection was also significantly higher in the DM plus hypothyroidism group than in the other two groups (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Compared to normal controls and DM patients, DM patients with hypothyroidism had lower gastric emptying ability and higher *H.pylori* infection rate and were more susceptible to gastrointestinal dysfunction.

**Key Words:** Diabetes mellitus; Hypothyroidism; Gastric emptying; *Helicobacter pylori*

Wu BL, Wang MD, Zhou XH, Wei H, He MJ. Changes in gastric emptying ability and *Helicobacter pylori* infection rate in patients with diabetes mellitus and hypothyroidism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1408-1410

## 摘要

**目的:** 观察糖尿病(DM)合并甲状腺功能减退患者胃排空能力与幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染情况的变化。

**方法:** 96例受试者分成3组: 正常组(健康体检者, 30例)、DM组(45例)、DM并甲状腺功能减退组(21例), 分别行消化道症状评分、胃排空时间及*H.pylori*感染情况测定, 并加以对比。

**结果:** DM并甲状腺功能减退组患者症状评分(分)、胃半排空时间(min)、胃全排空时间(min)显著高于正常组、DM组( $12.67 \pm 3.10$  vs  $4.30 \pm 2.65$ ,  $10.98 \pm 2.51$ ;  $35.00 \pm 8.83$  vs  $25.53 \pm 4.83$ ,  $29.76 \pm 9.54$ ;  $60.57 \pm 15.65$  vs  $45.53 \pm 10.33$ ,  $52.53 \pm 16.74$ , 均 $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), 同时3组患者*H.pylori*感染率逐渐升高(均 $P < 0.05$ )。

**结论:** DM并甲状腺功能减退患者较单纯DM

## ■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科



患者、健康体检者均胃排空能力明显下降, *H.pylori*感染率明显上升, 更易发生胃肠功能障碍。

**关键词:** 糖尿病; 甲状腺功能减退; 胃排空; 幽门螺杆菌

吴标良, 王民登, 周喜汉, 韦华, 何明杰. 糖尿病合并甲状腺功能减退患者胃排空能力与幽门螺杆菌感染率的变化. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1408-1410  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1408.asp>

## 0 引言

消化系统功能障碍是糖尿病(diabetes mellitus, DM)与甲状腺功能减退患者常见的临床症状, 胃排空能力下降及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染是消化功能障碍的重要因素。目前对于DM性胃病(胃轻瘫)已有较多报道, 但对于DM合并甲状腺功能减退患者发生消化功能障碍的情况尚缺乏相关研究。因此, 我们对部分DM并发甲状腺功能减退患者的消化不良症状、胃排空能力及*H.pylori*感染情况进行观察, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2009-02/2011-02右江民族医学院附属医院门诊和住院的DM患者45例, 男20例, 女25例, 年龄40-70(平均 $53.62 \pm 6.32$ )岁; DM并甲状腺功能减退患者21例, 男9例, 女12例, 年龄39-77(平均 $51.79 \pm 8.72$ )岁。正常组采用本实验室已建立的正常参数, 测定胃排空时间正常的非DM非甲状腺功能减退患者30例, 男18例, 女22例, 年龄39-80(平均 $52.47 \pm 9.52$ )岁。排除: 既往或新近合并器质性消化系疾病, 如消化性溃疡、胆石症或其他胆系疾病、肿瘤、消化系手术者及心、肝、肾功能不全、脑血管意外、DM酮症者。同时收集体质量指数(body mass index, BMI)及病程等资料。

### 1.2 方法

**1.2.1 症状评分:** 分别对早饱、厌食、反酸、上腹饱胀、上腹疼痛、恶心呕吐等6个症状按强度以划分: 0分 = 无症状, 1分 = 上述任一症状可感觉, 但不影响日常活动; 2分 = 上述任一症状明显感觉, 且已影响日常活动; 3分 = 上述任一症状已很严重, 严重影响日常生活。依次按上述6个症状对患者评分<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 胃排空试验:** 采用美国GE ViVid 7彩色B超, 8.0 MHz TEE探头, 所有受试者检查前3 d内

未服用任何药物, 向受试者解释检查中的注意事项, 检查前患者禁食12 h, 在5-10 min内进食液体试餐(500 mL肉汤: 含1.8 g蛋白、0.9 g脂肪、1.1 g碳水化合物)。受试者取坐位, 避免按压腹部, 分别向近端胃及远端胃扫描, 在进食后0、2、5、15、25、35、45及55 min不同时点记录扫描信息, 经计算机拟合出不同时点胃容积的变化, 计算出胃半排空时间、胃全排空时间及液体胃排空曲线<sup>[2]</sup>。

**1.2.3 糖化血红蛋白及*H.pylori*检测:** 糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)检测采用离子交换层析法, *H.pylori*检测采用<sup>14</sup>C呼气试验, 由右江民族医学院附属医院检验科及内镜实验中心完成。

**统计学处理** 符合正态分布的计量数据以mean±SD表示, 多组间差异分析应用方差分析, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, 所有统计学分析均用SPSS11.5软件完成。

## 2 结果

各组患者性别、年龄、BMI比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), DM组与DM并甲状腺功能减退组HbA1c、DM病程比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。正常组、DM组、DM并甲状腺功能减退组患者症状评分逐渐升高, 胃半排空时间、胃全排空时间逐渐延长, 并且差异有统计学意义( $F = 76.672, 8.269, 6.428$ , 均 $P < 0.01$ ), 同时3组*H.pylori*感染率逐渐升高( $P < 0.05$ , 表1)。

## 3 讨论

DM和甲状腺疾病是内分泌代谢系统中最常见的两大类疾病, 两者密切相关, 目前对DM合并甲状腺疾病的研究正日益深入。DM并甲状腺功能减退在临床上并不少见, 国内曾有学者做过相关流行病学调查, 发现2型DM患者甲状腺功能异常者占40%, 其中16.67%呈功能亢进, 23.33%呈功能减退, 男性2型DM患者甲状腺功能减退的年龄显著高于功能亢进者<sup>[3]</sup>。DM消化系统功能障碍是DM常见的并发症, 与DM自主神经病变、内分泌功能失调、胃肠微血管病变、*H.pylori*易感及DM代谢紊乱等因素相关<sup>[4]</sup>。DM性胃病(胃轻瘫)是其最为常见的病症之一。胃排空功能是反映消化系统功能的重要指标, 有研究表明超声法检测DM患者的胃液排空功能简便易行, 具有一定的临床应用价值<sup>[5]</sup>。本研究通过超声法检测胃排空功能发现, 与胃排空正常组相比, DM组及DM并甲状腺功能减退组

### ■应用要点

改善糖尿病并甲状腺功能减退患者的胃肠障碍症状可提高患者生活质量, 临床上除促进患者胃蠕动、增加胃排空能力外, 清除幽门螺杆菌感染可能有助于胃肠功能的恢复。

### ■同行评价

本文为糖尿病并甲状腺功能减退患者的治疗奠定了实验基础,但是创新性一般。

表 1 各组一般情况及临床资料比较

临床资料	正常组	DM组	DM并甲状腺功能减退组
男/女	18/22	20/25	9/12
年龄(岁)	54.47 ± 9.52	53.62 ± 6.32	57.19 ± 8.72
BMI	21.39 ± 3.69	21.31 ± 3.07	21.58 ± 4.33
DM病程	-	7.16 ± 3.45	8.76 ± 3.35
HbA1c(%)	5.52 ± 0.23	7.04 ± 0.48 <sup>b</sup>	7.04 ± 0.40 <sup>b</sup>
症状评分(分)	4.30 ± 2.65	10.98 ± 2.51 <sup>b</sup>	12.67 ± 3.10 <sup>bc</sup>
胃半排空时间(min)	25.53 ± 4.83	29.76 ± 9.54 <sup>a</sup>	35.00 ± 8.83 <sup>bc</sup>
胃全排空时间(min)	45.53 ± 10.33	52.53 ± 16.74 <sup>b</sup>	60.57 ± 15.65 <sup>bc</sup>
<i>H.pylori</i> 阳性n(%)	12(40.00)	29(64.44) <sup>a</sup>	19(90.48) <sup>bc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM组。

患者胃半排空时间、胃全排空时间延长,且DM并甲状腺功能减退组较DM组胃半排空时间、胃全排空时间更长,同时相关消化不良症状的评分更高,这说明合并甲状腺功能减退的DM患者胃排空能力下降更加明显。目前研究发现,胃轻瘫还可能与胃肠激素的分泌紊乱有关,胃肠激素在消化系统内分布广泛,对胃肠运动具有重要的调节作用,有研究表明DM胃轻瘫患者与胃排空正常患者比较具有更高的血浆胃动素水平及胃泌素水平,胃动素是调节胃肠运动的主要激素,能促进胃排空<sup>[1]</sup>。甲状腺功能减退是由于各种因素导致甲状腺激素分泌不足的疾病,他降低各种代谢过程中各系统对氧、葡萄糖等的代谢而出现神经反射迟钝、肌肉松弛无力等改变,同时也可影响到食管和胃的运动功能<sup>[6]</sup>,从而降低胃排空能力。因此,在DM的基础上并发甲状腺功能减退,患者的胃排空能力将进一步下降,更易导致胃轻瘫。

目前研究表明,DM患者*H.pylori*感染率较普通人群明显升高<sup>[7,8]</sup>,本研究结果亦显示,与正常组相比,DM患者*H.pylori*感染率较高,同时合并甲状腺功能减退的DM患者*H.pylori*感染率更高。*H.pylori*感染可引发消化性溃疡及慢性胃炎,继而影响胃排空功能。另有研究发现,*H.pylori*感染

可使血清胃泌素、胆囊收缩素水平升高,胃窦部生长抑素显著减少,进而改变胃肠的肌电活动和运动状况,也可通过改变内源性一氧化氮水平影响胃肠动力<sup>[9]</sup>。因此,DM并甲状腺功能减退患者更高的*H.pylori*感染率,可能是其更易发生胃肠功能障碍的另一原因。

### 4 参考文献

- 1 刘云,孙岩,薛绮萍,李健民. 糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 290-293
- 2 何云,廖新红,刘雪玲,叶桂宏. 三维超声检测糖尿病胃轻瘫患者胃排空功能的研究. 内科 2009; 4: 205-206
- 3 张宏,方佩华,郑凝,常宝成,赵伟,董如娇,王家驰. 住院2型糖尿病患者甲状腺功能状态的分析. 国际内分泌代谢 2007; 27: 139-141
- 4 张天成. 糖尿病胃肠道并发症. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2868-2871
- 5 李春涛,张焯. 2型糖尿病患者上消化道症状与胃排空的超声检测. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2653-2655
- 6 刘欣,龚均,戴信刚,王社教,赵平. 甲状腺功能异常对食管和胃运动功能的影响. 世界华人消化杂志 1999; 7: 439b-440
- 7 Agrawal RP, Sharma R, Garg D, Pokharna R, Kochhar DK, Kothari RP. Role of *Helicobacter pylori* in causation of diabetic gastropathies and non-gastrointestinal complications in type 2 diabetes. *J Indian Med Assoc* 2010; 108: 140-143
- 8 Ojetti V, Pellicano R, Fagoonee S, Migneco A, Berutti M, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection and diabetes. *Minerva Med* 2010; 101: 115-119
- 9 杨卫文,黎莉,杨景林,谭松,胡志恒. 幽门螺杆菌感染与糖尿病胃轻瘫的关系研究. 海南医学 2008; 19: 63-64

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

## 低表达的microRNA-145对c-Myc表达的影响

由法平, 宋孟琦, 陈立波

由法平, 宋孟琦, 陈立波, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 由法平负责文章的撰写; 宋孟琦与由法平负责共同完成实验过程; 陈立波负责文章的审阅和修稿。

通讯作者: 陈立波, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心. libo\_chen@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2011-01-17 修回日期: 2011-04-13

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

### Down-regulation of microRNA-145 ablates c-Myc inhibition and promotes hepatoma progression

Fa-Ping You, Meng-Qi Song, Li-Bo Chen

Fa-Ping You, Meng-Qi Song, Li-Bo Chen, Center for Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Li-Bo Chen, Center for Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo\_chen@hotmail.com

Received: 2011-01-17 Revised: 2011-04-13

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

### Abstract

**AIM:** To investigate whether microRNA-145 (miR-145) controls hepatoma progression through modulating c-Myc activity.

**METHODS:** Quantitative real-time PCR was used to detect miR-145 expression in different liver lesions and cell lines. Quantitative real-time PCR and Western blot were adopted to detect the expression of c-Myc mRNA and protein in different liver lesions, respectively. After transfection of HepG2 cells with an miR-145 mimic, quantitative real-time PCR, Western blot and flow cytometry were used to detect the expression of c-Myc mRNA and protein and cell apoptosis, respectively.

**RESULTS:** MiR-145 mRNA was underexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and tumor-adjacent tissue compared to normal liver

tissue ( $0.878 \pm 0.146$  vs  $0.265 \pm 0.084$ ,  $0.271 \pm 0.096$ , both  $P < 0.05$ ). MiR-145 mRNA was also underexpressed in HepG2 cells compared to L-02 cells ( $0.755 \pm 0.185$  vs  $0.471 \pm 0.074$ ,  $P < 0.05$ ). C-Myc mRNA and protein were overexpressed in HCC and tumor-adjacent tissue compared to normal liver tissue (mRNA:  $0.136 \pm 0.071$ ,  $0.451 \pm 0.026$  vs  $0.029 \pm 0.023$ ; protein:  $0.301 \pm 0.022$ ,  $0.445 \pm 0.018$  vs  $0.137 \pm 0.011$ ; all  $P < 0.05$ ). C-Myc protein expression was down-regulated in HepG2 cells transfected with an miR-145 mimic compared to cells transfected with empty vector and untransfected cells ( $0.146 \pm 0.011$  vs  $0.366 \pm 0.014$ ,  $0.350 \pm 0.013$ , both  $P < 0.05$ ). Transfection of an miR-145 mimic promoted the apoptosis of HepG2 cells compared to cells transfected with empty vector and untransfected cells ( $3.000 \pm 0.100$  vs  $1.167 \pm 0.153$ ,  $0.933 \pm 0.208$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** MiR-145 down-regulation-mediated ablation of inhibition of c-Myc may be a major cause of hepatocarcinogenesis. MiR-145 can promote cell apoptosis.

**Key Words:** MicroRNA-145; Hepatocellular carcinoma; c-Myc; Apoptosis

You FP, Song MQ, Chen LB. Down-regulation of microRNA-145 ablates c-Myc inhibition and promotes hepatoma progression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1411-1416

### 摘要

**目的:** 探讨microRNA(miR)-145是否通过调控c-Myc参与肝癌行为的调控。

**方法:** 实时定量PCR检测肝组织及细胞系miR-145表达水平; 检测不同肝组织c-Myc的mRNA和蛋白表达量; 通过转染上调miR-145在HepG2细胞表达后, 检测转染前后空白组、实验组、阴性对照组HepG2中c-Myc的mRNA和蛋白表达量; 应用流式细胞仪检测转染前后各组HepG2的凋亡情况。

**结果:** miR-145 mRNA在正常肝组织中表达明显高于癌旁和肝癌组织( $0.878 \pm 0.146$  vs

### ■背景资料

人类许多肿瘤中 都存在miRNA的异常表达, 异常表达的miRNA通过类似于癌基因/抑癌基因功能调控着肝癌的发生发展。有报道P53通过诱导miR-145抑制c-Myc的表达, 但miR-145在肝癌中的表达水平以及其与c-Myc之间的关系还未见报道。c-Myc是肝癌发生进展中的关键癌基因, 因而探讨肝癌中miR-145和c-Myc的关系具有重要的价值。

### ■同行评议者

英卫东, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

## ■ 研发前沿

现在关于miRNA的研究主要集中在miRNA在肿瘤的发生发展中与癌基因/抑癌基因的相互作用及miRNA本身变化对其他基因的影响。

0.265±0.084, 0.271±0.096, 均 $P<0.05$ ); 癌旁和肝癌组织中miR-145 mRNA的表达量差别无统计学意义。miR-145 mRNA在LO-2中的表达明显高于HepG2(0.755±0.185 vs 0.471±0.074,  $P<0.05$ )。c-Myc mRNA和蛋白在癌旁和肝癌中表达均高于正常肝组织(mRNA: 0.136±0.071, 0.451±0.026 vs 0.029±0.023; 蛋白: 0.301±0.022, 0.445±0.018 vs 0.137±0.011, 均 $P<0.05$ ), 且在肝癌组织中表达量较癌旁组织中明显升高( $P<0.05$ )。转染miR-145 mimics后空白组、实验组、阴性对照组c-Myc mRNA表达差异无统计学意义; 而相对于空白组和阴性对照组, 实验组c-Myc蛋白表达量表达明显下降(0.146±0.011 vs 0.366±0.014, 0.350±0.013, 均 $P<0.05$ ), 空白组和阴性对照组之间差异无统计学意义。流式细胞术检测发现, 在HepG2中上调miR-145的表达后, 细胞的凋亡明显增多, 实验组与空白组和阴性对照组之间有明显差异(3.000±0.100 vs 1.167±0.153, 0.933±0.208, 均 $P<0.05$ )。

**结论:** miR-145反向调节c-Myc的表达; 表达下调的miR-145丧失对c-Myc的抑制可能是肝癌发生的重要机制; miR-145能够作为抑癌基因促进细胞凋亡。

**关键词:** miR-145; 肝细胞癌; c-Myc; 凋亡

由法平, 宋孟铸, 陈立波. 低表达的microRNA-145对c-Myc表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1411-1416  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1411.asp

## 0 引言

MicroRNA(miRNA)是22 nt左右的微小RNA, 通过RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)与靶基因mRNA的3'UTR区互补结合降解或者抑制靶基因mRNA的翻译从而影响靶基因蛋白的表达<sup>[1,2]</sup>。越来越多的证据表明在人类许多肿瘤中都存在miRNA的异常表达。例如, miR-15a、miR-16-1在慢性淋巴细胞白血病中<sup>[3,4]</sup>, miR-143、miR-145在结肠直肠癌中<sup>[5]</sup>, let-7在肺癌中<sup>[6]</sup>, miR-155在弥漫性大B细胞淋巴瘤中均有异常表达<sup>[7]</sup>。miRNA的作用很强大, 研究表明每个miRNA与相当数量的基因有联系(平均每个miRNA家族作用于500个基因)<sup>[8-11]</sup>。例如miR-21在胰腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、CLL、AML的均表达上调<sup>[12-17]</sup>; miR-34a、miR-34b、miR-34c在结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌膀胱癌、神经母细胞瘤<sup>[18]</sup>等肿瘤中表达下调。异常表达的miRNA<sup>[19-21]</sup>通过类似于癌

基因/抑癌基因功能调控着肝癌的发生发展。在结肠癌和乳腺癌中有报道P53通过诱导miR-145抑制c-Myc的表达<sup>[22]</sup>, 但miR-145在肝癌中的表达水平以及其与c-Myc之间的关系还未见报道。c-Myc是肝癌发生进展中的关键癌基因, 因而探讨肝癌中miR-145和c-Myc的关系具有重要的价值。本文通过检测不同肝组织及肝癌细胞系miR-145、c-Myc mRNA及c-Myc蛋白的表达量以及功能学研究, 初步探讨肝癌中miR-145与c-Myc表达异常的关系及miR-145在肝癌发生中的生物学行为。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 18例正常肝组织, 53例肝癌组织来源于2009-08-15/2010-11-08在华中科技大学同济医学院附属协和医院门诊肝组织活检, 肝外伤破裂及肝癌切除病例。所有病例均为35-45岁男性患者, 肝癌患者术前未接受化疗治疗, 最后病理结果诊断明确。标本切除后30 min以内放入-80℃保存备用。LO-2细胞和HepG2细胞均由华中科技大学同济医学院附属协和医院普外实验室冻存, 按常规培养; c-Myc一抗(鼠抗人)购自美国Santa Cruz公司; mRNA实时定量PCR试剂盒购自Invitrogen公司; 引物由Invitrogen公司合成; 凋亡试剂盒Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(KeyGEN, China)购自凯基公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实时定量PCR检测肝脏组织及细胞中miRNA-145 mRNA的表达:** 应用TRIzol分别提取组织和细胞的总RNA, 逆转录得到cDNA后进行实时定量PCR。引物设计资料: hsa-miR-145 MIMAT0000437 GUCCAGUUUCCAGGAAUCCU, 正向特异性引物5'-GTCCAGTTTTCCAGGA-3'; 内参U6正向特异性引物5'-CTCGCTTCGGCAGCAC A-3'; 反应参数设置: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 10 s, 扩增40个循环。所得数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式校正后再评定个样本之间的差异。

**1.2.2 实时定量PCR检测肝脏组织和细胞中c-Myc mRNA的表达量:** 应用TRIzol一步法提取各肝组织中总RNA, 逆转录得到cDNA, 然后进行实时定量PCR反应, c-Myc上、下游引物序列分别为5'-CGTCTCCACACATCAGCACAA-3'和5'-TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT-3', 内参 $\beta$ -actin正向引物5'-GAACGGTGAAGGTGACA G-3', 反向引物5'-TAGAGAGAAGTGGGGTGG

-3', 反应参数设置: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s; 72 °C 30 s, 循环45次; 72 °C 5 min<sup>[23]</sup>, 所得数据用2<sup>-ΔΔCt</sup>公式校正后用来评定各样本间的差异.

**1.2.3 Western blot检测肝组织及肝细胞中c-Myc蛋白表达量:** 各肝脏组织取0.5 mg, 收集六孔板中融合达80%的细胞提取总蛋白, 采用Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)测定总蛋白浓度, 将定量的蛋白以每孔20-40 μg加样于SDS-PAGE凝胶上样孔中, 200 V电泳至溴酚蓝迁移到距分离胶底部0.5 cm处, 关闭电源; 用300 mA转膜70 min; 将电转膜置于5%的脱脂奶粉(PBS配置)中封闭, 37 °C振荡2 h; 后加入1:400 c-Myc一抗1 mL, 4 °C孵育过夜, PBST漂洗3次, 后加入1:5 000 HRP标记的二抗(用含5%脱脂奶粉的PBS稀释)室温下摇床孵育1 h, PBST漂洗3次, 化学发光显影, 胶片曝光, 结果用UVP扫描仪扫描成像.

**1.2.4 转染miR-145 mimics对HepG2细胞中miR-145表达的影响:** 取稳定生长的对数生长期的HepG2细胞消化计数, 以平均每孔5.0 × 10<sup>5</sup>个细胞种植于6孔板中, 分空白组、实验组、阴性对照组, 空白组加无血清无抗生素Opti-MEM培养基2 mL, 实验组加终浓度为50 nmol/L的miR-145 mimics(广东锐博)和5 μL Lipofectamine 2000(Invitrogen), 阴性对照组加终浓度为50 nmol/L的阴性对照试剂(广东锐博)和5 μL Lipofectamine 2000(Invitrogen), 后各组均用Opti-MEM培养基调至2 mL, 转染步骤严格按说明书执行, 转然24 h后检测各组c-Myc的mRNA表达; 48 h后检测各组c-Myc蛋白的表达.

**1.2.5 流式检测转染miR-145 mimics后HepG2细胞的凋亡:** 用Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(KeyGEN, China)严格按说明书处理细胞. 将转染48 h后的各组细胞用不含EDTA的0.25%胰酶消化后离心收集细胞, PBS洗涤细胞两次, 离心收集细胞; 加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC混匀, 加入5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温, 避光, 反应15 min; 用FACScan进行流式细胞术定量检测, 最后用CELL Quest软件进行数据分析.

**统计学处理** 各组实验重复3次数据经SPSS18.0软件分析, 计量资料采用mean ± SD表示, 组间计量资料采用t检验和方差分析(One-Way ANOVA, LSD method), 以P < 0.05为具有统计学意义.

**2 结果**

**2.1 miR-145 mRNA在不同肝脏组织及肝细胞系**

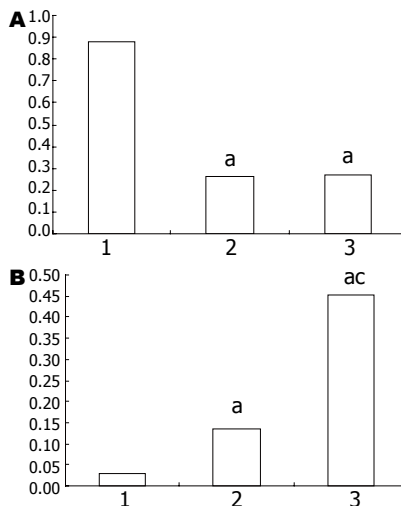


图1 实时定量PCR检测组织中miR-145, c-Myc mRNA. A: miR-145; B: c-Myc. 1: 正常肝组织; 2: 癌旁组织; 3: 肝癌组织. \*P < 0.05 vs 正常肝组织; †P < 0.05 vs 癌旁组织.

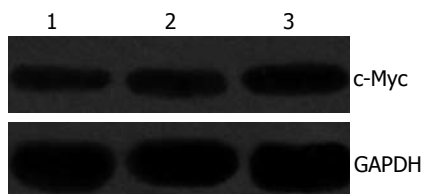


图2 Western blot检测不同组织中c-Myc表达量. 1: 正常肝组织; 2: 癌旁组织; 3: 肝癌组织.

中的表达 miR-145 mRNA在正常肝脏, 癌旁及肝癌组织中的表达量分别为0.878 ± 0.146, 0.265 ± 0.084, 0.271 ± 0.096(图1A); miR-145 mRNA在LO-2和HepG2细胞系中表达量分别为0.755 ± 0.185, 0.471 ± 0.074; miR-145 mRNA在正常肝组织中表达明显高于癌旁和肝癌组织(均P < 0.05); 癌旁和肝癌组织中miR-145 mRNA的表达量差别无统计学意义. miR-145 mRNA在LO-2中明显高于HepG2中的表达(P < 0.05).

**2.2 c-Myc mRNA和蛋白在不同肝组织中的表达** 实时定量PCR结果显示正常肝组织, 癌旁组织和肝癌组织中mRNA的表达量分别为: 0.029 ± 0.023, 0.136 ± 0.071, 0.451 ± 0.026(图1B); Western blot显示在正常肝组织, 癌旁组织和肝癌组织中蛋白表达量分别为0.137 ± 0.011, 0.301 ± 0.022, 0.445 ± 0.018(图2). 统计结果显示c-Myc mRNA和蛋白在癌旁和肝癌中表达均高于正常肝组织(P < 0.05), 且在肝癌组织中表达量较癌旁组织中明显升高(P < 0.05).

**2.3 miR-145的表达与肝癌患者的临床病理参数的关系** 根据患者性别、年龄、原发肿瘤大小、分化程度、是否合并肝内子灶、血清AFP

**■ 相关报道**  
Chang等在此研究的基础上发现在B细胞淋巴瘤中有超过10种miRNA的表达受c-Myc的调控, 染色体免疫共沉淀研究证实c-Myc能与miRNA的上游保守序列或启动子序列特异性结合, 抑制miRNA的表达促进肿瘤的发展. 因此c-Myc的异常表达与肿瘤有密切的关系.

### ■创新盘点

在结肠癌和乳腺癌中曾有报道c-Myc是miR-145的直接作用靶点,且P53通过诱导miR-145表达能调控c-Myc的表达。但在肝癌中miR-145与肝细胞癌之间类似的关系尚未见报道,是否miR-145同样反向调控c-Myc的表达尚未见报道。

表 1 miR-145的表达与肝癌患者的临床病理参数的关系

病理参数	n	miR-145的表达量	P值
性别			
男	39	0.278 ± 0.096	>0.05
女	14	0.252 ± 0.095	
年龄(岁)			
>50	21	0.278 ± 0.098	>0.05
<50	32	0.267 ± 0.095	
肿瘤大小(cm)			
<3	11	0.321 ± 0.089	>0.05
>3	42	0.258 ± 0.094	
分化程度			
好	16	0.315 ± 0.098	<0.05
差	37	0.252 ± 0.089	
肝内转移灶			
有	12	0.204 ± 0.048	<0.05
无	41	0.291 ± 0.094	
AFP浓度(μg/L)			
<400	18	0.310 ± 0.084	<0.05
>400	35	0.252 ± 0.096	
HbsAg			
阳性	39	0.254 ± 0.095	<0.05
阴性	14	0.318 ± 0.082	

及HbsAg检测结果进行分组,定量比较各组中miR-145的表达状况。统计结果显示miR-145 mRNA表达量与患者的性别、年龄及肿瘤的大小无关( $P>0.05$ ),但与肝癌分化程度、是否合并肝内转移灶有关( $P<0.05$ ),与患者血清AFP的浓度及是否合并HBV感染有关( $P<0.05$ ,表1)。

**2.4 上调miR-145表达对c-Myc mRNA和蛋白表达的影响** 转染miR-145 mimics 24 h后提取总RNA,进行实时定量PCR检测空白组、实验组、阴性对照组c-Myc mRNA表达量分别为 $2.614 \pm 0.863$ ,  $2.382 \pm 0.769$ ,  $2.771 \pm 0.614$ ;转染48 h后提取总蛋白Western blot检测空白组、实验组、阴性对照组c-Myc蛋白的表达量分别为 $0.366 \pm 0.014$ ,  $0.146 \pm 0.011$ ,  $0.350 \pm 0.013$ (图3)。统计结果显示,转染miR-145 mimics后空白组、实验组、阴性对照组c-Myc mRNA表达差异无统计学意义;而相对于空白组和阴性对照组,实验组c-Myc蛋白表达量明显下降( $P<0.05$ ),空白组和阴性对照组之间差异无统计学意义。

**2.5 转染miR-145 mimics后HepG2细胞的凋亡情况** 转染miR-145 mimics后48 h行流式细胞术定量检测HepG2细胞的凋亡水平:在HepG2中上调miR-145的表达后,细胞的凋亡明显增多(图4)。空白对照组、实验组、阴性对照组细胞凋亡

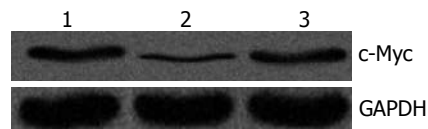


图 3 Western blot检测不同转染组c-Myc的表达量。1:空白组;2:实验组;3:阴性对照组。

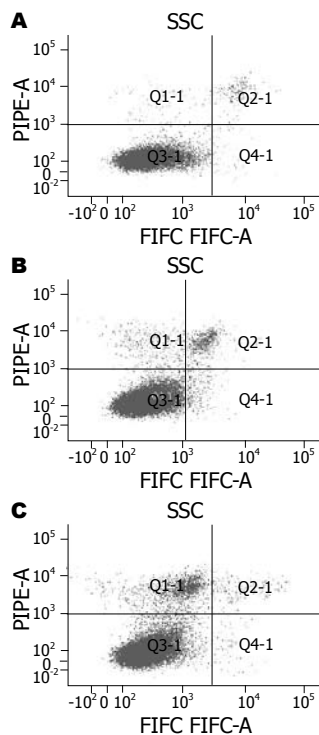


图 4 流式细胞术检测上调miR-145表达后细胞的凋亡水平。A:空白组;B:实验组;C:阴性对照组。

率分别为 $1.167 \pm 0.153$ ,  $3.0 \pm 0.1$ ,  $0.933 \pm 0.208$ ,实验组与空白组和阴性对照组之间有明显差异( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

迄今为止,人类有近15%-20%的基因受c-Myc的直接或间接的调控,这些基因与细胞的周期调控、蛋白合成、细胞结构的形成、运动性、代谢等等有关<sup>[24]</sup>,共同调控着细胞的生长、分化和凋亡<sup>[25]</sup>。基因分析在病毒相关性肝癌及酒精相关性肝癌中有70%的患者存在c-Myc的高表达<sup>[26]</sup>;早已有报道c-Myc能直接上调miR-17-92簇的表达,促进肿瘤的发生发展<sup>[27]</sup>;Chang等<sup>[28]</sup>在此研究的基础上发现在B细胞淋巴瘤中有超过10种miRNA的表达受c-Myc的调控,染色体免疫共沉淀研究证实c-Myc能与miRNA的上游保守序列或启动子序列特异性结合,抑制miRNA的表达,促进肿瘤的发展。因此c-Myc的异常表达与肿瘤有密切的关系。但c-Myc的异常表达机制的原因尚不明确,是否受miRNA的调控仍不明确。有报道在HeLa细胞中研究发现let-7能特异

性结合c-Myc的3'UTR在mRNA和蛋白水平抑制c-Myc的表达<sup>[29]</sup>; 生理状态下P53能够直接作用于miR-34家族抑制c-Myc的表达诱导细胞周期停止和细胞凋亡<sup>[30]</sup>, 等等. 在结肠癌和乳腺癌中曾有报道c-Myc是miR-145的直接作用靶点<sup>[22]</sup>, 且P53通过诱导miR-145表达能调控c-Myc的表达. 但在肝癌中miR-145与肝细胞癌之间类似的关系尚未见报道, 是否miR-145同样反向调控c-Myc的表达尚不清楚.

我们发现miR-145 mRNA在正常肝组织中表达明显高于癌旁和肝癌组织; c-Myc mRNA和蛋白在癌旁和肝癌中表达均高于正常肝组织, 且在肝癌组织中表达量较癌旁组织中明显升高, 提示c-Myc的异常高表达可能与miR-145异常低表达有关; 临床病理参数显示miR-145的低表达与患者的性别、年龄及肿瘤大小无关, 与肿瘤的分化程度、是否合并HBV感染和肝内转移灶及患者血清AFP浓度等有关, 提示miR-145低表达的患者, 肿瘤恶性程度高、容易转移, 预后较差; 由于miRNA-145 mRNA在LO-2中明显高于HepG2中的表达, 我们利用miR-145 mimics转染HepG2细胞, 上调miR-145的表达量进一步验证了, miR-145能够在蛋白水平抑制c-Myc的表达, 但在mRNA水平实验组与空白组及阴性对照组无明显差异. 结合在组织中miR-145与c-Myc的异常表达, 提示在肝癌中miR-145能反向调控c-Myc的表达, 进一步研究发现上调miR-145还能促进肝癌细胞凋亡.

总之, 我们的研究证实了在肝癌中miR-145与c-Myc的关系及miR-145能够作为抑癌基因促进癌细胞凋亡, 为肝细胞癌的治疗提供了一条新的途径, 但是在肝细胞肝癌中miR-145异常低表达的机制尚不明确, 是否受DNA甲基化或(和)组蛋白甲基化的调控及HBV的影响将是我们的下一步的研究方向.

#### 4 参考文献

- 1 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640
- 2 Tang F, Hajkova P, O'Carroll D, Lee C, Tarakhovskiy A, Lao K, Surani MA. MicroRNAs are tightly associated with RNA-induced gene silencing complexes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 24-29
- 3 Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Mi-

- croRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11755-11760
- 4 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004
- 5 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 6 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 7 Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3627-3632
- 8 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798
- 9 Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500
- 10 Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D149-D153
- 11 Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105
- 12 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- 13 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- 14 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 3183-3189
- 15 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- 16 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*

#### ■应用要点

本文的研究证实了在肝癌中miR-145与c-Myc的关系, miR-145能够作为抑癌基因促进癌细胞凋亡, 为肝细胞癌的治疗提供了一条新的途径.

## ■同行评价

本文选题新颖,有一定的科学价值.

- 2002; 99: 15524-15529
- 17 Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-198
- 18 Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1351-1358
- 19 Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 419-427
- 20 Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 264-269
- 21 马兆龙, 杨炼, 陈立波, 黄金明, 王冬冬, 王国斌. miRNA在HBV从感染经由肝硬化到肝癌进程中表达谱的变化. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2112-2116.
- 22 Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K, Mo YY. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3207-3212
- 23 何军, 马兆龙, 陈立波, 王国斌. 组蛋白甲基转移酶 SMYD3在不同HBV表达水平肝癌细胞中的差异表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2036-2039
- 24 Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 2009; 458: 762-765
- 25 Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 253-264
- 26 Schlaeger C, Longrich T, Schiller C, Beverunge P, Mehrabi A, Toedt G, Kleff J, Ehemann V, Eils R, Lichter P, Schirmacher P, Radlwimmer B. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2008; 47: 511-520
- 27 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-843
- 28 Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008; 40: 43-50
- 29 Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 2007; 67: 8433-8438
- 30 Koscianska E, Baev V, Skreka K, Oikonomaki K, Rusinov V, Tabler M, Kalantidis K. Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 79

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)



# 遗传性非息肉病性结直肠癌血清的蛋白质组学

魏巍, 尚秀娟, 吕保洲

魏巍, 尚秀娟, 吕保洲, 河南省新乡市中心医院肛肠科 河南省新乡市 453000

作者贡献分布: 此课题由魏巍与尚秀娟设计; 研究过程及数据分析由魏巍、尚秀娟及吕保洲操作完成; 本论文写作由魏巍完成。

通讯作者: 魏巍, 453000, 河南省新乡市金穗大道56号, 新乡市中心医院肛肠科. weew120@126.com

电话: 0373-2041093

收稿日期: 2010-12-22 修回日期: 2011-04-11

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-05-08

## Serum proteomic analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer

Wei Wei, Xiu-Juan Shang, Bao-Zhou Lv

Wei Wei, Xiu-Juan Shang, Bao-Zhou Lv, Department of Proctology, the Central Hospital of Xinxiang, Xinxiang 453000, Henan Province, China

Correspondence to: Wei Wei, Department of Proctology, the Central Hospital of Xinxiang, 56 Jinsui Avenue, Xinxiang 453000, Henan Province, China. weew120@126.com

Received: 2010-12-22 Revised: 2011-04-11

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-05-08

### Abstract

**AIM:** To identify differentially expressed serum proteins between preoperative patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and those with sporadic colorectal cancer to find potential markers for the diagnosis of HNPCC.

**METHODS:** The composition of serum proteins was detected by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and protein chip assay in 20 preoperative HNPCC patients and 25 patients with sporadic colorectal cancer. Discriminatory serum protein profiles were analyzed with the Biomarker Wizard software and Biomarker Pattern software.

**RESULTS:** Two proteins ( $m/z$  7 516.68 Da and 4 827.07 Da) were chosen to create a decision classification tree model which could discriminate the two groups of patients. In the test mode, the accuracy, sensitivity, specificity, and positive predictive value of the model for prediction of HNPCC was 86.7%, 72.3%, 95.1% and 92.5%,

respectively, while the corresponding values for blinded validation were 75.6%, 100%, 69.8% and 99.2%, respectively.

**CONCLUSION:** The classification tree model constructed with two differentially expressed proteins identified by SELDI-TOF-MS between HNPCC patients and patients with sporadic colorectal cancer possesses high sensitivity and specificity in the prediction of HNPCC.

**Key Words:** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer; Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; Proteomics

Wei W, Shang XJ, Lv BZ. Serum proteomic analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1417-1421

### 摘要

**目的:** 研究遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)与散发性结直肠癌患者术前血清蛋白质的表达差异, 以期发现可用于HNPCC诊断的生物学指标。

**方法:** 应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术结合蛋白质芯片分别检测20例HNPCC和25例散发性结直肠癌患者术前血清蛋白质组分。将获得的蛋白质谱采用美国CIPHERGEN公司的Biomarker Wizard和Biomarker Pattern软件进行分析。

**结果:** 以质荷比为7 516.68 Da和4 827.07 Da建立的分类决策树模型能将HNPCC和散发性结直肠癌患者区分开来。该模型在测试模式下诊断准确率为86.7%、灵敏度为72.3%、总特异度95.1%、阳性预测值92.5%。盲法验证模式下诊断准确率为75.6%、灵敏度69.8%、总特异度99.2%、阳性预测值100%。

**结论:** 利用SELDI-TOF-MS技术建立的HNPCC诊断分类树模型具有较高的敏感度和特异度。

**关键词:** 遗传性非息肉病性结直肠癌; 表面增强激光解吸电离飞行时间质谱; 蛋白质组学

魏巍, 尚秀娟, 吕保洲. 遗传性非息肉病性结直肠癌血清的蛋白

### 背景资料

遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)是一种常染色体显性遗传病。当前HNPCC的诊断主要依靠MMR基因突变和MSI检测。但上述手段存在检测过程耗时长、检测结果不稳定以及诊断灵敏度低等不足。因此, 探索一种新的检测手段对于HNPCC的早期诊断来讲, 显得至关重要。

### 同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科

## ■ 研发前沿

HNPCC是一种常染色体显性遗传病。作为结直肠癌的一个重要亚型,其病因和临床病理类型较为特殊,同时具有肿瘤的遗传性、高发性、多发性和肿瘤发生的多器官性等特点,是目前结直肠癌和遗传性肿瘤的一个研究热点。

质组学. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1417-1421  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1417.asp>

## 0 引言

遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)是一种常染色体显性遗传病。作为结直肠癌的一个重要亚型,其病因和临床病理类型较为特殊,同时具有肿瘤的遗传性、高发性、多发性和肿瘤发生的多器官性等特点,是目前结直肠癌和遗传性肿瘤的一个研究热点<sup>[1,2]</sup>。本实验通过对HNPCC和散发性结直肠癌患者术前血清蛋白质进行分析,探讨两者之间血清蛋白的表达差异,建立HNPCC疾病诊断模型。

## 1 材料和方法

1.1 材料 新乡市中心医院2005-08/2010-07住院的结直肠癌患者共计2 875例,从中选取HNPCC患者术前血清标本20例,其中男13例,女7例,年龄26-75(平均52±6)岁。入选标准参照阿姆斯特丹标准II<sup>[3]</sup>,对符合HNPCC临床诊断标准者在课题研究前先行错配修复基因突变(mismatch repair, MMR)和微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)检测以进一步印证HNPCC的诊断。同时随机选取同时期散发性结直肠癌患者术前血清标本25例,其中男15例,女10例,年龄30-82(平均57±8)岁。HNPCC和散发性结直肠癌病例术后均经病理学确诊。应用随机数字表把血清标本分成8个样本1个实验组。取样人群具有相似的暴露史、相同的民族。所有受试对象均知情同意并排除存在影响血清蛋白质含量的自身免疫、肝炎、过敏等相关性疾病。尿素(urea)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris-HCL)、3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)、芥子酸(SPA)、乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙基磺酸(HEPES)均购自Sigma公司, SELDI蛋白质芯片仪(美国CIPHERGEN公司)、各种类型SELDI蛋白质芯片(美国BIO-RAD Laboratories公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 血清标本的采集与保存:患者于术前清晨清醒空腹状态下采集静脉血3-4 mL, 4℃冰箱中静置2 h后离心(1 000 r/min, 30 min),取血清按100 μL/管分装,置于-70℃冰箱中保存。

1.2.2 血清标本准备:4℃环境下融解冰冻血清,每个样品取10 μL分别置于1.5 mL离心管

中,每管加20 μL U9缓冲液(含9 mol/L尿素,2% CHAPS, 50 mmol/L Tris-HCl pH9.0),4℃环境下200 r/min振荡30 min,使蛋白质变性。分别取120 μL IMAC结合/洗脱缓冲液(100 mmol/L磷酸钠+500 mmol/L氯化钠, pH7.0)置于1.5 mL离心管中,每管加入10 μL上述变性后的血清样品后混匀,4℃振荡30 min。

1.2.3 芯片处理:将芯片放入操作平台,每孔加100 mmol/L硫酸铜50 μL,4℃环境下200 r/min振荡5 min,使Cu<sup>2+</sup>结合于芯池中,倒除硫酸铜溶液,用去离子水冲洗5次后甩干。每孔中加入100 mmol/L醋酸钠(pH4.0)50 μL,4℃环境下200 r/min振荡5 min后倒除醋酸钠溶液,用去离子水冲洗5次后甩干,以除去没有结合的Cu<sup>2+</sup>。用去离子水冲洗5次,吸水纸滤干操作平台。每孔加入IMAC结合/洗脱缓冲液150 μL,4℃环境下200 r/min振荡5 min,除去缓冲液,重复1次。每孔加入稀释好的血清样品50 μL上样,4℃环境下200 r/min振荡60 min后除去未结合的样品。每孔加入150 μL IMAC结合/洗脱缓冲液,4℃环境下200 r/min振荡5 min,除去缓冲液,重复1次。吸水纸滤干操作平台,将芯片移出操作平台,每孔风干,每孔加入0.5 μL SPA饱和溶液/次,共2次,风干后即可上机测定。

1.2.4 芯片检测:用加有All-in-one标准蛋白质的NP20芯片校正质谱仪,设定仪器参数(Digitizer rate = 1 000, Mass Deflector Value = 2)。设定所有血清样品检测的蛋白质相对分子质量区间在1 500-200 000 Da,低于1 500 Da的蛋白质或肽段将自动从波谱中被清除,因在0-1 500 Da这一区间可存在加合物、试剂成分、SPA以及其他化学成分,影响后续的数据分析。设定低能量激光强度读取低分子量蛋白质数据设最高分子量为50 000 Da,最佳状态从3 000-15 000 Da,并选择最佳激光强度和最佳检测灵敏度,聚焦到最佳中心,设定数据收集方法为seldi quantitation,其数据收集参数acquisition parameters为20, delta 4, transients per to 10 ending position to 80,设预热位置用2个点,选择激光强度为激光最佳强度+10,数据收集不包括预热点。设定高能量激光强度(high laser intensity)读取高分子量蛋白质数据。设最高分子量为200 000 Da,最佳状态从10 000-50 000 Da,设开始激光强度为低激光强度+30即为最佳激光强度,设开始监测器灵敏度为最佳检测灵敏度,并聚焦到最佳中心,设定数据收集方法为seldi quantitation,其数据收集参数

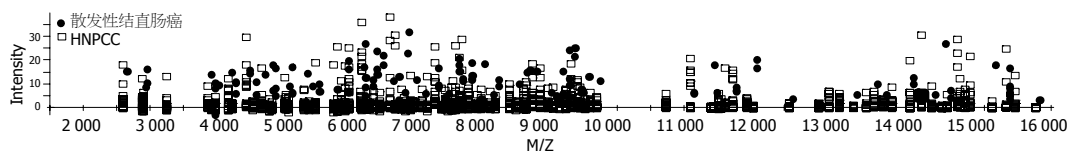


图1 HNPCC与散发性结直肠癌患者血清中相同质荷比的蛋白质相对含量比较。

#### 应用要点

本文利用SELDI-TOF-MS技术建立的HNPCC诊断分类树模型具有较高的敏感度和特异性。

acquisition parameters为22, delta 4, transients per to 10 ending position to 82, 设预热位置用2个点, 选择激光强度为激光最佳强度+10, 数据收集不包括预热点。

1.2.5 数据处理: 利用CIPHERGEN ProteinChip软件完成对蛋白质质谱信息的录入和质谱图的绘制, 其中横坐标为质荷比, 即蛋白质相对分子质量, 纵坐标为波峰强度, 即蛋白质相对含量。Biomarker Wizard统计软件用于对各组相同M/Z条件下其血清中不同的蛋白质相对含量进行计算, 从而筛选出差异蛋白。用Biomarker Pattern数据挖掘软件通过定义一个完善的训练-验证协议把所有待检样本数据分成训练组和测试组, 在学习模式下(最优分类决策树模型建立的过程)对训练组用n倍交叉方法建立最优分类决策树模型, 以保证其正确性, 然后在测试模式(检验该模型诊断价值的过程)下用测试组对最优分类决策树模型进行验证和测试, 分别得到此模型对训练组和测试组的分组准确率、灵敏度、特异性以及阳性预测值。

统计学处理 采用Biomarker Wizard统计软件分别对HNPCC和散发性结直肠癌患者血清蛋白质的波峰强度进行t检验, 数据均以mean±SD表示,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。采用Biomarker Pattern软件用10倍交叉验证方法利用差异蛋白建立最优分类决策树模型。

## 2 结果

2.1 HNPCC与散发性结直肠癌患者术前血清蛋白质表达存在差异 采用Biomarker Wizard软件对所测得20例HNPCC与25例散发性结直肠癌患者血清蛋白质进行比较, 结果显示在质荷比2 700-16 500 Da范围内检测到的26个蛋白质峰中, 有5个蛋白质荷比位点处的波峰强度有统计学意义( $P < 0.05$ , 图1, 表1)。

2.2 差异蛋白在HNPCC和散发性结直肠癌患者血清中的表达情况 比较5个差异蛋白在血清中的相对含量, 结果显示在HNPCC患者血清中均呈显著下调。在5个差异蛋白中, 随即选取质荷比为7 516 Da和9 604 Da的两个差异蛋白在

表1 两组患者血清中5个差异蛋白的波峰强度比较

质荷比(Da)	波峰强度		P值
	散发性结直肠癌	HNPCC	
7 516.68	8.63 ± 1.41	1.45 ± 0.33	0.01278
4 827.07	10.11 ± 7.34	5.17 ± 3.31	0.02519
9 604.74	5.52 ± 4.56	2.77 ± 2.05	0.02832
6 147.44	7.02 ± 4.36	3.57 ± 1.49	0.03001
12 720.83	2.35 ± 1.50	1.89 ± 0.47	0.04948

HNPCC与散发性结直肠癌患者血清中表达的波谱图与模拟电泳图如下(图2)。

2.3 生物标志物的发现及其分类决策树模型的建立和分析 将Biomarker Wizard软件分析所得到的有差别的蛋白质峰建立数据库, 导入Biomarker Pattern统计分析软件, 选择相应条件对20例HNPCC以及25例散发性结直肠癌患者术前血清中蛋白质组成进行分析, 结果发现以质荷比为7 516.68 Da和4 827.07 Da两个差异蛋白组成的分类决策树模型(图3)可将HNPCC和散发性结直肠癌两组区分开来。用这个生物标志物数据共产生3个终节点。在节点1处共有45例结直肠癌患者, 有27例患者血清差异蛋白的相对含量满足条件 $M/Z \ 7\ 516.68 \text{ Da} \leq 2.218$ 被分到节点2, 余18例被分到终节点3; 节点2处27例患者中有21例患者血清差异蛋白的相对含量满足条件 $M/Z \ 4\ 827.07 \text{ Da} \leq 0.282$ 被分到终节点1, 余6例被分到终节点2。

2.4 分类决策树模型分别在软件学习和测试模式下的分类结果 在软件学习模式下对20例HNPCC和25例散发性结直肠癌进行分组, 分组准确率为86.7%(39/45), 在软件测试模式下对上述样本进行双盲检测, 其分组准确率为75.6%(34/45)。分类决策树模型在软件两种模式下对各组的错分情况见表2。

## 3 讨论

HNPCC是一种常染色体显性遗传病, 当前HNPCC的诊断主要依靠MMR基因突变和MSI检测<sup>[4-6]</sup>。但上述手段存在检测过程耗时长、检测结果不稳定以及诊断灵敏度低等不足<sup>[7-9]</sup>。因

### 同行评价

本文实验数据较充足, 结论较明确, 具有一定的科学性和创新性。

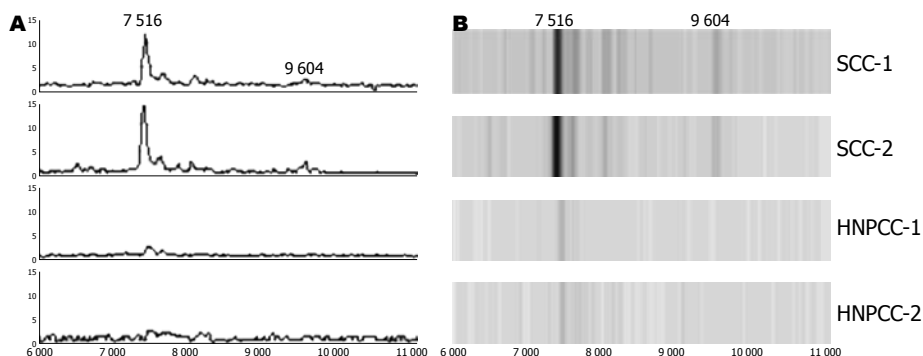


图2 质荷比为7 516 Da和9 604 Da的两个差异蛋白的波谱图及模拟电泳图. A: 波谱图; B: 模拟电泳图.

表2 分类树模型在两种模式下的错分情况 (n)

分组	n	错分	
		学习模式	测试模式
HNPCC	20	1	3
散发性结直肠癌	25	5	8

此, 探索一种新的检测手段对于HNPCC的早期诊断来讲, 显得至关重要。

SELDI-TOF-MS技术具有高通量、操作简便、样本处理简单等优点, 目前已广泛应用于卵巢癌、前列腺癌、肝癌、食管癌、结直肠癌等多种肿瘤的研究<sup>[10-14]</sup>. 我们采用SELDI-TOF-MS技术对20例HNPCC和25例散发性结直肠癌的血清标本进行了蛋白质指纹图谱的测定, 并应用相关软件进行数据分析. 建立的模型分别对70例测试血清标本进行盲法验证, 得到准确率为75.6%、灵敏度69.8%、总特异度99.2%、阳性预测值100%, 明显优于当前HNPCC的检测手段(诊断准确率为40%-60%)<sup>[7-9]</sup>. 此分类决策树模型的建立, 不仅在HNPCC临床筛查及诊断方面可能发挥更大的潜力, 同时丰富了结直肠癌蛋白质诊断模板。

但由于我们的病例数量有限, 由年龄和性别带来的干扰难以通过抽样检查. 因此, 我们将所有样本按年龄和性别分类后, 在以上各人群组内、组间及总样本间进行比较, 建模时将有明显差异的蛋白质剔除, 以此排除年龄和性别带来的干扰. 但该模型诊断一致性强度一般, 我们考虑与以下因素有关: (1)样本量有限; (2)由于同一个M/Z可对应多个蛋白质. 因此, 依据性别、年龄分组比较后筛选的蛋白质可能同时对应了性别、年龄差异蛋白及对筛查诊断有意义的蛋白, 由此损失了一些生物学信息. 今后我们会不断扩大样本量, 对分类树模型进行不断的修正, 以提高诊断的准确率、灵敏度以及特异度, 并通过双盲法对该模型进行验证. 同时我们

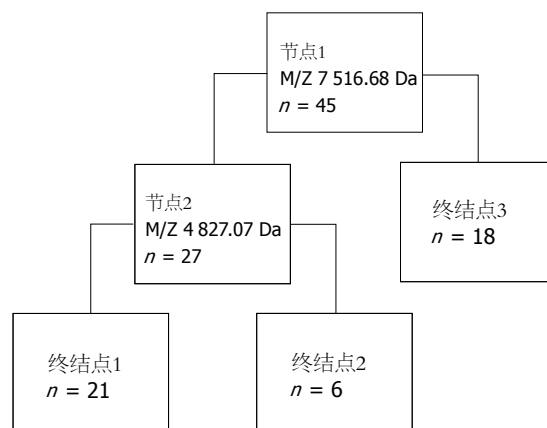


图3 分类树模型简图. Node: 节点; Terminal Node: 终结点; N: 例数.

也将对质荷比为7 516.68 Da和4 827.07 Da的这种蛋白质进行长期、动态、定量的监测, 分析术前、术后长期的变化规律, 并对其进行鉴定, 希望能对HNPCC的病因、发病机制、诊断以及治疗等研究提供理论依据。

## 4 参考文献

- Wang J, Luo MH, Zhang ZX, Zhang PD, Jiang XL, Ma DW, Suo RZ, Zhao LZ, Qi QH. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1612-1617
- 袁瑛, 曹文明, 蔡善荣, 张苏展. 中国人遗传性非息肉病性结直肠癌家系的临床表型分析. *中华肿瘤杂志* 2006; 28: 36-38
- 顾国利, 周晓武, 王石林. 遗传性非息肉病性大肠癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3115-3121
- Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2727-2732
- Chialina SG, Fornes C, Landi C, de la Vega Elena CD, Nicolorich MV, Dourisboure RJ, Solano A, Solis EA. Microsatellite instability analysis in hereditary non-polyposis colon cancer using the Bethesda consensus panel of microsatellite markers in the absence of proband normal tissue. *BMC Med Genet* 2006; 7: 5
- Liu SR, Zhao B, Wang ZJ, Wan YL, Huang YT.

- Clinical features and mismatch repair gene mutation screening in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2647-2651
- 7 Church J, Simmang C. Practice parameters for the treatment of patients with dominantly inherited colorectal cancer (familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1001-1012
- 8 Müller A, Beckmann C, Westphal G, Bocker Edmonston T, Friedrichs N, Dietmaier W, Brasch FE, Kloor M, Poremba C, Keller G, Aust DE, Fass J, Büttner R, Becker H, Rüschoff J. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 632-641
- 9 Sheng JQ, Chan TL, Chan YW, Huang JS, Chen JG, Zhang MZ, Guo XL, Mu H, Chan AS, Li SR, Yuen ST, Leung SY. Microsatellite instability and novel mismatch repair gene mutations in northern Chinese population with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 197-205
- 10 钦伦秀. 肿瘤的分子诊断与预测. 上海: 上海科技教育出版社, 2006: 369-402
- 11 郑树. 结直肠肿瘤基础研究与临床实践. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 268-280
- 12 Grizzle WE, Semmes OJ, Basler J, Izbicka E, Feng Z, Kagan J, Adam BL, Troyer D, Srivastava S, Thornquist M, Zhang Z, Thompson IM. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: A study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004; 22: 337-343
- 13 Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2005; 47: 885-893; discussion 893-894
- 14 Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, Yang BX, He DC, Zhao XJ. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl* 2006; 8: 45-51

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

# 肺癌转移致梗阻性黄疸3例

余昌中, 于聪慧, 奈超, 田驹

## ■背景资料

梗阻性黄疸最常见的原因是胆道及胆总管结石和胆道、胰头部及十二指肠乳头肿瘤, 临近的腹腔器官疾病如胃十二指肠溃疡穿透及胆道, 或肿瘤浸润也可致胆道梗阻出现黄疸。

余昌中, 于聪慧, 奈超, 田驹, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科北京市 100700

通讯作者: 余昌中, 教授, 主任医师, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科. yuchangzhong65@sohu.com  
收稿日期: 2011-02-10 修回日期: 2011-04-20  
接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-05-08

## Diagnosis and treatment of obstructive jaundice in patients with biliary and pancreatic metastases of lung adenocarcinoma: an analysis of three cases

Chang-Zhong Yu, Cong-Hui Yu, Chao Nai, Ju Tian

Chang-Zhong Yu, Cong-Hui Yu, Chao Nai, Ju Tian, Department of Hepatobiliary Surgery, the Military General Hospital of Beijing of Chinese PLA, Beijing 100700, China  
Correspondence to: Professor Chang-Zhong Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Military General Hospital of Beijing of Chinese PLA, Beijing 100700, China. yuchangzhong65@sohu.com  
Received: 2011-02-10 Revised: 2010-04-20  
Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-05-08

## Abstract

Jaundice is a common finding in patients admitted to hepatobiliary units. The main reasons for obstruction of the common bile duct are bile duct stones, malignant tumors of the pancreas and, in a substantial proportion of patients, bile duct cancer. Obstructive jaundice caused by biliary and pancreatic metastases of pulmonary adenocarcinoma is rare. Routine chest X-ray and further computed tomography scan of the lungs are main ways to find primary pulmonary tumors and can decrease the risk of misdiagnosis.

Key Words: Obstructive jaundice; Biliary metastasis; Pancreatic metastasis; Lung adenocarcinoma

Yu CZ, Yu CH, Nai C, Tian J. Diagnosis and treatment of obstructive jaundice in patients with biliary and pancreatic metastases of lung adenocarcinoma: an analysis of three cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(13): 1422-1423

## ■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

## 摘要

梗阻性黄疸是肝胆外科常见的临床症状, 其主

要原因是胆道及胆总管结石和胆道、胰头部及十二指肠乳头肿瘤。肺癌转移至胰头、壶腹周围等引起梗阻性黄疸临床少见。常规而认真的检查如胸部X线片及CT扫描是发现肺部原发肿瘤的主要方法, 可减少漏诊, 应引起临床上的重视。

关键词: 梗阻性黄疸; 胆道; 胰腺; 肺癌

余昌中, 于聪慧, 奈超, 田驹. 肺癌转移致梗阻性黄疸3例. 世界华人消化杂志 2011; 19(13): 1422-1423

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1422.asp>

## 0 引言

梗阻性黄疸最常见的原因是胆总管结石和胆道、胰头部及十二指肠乳头肿瘤。肾癌、乳腺癌等可转移至胰腺引起梗阻性黄疸<sup>[1,2]</sup>。肺癌转移至胰头、壶腹周围等引起梗阻性黄疸临床少见<sup>[3]</sup>。本文对原发肺癌转移至胆总管壶腹周围和胰头部的肿瘤引起梗阻性黄疸3例进行临床诊治分析。

## 1 病例报告

例1: 女, 41岁, 主因皮肤巩膜黄染2 wk入住某县医院, 诊断“壶腹周围癌”, 拟行剖腹探查、胰十二指肠切除术, 后转来中国人民解放军北京军区总医院。查体发现右锁骨上淋巴结肿大, 约1.5 cm×1.0 cm×1.0 cm, 胸片示右肺结节阴影, 再行肺CT检查考虑肺癌。局麻下切除右锁骨上淋巴结组织活检, 病理诊断: 淋巴结转移性低分化癌, 免疫组织化学染色后考虑肺腺癌或腺鳞癌转移。免疫组织化学染色显示: CK7(+), TTF(+), p63(少许+), CK20(-), Hepatocyte(-), CK5/6(-), G-15(-), MG(-), Villin(-)。行腹部增强CT检查, 发现肝内外胆管扩张, 胆总管中段直径2.5 cm, 胆总管壶腹周围部肿物, 大小3 cm×3.5 cm×2 cm。血生化TBIL 346.5 μmol/L, DBIL 237.6 μmol/L, ALP 568 U/L, r-GT 894 U/L。CEA 540.1 μg/L, CA19-9 76.87 kU/L。全麻下行胆总管壶腹部肿瘤部分切除、胆肠吻合、胃空肠吻合术, 术中探查十二指肠乳头肿瘤, 质硬, 切开十二指

肠前壁, 见胆总管末端壶腹部质硬肿物, 突出于肠腔内, 约3 cm×4 cm×2 cm大小, 取部分送冰冻病理报告腺癌, 石蜡病理及免疫组织化学确诊为肺腺癌转移. 免疫组织化学染色结果: CK7(+), TTF(+), CK20(-), Syn(-), CDX-2(-), CgA(-), Villin(-). 术后患者恢复顺利, 术后1 mo患者黄疸消失, 饮食正常, 采用“NP方案”化疗, 共6个周期, 术后患者生存11 mo后死于肺部感染、急性呼吸功能衰竭.

例2: 男, 58岁, 主因皮肤巩膜黄染20余天入院. 既往史: 3年前查体时发现肺部阴影, 住某三甲医院行肺穿刺诊断为“左肺中分化腺癌, 纵隔淋巴结转移”, 进行“GO方案”化疗, 共8个周期, 复查胸部CT提示左肺癌有进展. 20 d前因眼黄、尿黄查腹部B超示肝内外胆管扩张, 胆囊增大, 胰头区低回声, 肝门多发实性低回声, 胰头上方、胰体下方低回声结节, 考虑淋巴结肿大. 血生化TBIL 593.7 μmol/L, DBIL 327.6 μmol/L, ALP 764 U/L, r-GT 1 435 U/L, 诊断: (1)左肺腺癌, IV期; (2)胰头转移癌, 腹腔淋巴结转移癌. 行经皮肝穿刺胆管引流术, 术后黄疸逐渐消退, 生存8 mo后死亡.

例3: 男, 68岁, 主因皮肤巩膜黄染40 d入院. 患者饮食差, 消瘦, 咳嗽, 有憋闷感, 腹部B超及CT检查提示胰头肿物, 3.8 cm×4.7 cm×3.5 cm大小, 肝内外胆管扩张, 血生化TBIL 305.5 μmol/L, DBIL 165.1 μmol/L, ALP 658 U/L, r-GT 1 324 U/L, 胸部X线是左肺门大块阴影, 双侧中等量胸腔积液, 胸部CT检查诊断左肺门癌. 诊断: (1)左肺门癌, IV期; (2)胰头转移癌. 患者拒绝进一步治疗, 出院后1 mo死亡.

## 2 讨论

梗阻性黄疸最常见的原因是胆道及胆总管结石和胆道、胰头部及十二指肠乳头肿瘤, 临近的腹腔器官疾病如胃十二指肠溃疡穿透侵及胆道, 或肿瘤浸润也可致胆道梗阻出现黄疸. 全身其他部位的肿瘤如恶性黑色素瘤、恶性淋巴瘤、肾癌、乳腺癌等可转移至胰腺引起梗阻性黄疸<sup>[1,2]</sup>. 肺癌转移至胰头、壶腹周围等引起梗

阻性黄疸临床少见. 而黄疸出现在肺癌有临床症状之前罕见. 如果对于这种病例未能在手术前明确诊断黄疸原因是肺癌转移引起, 可能会错误的以胆管癌或胰腺癌为原发病进行胰十二指肠切除手术, 患者遭受不必要的大手术创伤和手术风险. 术前查找肺部有无原发肿瘤并不困难, 常规胸片可发现异常结节影, 再行胸部CT多可明确诊断, 对于出现周围淋巴结肿大的患者, 应常规进行活检获得病理诊断. 例1患者因梗阻性黄疸、壶腹周围癌为主要表现而拟行胰十二指肠切除术, 经过常规、认真的术前检查, 发现右肺癌转移是梗阻性黄疸、壶腹周围占位的可能原因, 在剖腹手术后发现胆总管末端壶腹部肿瘤与右锁骨上淋巴结组织在石蜡病理和免疫组织化学表达的一致性证实了该诊断. 患者采取了姑息的减黄手术及术后化疗, 提高了术后生活质量, 术后11 mo死于肺部感染、急性呼吸功能衰竭. 肺癌出现远处器官转移多见于肺腺癌或腺鳞癌, 已属临床IV期, 常常伴有纵隔淋巴结转移等, 失去手术根治机会, 治疗以化疗和/或联合放射治疗、局部射频消融为主, 可选择以健择为主的化疗方案或NP、GO等方案<sup>[4]</sup>, 预后较差. 对于因肺癌转移引起的梗阻性黄疸, 可采用手术进行胆肠内引流减黄, 或经皮肝穿刺胆道引流、经十二指肠镜逆行胆管内放置塑料支架或金属支架引流胆汁, 以改善患者肝功能及全身情况, 提高生活质量, 延长生存期.

## 3 参考文献

- 1 Adsay NV, Andea A, Basturk O, Kilinc N, Nassar H, Cheng JD. Secondary tumors of the pancreas: an analysis of a surgical and autopsy database and review of the literature. *Virchows Arch* 2004; 444: 527-535
- 2 Kitamura N, Murata S, Abe H, Hanasawa K, Tsukashita S, Tani T. Obstructive jaundice in a metastatic tumor of the pancreas from breast cancer: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 93-97
- 3 侯安继. 左上肺腺癌以胰腺为首发症状一例. *临床内科杂志* 2006; 23: 524
- 4 Berghmans T, Gourcerol D, Lafitte JJ, Kotsori K, Paesmans M, Scherpereel A, Leclercq N, Sculier JP. Mitomycin plus vinorelbine salvage chemotherapy in non-small cell lung cancer: a prospective study. *Lung Cancer* 2008; 61: 378-384

## 同行评价

本文科学性较好, 具有一定的临床意义.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇