

# 胃肠道间质瘤临床病理分级及基因分型的研究进展

白辰光, 马大烈

白辰光, 马大烈, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科上海市 200433  
马大烈, 主任医师, 主要从事肿瘤病理和免疫病理研究, 近年来专于胃肠道间质瘤和淋巴瘤的相关研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30972876  
作者贡献分布: 本文由白辰光综述; 马大烈设计和审校。  
通讯作者: 马大烈, 教授, 200433, 上海市杨浦区长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科。  
madalie@126.com  
电话: 021-81873692  
收稿日期: 2011-03-04 修回日期: 2011-04-23  
接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Advances in clinicopathological classification and genotyping of gastrointestinal stromal tumors

Chen-Guang Bai, Da-Lie Ma

Chen-Guang Bai, Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972876  
Correspondence to: Professor Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 168 Changhai Road, Yangpu District, Shanghai 200433, China. madalie@126.com  
Received: 2011-03-04 Revised: 2011-04-23  
Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

In recent years, the discovery of new markers and advances in mutation detection technologies have made it easy to diagnose gastrointestinal stromal tumor (GIST). However, it is still difficult to predict the biological behavior of GIST. Currently, the most prevalent GIST classification systems, including the National Institutes of Health (NIH) consensus criteria for assigning risk to gastrointestinal stromal tumors (2008 Revision) and the International Union Against Cancer TNM classification of malignant tumors (2010 version), are based on tumor size, mitotic rate, tumor location, and presence of a tumor rupture or not. Molecular genetic studies have shown that genotype of GIST is closely related to tumor prognosis and response to imatinib mesylate.

**Key Words:** Gastrointestinal stromal tumor; Classification; Clinicopathology; Genotype

Bai CG, Ma DL. Advances in clinicopathological classification and genotyping of gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1431-1435

## 摘要

近年来, 随着新的标志物的发现和基因突变检测的逐步开展, 胃肠道间质瘤的病理诊断已不再是临床工作的难点, 但是其生物学行为仍然难以预料, 判断时需综合考虑肿瘤的大体, 组织学形态和临床情况。现在应用最为广泛的肿瘤分级分期方案主要是美国国立卫生研究院的侵袭危险度分级方案(2008年修订版)和国际抗癌联盟的TNM肿瘤分期方案(2010版), 分级分期指标涉及肿瘤大小、核分裂指数、肿瘤部位和肿瘤是否破裂等。胃肠道间质瘤分子基因学的深入研究表明, 基因突变类型与肿瘤预后和伊马替尼(imatinib)反应性密切相关, 但仍有待进一步细化。

**关键词:** 胃肠道间质瘤; 分级; 临床病理; 基因表型

白辰光, 马大烈. 胃肠道间质瘤临床病理分级及基因分型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1431-1435  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1431.asp>

## 0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤<sup>[1-3]</sup>。研究陆续发现, GIST大多存在*c-kit*基因和PDGFRA基因的功能获得性突变, 并且存在c-Kit蛋白(CD117)特异性的阳性表达, 为GIST的病理诊断提供了良好的标志物<sup>[3-5]</sup>。随着诊断标志物的发现和基因突变检测的逐步开展, GIST的病理诊断已不再是临床工作的难点。但是, GIST的生物学行为仍然难以预料, 尚没有统一的分级标准<sup>[1,6]</sup>, 判断时需综合考虑肿瘤的大体、组织学形态和临床情况。因此, 我们以此为题对相关进展及需要注意的问题进行叙述。

## ■背景资料

特异性诊断标志物的发现和基因突变检测的广泛开展, 使得胃肠道间质瘤的病理诊断已不再是临床工作的难点, 但是其生物学行为难以预料, 判断时需综合考虑肿瘤的大体, 组织学形态和临床情况, 尚缺乏统一的标准。

## ■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

### ■ 研发前沿

目前胃肠道间质瘤的相关研究主要集中在肿瘤分子基因学特征和特异性基因靶向治疗药物开发方面。

表 1 原发GIST切除术后侵袭危险性分级(2008修订版)

侵袭危险性	肿瘤最大径(cm)	核分裂计数(/50HPF)	肿瘤原发部位
极低度	≤2.0	≤5	任何部位
低度	2.1-5.0	≤5	任何部位
中度	≤5	6-10	胃
	5.1-10.0	≤5	胃
高度	>10	任何数量	任何部位
	任何大小	>10	任何部位
	>5	>5	任何部位
	2.1-5.0	>5	非胃来源
	5.1-10.0	≤5	非胃来源

肿瘤发生腹腔内破裂者不论大小和核分裂情况均归入高度侵袭危险性。

## 1 GIST病理分级进展

GIST的生物学行为从良性到显著恶性不等,良恶性之间并无截然界限,从良性到恶性是一种渐进的过程,即随着肿瘤的生长,GIST的恶性特征会逐渐显现。即使是直径小于1 cm的肿瘤也可能存在相关基因的突变,甚至可以复发或转移<sup>[6]</sup>。判断GIST的生物学行为需综合考虑肿瘤的大体特征、组织形态和临床情况,尚无统一的病理分级标准<sup>[1,6]</sup>。目前比较流行的是美国国立卫生研究院(NIH)共识方案<sup>[7,8]</sup>和美国军队病理研究所(AFIP)方案<sup>[2,9]</sup>,均以肿瘤大小、核分裂计数和肿瘤原发部位作为分类指标,其中以NIH方案应用更为广泛。

2001年Fletcher等<sup>[7]</sup>学者在美国国立卫生研究院会议上形成共识,根据肿瘤大小和核分裂象计数将肿瘤分为8类,并进一步分为极低度、低度、中度和高度共4个侵袭危险性等级。该共识方案也被称为Fletcher标准,他使用侵袭危险性分级,避免了良恶性这一敏感用语,且分类涉及指标少,易于掌握,又与肿瘤预后紧密联系,被临床和病理医生广泛应用和研究<sup>[10-13]</sup>。

随着研究和应用的不断深入,人们发现不同部位的肿瘤预后也不一致,因此,Miettinen等<sup>[2,9]</sup>提出了新的方案(AFIP方案),根据肿瘤大小,核分裂计数和肿瘤发生部位3个因素将肿瘤分为8组,并进行了恶性潜能预测。由于肿瘤破裂导致的腹腔内污染也是一项极有价值的临床预后指标<sup>[8,14]</sup>,美国国立卫生研究院在2008-04再次讨论并报道了新的原发性GIST侵袭危险性评估方案(表1),在原有基础上加入原发肿瘤部位(非原发于胃的GIST较原发胃的GIST预后差)和肿瘤破

表 2 UICC GIST TNM分期方案

大小(cm)	核分裂(/50HPF)	T分期	胃	非胃
≤2	≤5	T1	I A	I
2-5	≤5	T2	I A	I
5-10	≤5	T3	I B	II
>10	≤5	T4	II	III A
≤2	>5	T1	II	III A
2-5	>5	T2	II	III B
5-10	>5	T3	III A	III B
>10	>5	T4	III B	III B

存在淋巴结转移和/或远处转移的病例归为IV期。

裂作为预后的评估指标<sup>[8]</sup>。

我国学者也根据自己的研究提出了GIST分级方案<sup>[15]</sup>,但是涉及指标过多,应用较为复杂,限制了其临床推广。因此,2009年出版的《中国胃肠道间质瘤诊断治疗共识》<sup>[16]</sup>仍然推荐使用美国国立卫生研究院修订方案。

## 2 临床分级进展

2010年国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)出版了新的TNM癌症分期目录<sup>[17]</sup>,参考了AFIP分级方案,根据GIST肿瘤大小分为T1、T2、T3和T4,并结合核分裂象指数和肿瘤部位进行分期(表2),另将存在淋巴结转移和/或远处转移的病例归为IV期。

## 3 基因表型分型及进展

大量研究证实,GIST存在特征性的基因改变,根据已发现的相关基因改变可将肿瘤分为3类<sup>[18]</sup>,即:*c-kit*基因突变型(80%-85%)、PDGFRα基因突变型(5%-10%)和野生型(约10%)。进一步研究提示,基因突变检查对于预后和药物反应有重要作用<sup>[19-21]</sup>。

原癌基因*c-kit*位于4q11-12,其中外显子(exon)9、11、13和17易发生突变,按照发生频率的高低依次为: exon11(60%-70%)、exon9(5%-15%)、exon13(1%)和exon17(1%)。*c-kit*基因exon11突变多位于5'端,表现为一个或数个密码子的缺失,集中于550位和561位之间。*c-kit*基因exon11突变20%-30%为点突变,几乎只涉及4个密码子,包括5'端的557、559、560和3'端的576位。*c-kit*基因exon11突变少数表现为1-20几个密码子的串联重复插入突变,发生于3'端,多位于胃,预后较好<sup>[25]</sup>。*c-kit*基因exon9突变多数为

AY502-3重复插入突变, 几乎均特异性地见于小肠GIST, 生物学行为更为恶性<sup>[10,24,25]</sup>. 总的来说, 存在*c-kit*基因exon11点突变和插入突变的GIST患者预后较好, 而存在exon11删除突变和exon9突变者预后较差<sup>[9,22-25]</sup>. 临床药物研究进一步提示, 存在*c-kit*基因exon11突变的患者对靶向药物伊马替尼标准剂量400 mg/d反应好, 而存在exon9突变者则需提高用药剂量, 采用800 mg/d治疗可能有效<sup>[20,21]</sup>.

PDGFRa基因也位于4q11-12, 总突变率在10%左右, 按照外显子突变频率的高低依次为: exon18、exon12、exon14. 大多数(>80%)发生在PDGFRa基因exon18的突变表现为D842V. PDGFRa基因exon12的突变极少, 大多数表现为V561D. 其他突变类型发生的比率均<1%<sup>[26-28]</sup>. 研究发现存在PDGFRa基因突变的GIST大多发生于胃, 生物学行为较为惰性<sup>[28-32]</sup>, 且多数病例对靶向药物伊马替尼治疗不敏感, 其中存在D842V突变者明显耐药, 但仍有约1/3的病例可能对伊马替尼治疗有反应<sup>[33-36]</sup>.

还有约10%的GIST病例不存在*c-kit*基因或PDGFRa基因突变, 被称为野生型GIST<sup>[18]</sup>. 其中极少数GIST与I型神经纤维瘤病相关, 表现为NF1等位基因的失活<sup>[37]</sup>. 近期有研究显示, 约7%的野生型GIST存在BRAF基因突变, 表现为exon15 V600E, 多位于小肠, 对伊马替尼治疗不敏感<sup>[38]</sup>.

总之, 对GIST进行分子基因分型将有助于判断肿瘤患者的预后和预测肿瘤对伊马替尼的反应性, 并必将与新型靶向药物的反应性有关, 因此是十分必要的, 但仍有待进一步细化.

#### 4 影响准确分级分期的几个问题

4.1 核分裂计数难以标准化 核分裂象计数是目前GIST各分级分期方案中公认的独立指标, 但是在HE切片上准确计数核分裂象是不容易的. 此外, 因为存在核碎裂、凋亡细胞和不规则核的炎症细胞的干扰, 常容易使人过计数<sup>[1]</sup>. 目前各分级分期方案中核分裂计数方法不一, 在计数区域选择和计数范围大小上不甚一致<sup>[2,9,17,39-41]</sup>. 从我们的经验看, 至少应计数30个HPF以上, 如果仅计数10个HPF常会导致错误计数. 我们推荐至少要在细胞丰富区连续计数50个HPF, 且核分裂象必须是确定无疑的.

4.2 肿瘤是否存在破裂 肿瘤破裂导致的腹腔内污染是一项极有价值的临床预后指标<sup>[8,14]</sup>, 无论

是自发性破裂或者手术中发生的破裂, 均应记录在病案中, 并告知病理医师. 手术医师也应尽量保持肿瘤的完整性, 避免手术中肿瘤发生破裂, 特别是避免浆膜面肿瘤发生破裂, 以减少腹腔种植的发生机会. 而对于多发性肿瘤, 应适当扩大检查和手术范围, 尽可能清除微小病灶.

4.3 基因检测有待标准化 基因突变类型对于GIST预后判断和靶向药物疗效预测有重要作用<sup>[19]</sup>, 但是影响基因突变检测成功率和准确性的因素很多. 首先应该保证标本的有效保存, 石蜡标本的固定时间应>6 h或过夜, 以保证DNA提取的质量. 其次应注意引物的设计和应用, 扩增片段要覆盖整个外显子, 以保证邻近3'和5'端发生的突变均能被有效检出.

#### 5 结论

诊断标志物的发现和基因突变检测的逐步开展使得GIST的病理诊断不再困难, 但其生物学行为仍然难以预料, 尚缺乏统一标准. 目前公认的分级分期指标涉及肿瘤大小、核分裂指数、肿瘤部位和肿瘤是否破裂等, 且核分裂计数方法有待统一. 此外, GIST分子基因学的深入研究显示, 基因突变类型与肿瘤预后和伊马替尼反应性密切相关, 但仍有待进一步细化.

#### 6 参考文献

- 1 Agaimy A. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 461-471
- 2 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70-83
- 3 Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT. Use of c-KIT/PDGFRa mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004; 40: 689-695
- 4 Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580
- 5 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRa activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
- 6 马大烈, 白辰光. 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2367-2371

#### ■创新盘点

本文在介绍胃肠道间质瘤临床病理分级的同时, 对分子基因学研究进展进行了总结, 并对影响临床病理分级分期准确性的关键因素进行了讨论.

## ■应用要点

本文的实际应用价值在于总结胃肠道间质瘤临床病理分级和基因分型进展,并提出了实际应用中需要注意的问题,有助于提高临床病理分级的准确性。

- 7 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- 8 Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411-1419
- 9 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
- 10 Gold JS, Gönen M, Gutiérrez A, Broto JM, García-del-Muro X, Smyrk TC, Maki RG, Singer S, Brennan MF, Antonescu CR, Donohue JH, DeMatteo RP. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1045-1052
- 11 Sanchez Hidalgo JM, Rufian Peña S, Ciria Bru R, Naranjo Torres A, Muñoz Casares C, Ruiz Rabelo J, Briceno Delgado J. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a prospective evaluation of risk factors and prognostic scores. *J Gastrointest Cancer* 2010; 41: 27-37
- 12 Vallböhmer D, Marcus HE, Baldus SE, Brabender J, Lurje G, Drebber U, Metzger R, Hölscher AH, Schneider PM. Comparative analysis of four histopathological classification systems to discriminate benign and malignant behaviour in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* 2008; 28: 367-372
- 13 Dematteo RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer* 2008; 112: 608-615
- 14 Takahashi T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Hirota S, Sawa Y, Nishida T. An enhanced risk-group stratification system for more practical prognostication of clinically malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Oncol* 2007; 12: 369-374
- 15 Hou YY, Lu SH, Zhou Y, Qi WD, Shi Y, Tan YS, Zhu XZ. Stage and histological grade of gastrointestinal stromal tumors based on a new approach are strongly associated with clinical behaviors. *Mod Pathol* 2009; 22: 556-569
- 16 中国胃肠道间质瘤专家组. 中国胃肠道间质瘤诊断治疗共识. *中华病理学杂志* 2009; 38: 697-702
- 17 Sobin LH, Wittekind CH, eds. International union against cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2010
- 18 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96
- 19 Merkelbach-Bruse S, Dietmaier W, Füzesi L, Gaumann A, Haller F, Kitz J, Krohn A, Mechtersheimer G, Penzel R, Schildhaus HU, Schneider-Stock R, Simon R, Wardelmann E. Pitfalls in mutational testing and reporting of common KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *BMC Med Genet* 2010; 11: 106
- 20 Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, Blay JY, Leyvraz S, Stul M, Casali PG, Zalcberg J, Verweij J, Van Glabbeke M, Hagemeyer A, Judson I. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1093-1103
- 21 Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CD, Ryan CW, von Mehren M, Blanke CD, Rankin C, Benjamin RS, Bramwell VH, Demetri GD, Bertagnolli MM, Fletcher JA. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5360-5367
- 22 Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, Heinicke T, Pietsch T, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2003; 106: 887-895
- 23 Martín J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, López-Guerrero JA, García del Muro J, Maurel J, Calabuig S, Gutierrez A, González de Sande JL, Martínez J, De Juan A, Laínez N, Losa F, Alija V, Escudero P, Casado A, García P, Blanco R, Buesa JM. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005; 23: 6190-6198
- 24 Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P. Association of KIT exon 9 mutations with non-gastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3329-3337
- 25 Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M, Schneider-Stock R, Stachura T, Kordek R, Michal M, Boltze C, Roessner A, Stachura J, Miettinen M. KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum Pathol* 2003; 34: 1306-1312
- 26 Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5357-5364
- 27 Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M. c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 479-488
- 28 王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈. 胃肠道间质瘤组织中PDGFR $\alpha$ 和C-kit基因突变和蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2300-2305
- 29 Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, Oosterom AV, Hagemeyer A, Sciot R. Differential expression of KIT/PDGFR $\alpha$  mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Mod Pathol* 2004; 17: 889-894
- 30 Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, Losen I, Manegold C, Büttner R, Pietsch T. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations

- with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004; 6: 197-204
- 31 Lasota J, Stachura J, Miettinen M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 2006; 86: 94-100
- 32 Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004; 84: 874-883
- 33 Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeijer A, Van Oosterom A, Marynen P. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005; 128: 270-279
- 34 Weisberg E, Wright RD, Jiang J, Ray A, Moreno D, Manley PW, Fabbro D, Hall-Meyers E, Catley L, Podar K, Kung AL, Griffin JD. Effects of PKC412, nilotinib, and imatinib against GIST-associated PDGFRA mutants with differential imatinib sensitivity. *Gastroenterology* 2006; 131: 1734-1742
- 35 Dewaele B, Wasag B, Cools J, Sciot R, Prenen H, Vandenberghe P, Wozniak A, Schöffski P, Marynen P, Debiec-Rychter M. Activity of dasatinib, a dual SRC/ABL kinase inhibitor, and IPI-504, a heat shock protein 90 inhibitor, against gastrointestinal stromal tumor-associated PDGFRA842V mutation. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5749-5758
- 36 杨蕾, 白辰光, 侯晓炜, 马大烈, 刘晓红. 胃肠道间质瘤相关基因突变体对格列卫敏感性. *中国肿瘤临床* 2010; 37: 301-305
- 37 Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciot R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch JR, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1015-1023
- 38 Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, Maki RG, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3204-3215
- 39 Agaimy A, Haller F, Gunawan B, Wünsch PH, Füzesi L. Distinct biphasic histomorphological pattern in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with common primary mutations but divergent molecular cytogenetic progression. *Histopathology* 2009; 54: 295-302
- 40 Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyoryffy H, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 625-641
- 41 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors presenting as omental masses--a clinicopathologic analysis of 95 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1267-1275

■同行评价  
本文科学性和可读性较好, 对临床和病理医师有一定的参考价值。

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32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500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1 980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)

# 甲胎蛋白的生物学功能

李朝英, 李刚

## ■背景资料

AFP作为一个肿瘤相关的胎儿蛋白, 长期以来被作为检测胎儿缺陷或肿瘤发生的一个血清标志物。在成人的肝细胞癌中70%-85%都有AFP非正常表达。有些学者把AFP作为癌症不良预后的独立预报器。同时血清AFP水平的升高与肝细胞癌的恶性特征密切相关。

李朝英, 李刚, 北京大学医学部生物化学与分子生物学系 北京市 100191

李刚, 教授, 主要从事甲胎蛋白生物学功能方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072710

北京市自然科学基金资助项目, No. 7101006

通讯作者: 李刚, 教授, 100191, 北京市海淀区学院路38号, 北京

大学医学院生物化学与分子生物学系, ligang55@bjmu.edu.cn

电话: 010-82802891

收稿日期: 2010-12-21 修回日期: 2011-04-25

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Biological functions of alpha-fetoprotein

Chao-Ying Li, Gang Li

Chao-Ying Li, Gang Li, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072710; and the Beijing Natural Science Foundation, No. 7101006

Correspondence to: Professor Gang Li, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, 38 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100191, China. ligang55@bjmu.edu.cn

Received: 2010-12-21 Revised: 2011-04-25

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

Alpha-fetoprotein (AFP) is a well-known biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Extracellular AFP can act as a carrier to transport a variety of ligands or as a growth regulator to control the growth of tumor cells, while intracellular AFP can bind to and interact with transcription factors or some key proteins and function as a signal molecule to regulate cell proliferation or apoptosis. This paper provides novel insights into the mechanisms underlying the role of AFP in carcinogenesis and tumor chemotherapy.

Key Words: Alpha-fetoprotein; Liver cancer; Signal molecule; Biological function

Li CY, Li G. Biological functions of alpha-fetoprotein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1436-1440

## ■同行评议者

周南进, 研究员, 江西省医学科学研究所

## 摘要

甲胎蛋白(AFP)不仅是肝细胞癌诊断的重要

标志物, 还在肝癌细胞的生长、增殖及凋亡等过程中发挥着重要的生物学作用。除了胞外的配体结合和运输功能, 以及作为生长调控因子刺激肿瘤细胞生长外, 细胞内的AFP还可以通过和转录因子或一些关键蛋白之间发生相互作用而作为信号分子参与对下游基因的转录调控或对信号通路产生影响。这些为我们研究AFP在肿瘤的癌变及化疗中的影响机制提供了新的思路。

关键词: 甲胎蛋白; 肝细胞癌; 信号分子; 生物学功能

李朝英, 李刚. 甲胎蛋白的生物学功能. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1436-1440

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1436.asp>

## 0 引言

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是一个胚胎特异的血清 $\alpha$ -球蛋白, 是哺乳动物早期胚胎血清中一个重要的组份<sup>[1]</sup>。正常情况下, AFP由胎儿肝脏或卵黄囊产生<sup>[2]</sup>。胎儿出生后, 血清中的AFP含量很快下降<sup>[3]</sup>。在成年人体内, AFP几乎检测不到或极其微量。目前, AFP的分子结构已经比较明确: 他是1个糖蛋白, 含有1个由寡聚糖组成的糖基, 总分子量约为69 000 Da<sup>[1]</sup>。其中蛋白部分为590个氨基酸组成的多肽链, 在N末端有19个氨基酸是信号肽序列, 计算机模拟推测AFP的分子有3个功能结构域, 其中第3个结构域是重点研究对象<sup>[1]</sup>。AFP作为一个肿瘤相关的胎儿蛋白, 长期以来被作为检测胎儿缺陷或肿瘤发生的一个血清标志物<sup>[4-7]</sup>。在成人的肝细胞癌中大约70%-85%都有AFP非正常表达<sup>[8,9]</sup>。有些学者把AFP作为癌症不良预后的独立预报器<sup>[10-12]</sup>。同时血清AFP水平的升高与肝细胞癌的恶性特征密切相关, 例如: 更大的肿瘤块、更多未分化的组织分型、大量的弥散型、入口静脉血栓症等<sup>[13-18]</sup>。而且, 已经报道的其他AFP阳性的癌症也表现出了更强的侵袭特性。然而, 对于高表达AFP的患者的不良预后的机制目前还不清楚<sup>[15]</sup>。体外研究表明, AFP可能通过AFP受体参与到多种细胞进程中, 如细胞分化、生长、凋亡、细胞因子的

产生、免疫抑制及肿瘤发生等<sup>[19,20]</sup>。实际上, 手术后AFP高表达组患者平均比AFP低表达组存活期短得多。大多数抗肿瘤药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥作用的, 但是这些抗癌剂对肝细胞癌却几乎没什么疗效<sup>[21]</sup>。研究发现高表达AFP的病例具有明显的低凋亡诱导指数, 而由肝癌细胞分泌的AFP在保护癌细胞逃避免疫系统方面的作用已经被证实。大约20%的肝癌患者AFP表达正常, 这些患者比AFP高表达组的预后要好些。可能与这些患者体内没有AFP发挥潜在的生物学活性有关<sup>[21]</sup>。AFP的生物学功能是AFP研究中最错综复杂的领域。由于他与肝癌的发生和高死亡率密切相关, 其生理及病理学作用近年来引起广泛的关注<sup>[9,22-25]</sup>。最早报道人类AFP在妊娠和癌症中的生物学活性是在20世纪80年代中后期。随着20世纪90年代AFP在胎儿和肿瘤生长中的生理学作用得到进一步的证实, 使得AFP在人类疾病治疗中发挥作用有了可能性<sup>[26]</sup>。在过去的10年中, 对AFP功能的研究已经取得了引人注目的进展。

## 1 AFP的生物学功能

**1.1 配体结合及运输功能** AFP属于类白蛋白家族成员, 与白蛋白相似。长期以来, 他的结合及运输配体被作为胎儿发育期间一个主要功能。在与其生物活性相关的多篇文献中都报道了人类的AFP可以结合和运输许多配体, 比如胆红素、脂肪酸、类视黄醇、类固醇、重金属、染料、黄酮类、植物雌激素、二氧(杂)芑及各种药物<sup>[27-29]</sup>。自20世纪90年代中期以来, 有越来越多的关于利用人类的AFP作为载体来运输抗癌药物的报道, 显示人的AFP已可以通过受体介导的胞吞作用选择性地进入肿瘤细胞<sup>[30,31]</sup>。已有文献报道人的AFP可以和多种抗癌药物成功结合, 如: 阿霉素、柔红霉素、顺铂和甲氨蝶呤等<sup>[32]</sup>。体外实验证明, 结合了AFP的抗癌药物对于体外培养的人源肿瘤细胞在细胞毒性上表现出高度的选择性<sup>[33]</sup>。

**1.2 细胞外AFP作为生长调控因子的作用** 近10年来, 对细胞外AFP的生物学功能的研究取得了一定的进展。由于分泌到循环系统的AFP能促进细胞生长, 因此被定义为个体发育和肿瘤进展生长调控因子<sup>[22,26]</sup>。AFP可以促进肿瘤和正常细胞的增殖, 其活性具有多效性, 包括影响细胞分化, 生长调控和肿瘤发生进程等<sup>[25,34]</sup>。哺乳动物的AFP可以促进一系列细胞(体外)或动物模型

(体内)的生长。作为自分泌因子, 在一定的浓度和环境条件下, AFP可以促进多种肿瘤细胞的增殖。体外数据表明, AFP能够刺激或抑制细胞的生长活性, 这依赖于外源性AFP的相对浓度或内源性细胞因子、激素或培养液中的细胞因子等因素<sup>[29]</sup>。有文献指出, AFP调控肝癌细胞的发展及生长是通过逃避了来自Fas/FasL通路的免疫监视<sup>[35]</sup>。AFP还通过终止caspase-3级联反应来促进细胞生长, 该级联反应是肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体诱导凋亡的主要通路<sup>[36]</sup>。临床研究证实, AFP水平的高低与肝细胞癌的进展存在潜在的关联, 他可以为肝细胞癌患者的治疗效果起到监测作用<sup>[37-39]</sup>。

**1.3 细胞内AFP作为信号分子发挥作用** 近几年来, 对于分布在肝癌细胞质内的AFP的生物学功能的研究, 也取得了很大的进展。有文献报道, 细胞内AFP可能通过结合关键蛋白质从而作为一个信号分子参与细胞的生长或凋亡信号通路。这些发现主要依赖于对AFP分子结构的分析: 即人类的AFP的第3个结构域中含有一个异二聚体化的基序, 该基序是一个亮氨酸拉链样的结构, 主要位于第3个结构域的C末端。该二聚体化区域根据预测具有类固醇/甲状腺受体超家族成员最后100个氨基酸的分子特性<sup>[40]</sup>, 即有多个连续或非连续的7-8个疏水性氨基酸组成的重复序列, 这与甲状腺/视黄醇超家族成员的氨基酸延伸序列非常相似。其中AFP与维甲酸受体RAR的保守序列的匹配程度达到了50%-60%。他可能和一些转录因子(如维甲酸受体RAR)、生长因子及一些其他的蛋白质之间发生相互作用<sup>[41]</sup>。越来越多的实验证明了这一假设。目前的数据显示, 胞质内AFP能够通过干扰RA-RAR信号通路和caspase-3的级联反应来阻碍细胞凋亡的进程, 这些数据进一步证实了AFP作为胞内信号分子所发挥的重要作用<sup>[42,43]</sup>。

以RAR为例, 胞质中的AFP能够与RAR形成复合物, 从而阻断RA-RAR这一信号通路, 导致受RAR调控的下游基因的表达及其生物学效应可能都会潜在的受到AFP的影响。正常的成人体内是检测不到AFP的, 那么在肝细胞癌或肝脏再生时, 他的升高, 可能会阻碍细胞凋亡信号并促进细胞的生长。上述效应, 通过在AFP阳性细胞内的AFP基因沉默和在AFP阴性细胞内AFP基因过表达而进一步得到证实。这些结果揭示了细胞内AFP在肿瘤细胞生长及耐药性方面的作用。在这些研究中, 全反式维甲酸在治疗甲胎蛋

**■研发前沿**  
AFP的生物学功能是最错综复杂的领域。由于他与肝癌的发生和高死亡率密切相关, 其生理及病理学作用近年来引起广泛的关注。

### ■相关报道

Meng等用AFP基因的某些碱基片段作为表位目的基因,发现这些表位蛋白质具有抑制T淋巴细胞免疫应答的生物学作用,这说明AFP的某些结构域具有抑制T淋巴细胞的免疫学特性。

白阳性肝癌时的临床耐药机制,至少部分可以归因于细胞内较高的AFP水平。因此,若全反式维甲酸对肝癌化疗同AFP基因沉默相结合来进行,可能会提高这些药物的药效。AFP作为转录相关的调控因子,能够影响核受体和转录因子超家族成员同源或异源间的相互作用,这样AFP不需要直接作为核内的与DNA结合的转录抑制因子,而是通过影响这些胞质内转录因子的活性和定位从而影响基因的表达<sup>[43,44]</sup>。

研究表明,胞质内的AFP与PTEN分子有共定位现象,两者存在蛋白质之间的相互作用,并因此干扰了PI3K/AKT通路。PTEN可以通过调控细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成等来发挥肿瘤抑制子功能。作为基因的守护者,PTEN可以通过多种途径维护基因的稳定性。目前已证明PTEN的突变或缺失会导致AKT的激活和肿瘤的发生。而AKT的不正常激活对癌症的转移中发挥着关键作用。因此,AFP可以通过参与PTEN相关的信号通路来调控肝癌的进展。在高表达AFP的胎肝中,AFP通过与PTEN的结合来影响PI3K/AKT通路,或许可以部分揭示AFP在胎肝发育和分化中所发挥的作用。另一方面,PTEN基因本身也可能直接受RAR的调控,干扰RAR的信号通路可以导致PTEN蛋白表达的下调,总之,AFP对PTEN信号通路的影响可以通过直接或间接两条途径<sup>[45]</sup>。

最近,我们报道了胞质内的AFP可以和caspase-3形成复合物,从而阻断了来自caspase-8信号的传输<sup>[43]</sup>。这些结果表明胞质内的AFP可以发挥共抑制因子的作用来调控生长或凋亡的信号网络。上述这些可以使我们重新评估胞质内AFP的生物学意义和重要性。

**1.4 AFP分子中小肽段的作用** 在过去10年中,人类全长的AFP分子作为治疗试剂,在临床上用来治疗自身免疫性疾病已经成为现实。全长的AFP分子已被报道可以促进肿瘤细胞的增殖、细胞周期的进程及血管再生等,还可以抑制肿瘤的凋亡<sup>[21]</sup>。近年来,AFP分子的小肽段的生物学作用也成为研究的热点<sup>[46-48]</sup>。来自全长AFP的肽片段在蛋白分子内构成了一个“模块盒”状,并展示了一系列的生物学活性。目前已知全长的AFP分子内部有多个“肽盒”结构,他们展示了和“母体”分子不同的生物学特性。与全长的AFP分子相比,小AFP肽段在治疗中靶位点更为专一,因其比全长AFP治疗减少了不良反应,可以作为更专一更安全的治疗替代品<sup>[26]</sup>。

**1.5 AFP抑制免疫功能和诱导淋巴细胞凋亡** AFP的免疫抑制功能是在研究胎儿发育过程中发现的。在胎儿时期,有大量的AFP表达,因而人们认为AFP可能是胎儿抗母体免疫排斥的物质。研究发现,AFP能够抑制T淋巴细胞介导的细胞毒性,并能诱导抑制性T淋巴细胞,而这可能是AFP抑制母体免疫排斥胎儿的主要原因<sup>[49,50]</sup>。更多的研究发现,AFP分子的确具有抑制免疫的功能<sup>[51]</sup>。但是,对于AFP在肝癌发生过程中的免疫调节作用,我们却知之甚少。Meng等<sup>[51]</sup>用AFP基因的某些碱基片段作为表位目的基因,发现这些表位蛋白质具有抑制T淋巴细胞免疫应答的生物学作用,这说明AFP的某些结构域具有抑制T淋巴细胞的免疫学特性。体内研究发现,AFP能抑制肝癌患者T淋巴细胞免疫应答和诱导T淋巴细胞凋亡<sup>[52]</sup>。所以,Mizejewski和Gillespie等总结多年来人们对AFP功能的研究结果,提出AFP是一种免疫抑制蛋白质<sup>[53,54]</sup>。

## 2 结论

AFP是诊断原发性肝癌和卵黄囊肿瘤的重要标志物之一<sup>[55,56]</sup>。同时,AFP还在肝细胞癌中是一个关键的分子,参与到了细胞增殖、血管生成和凋亡等进程。这表明在肝细胞癌患者的癌症进程中,AFP可作为一个潜在调控因子,同时也可以作为治疗的靶目标。目前已经开始着手研究细胞内AFP的生物学作用,有文献倾向于把肿瘤生长与胞内AFP的生物学作用联系起来。细胞内的AFP能够结合不同的配体,包括脂肪酸、雌激素、甲状腺激素和维甲酸等,还可以和PTEN、caspase-3等这些关键蛋白分子发生相互作用,这些信号网络对胎儿肝脏或肿瘤的生长都发挥了很重要的作用。当然,我们还需要更多的实验数据来进一步证明胞内AFP的生物学效应和其内在机制。

## 3 参考文献

- 1 Abelev GI, Lazarevich NL. Alpha-fetoprotein (AFP): solved and unsolved problems. *MJM* 1996; 2: 127-134
- 2 Meehan RR, Barlow DP, Hill RE, Hogan BL, Hastie ND. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. *EMBO J* 1984; 3: 1881-1885
- 3 Tilghman SM, Belayew A. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 5254-5257
- 4 Jeng LB, Lee WC, Wang CC, Chen MF, Hsieh TT. Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-

- fetoprotein. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 219-220
- 5 Schefer H, Mattmann S, Joss RA. Hereditary persistence of alpha-fetoprotein. Case report and review of the literature. *Ann Oncol* 1998; 9: 667-672
  - 6 Horbelt D, Delmore J, Meisel R, Cho S, Roberts D, Logan D. Mixed germ cell malignancy of the ovary concurrent with pregnancy. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 662-664
  - 7 De Mees C, Bakker J, Szpirer J, Szpirer C. Alpha-fetoprotein: from a diagnostic biomarker to a key role in female fertility. *Biomark Insights* 2007; 1: 82-85
  - 8 Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Lee Y, Yang JQ, De la Rocha P, Duran SD, Hernandez J, Seja E, Potter DM, McBride WH, Finn R, Glaspy JA, Economou JS. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2817-2825
  - 9 Mizejewski GJ. Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2: 709-735
  - 10 Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 519-524
  - 11 Okuda K, Tanaka M, Kanazawa N, Nagashima J, Satomura S, Kinoshita H, Eriguchi N, Aoyagi S, Kojiro M. Evaluation of curability and prediction of prognosis after surgical treatment for hepatocellular carcinoma by lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *Int J Oncol* 1999; 14: 265-271
  - 12 Schmidt LE, Dalhoff K. Alpha-fetoprotein is a predictor of outcome in acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2005; 41: 26-31
  - 13 Tangkijvanich P, Anukularnkusol N, Suwangool P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, Poovorawan Y. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 302-308
  - 14 Amemiya H, Kono K, Mori Y, Takahashi A, Ichihara F, Iizuka H, Sekikawa T, Matsumoto Y. High frequency of c-Met expression in gastric cancers producing alpha-fetoprotein. *Oncology* 2000; 59: 145-151
  - 15 Koide N, Nishio A, Igarashi J, Kajikawa S, Adachi W, Amano J. Alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1658-1663
  - 16 Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, Tanikawa K. Prognostic significance of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1996; 111: 996-1001
  - 17 Nomura F, Ohnishi K, Tanabe Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer* 1989; 64: 1700-1707
  - 18 Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T, Klöppel G. The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* 1989; 14: 503-513
  - 19 Wang XW, Xie H. Alpha-fetoprotein enhances the proliferation of human hepatoma cells in vitro. *Life Sci* 1999; 64: 17-23
  - 20 Laderoute MP, Pilarski LM. The inhibition of apoptosis by alpha-fetoprotein (AFP) and the role of AFP receptors in anti-cellular senescence. *Anticancer Res* 1994; 14: 2429-2438
  - 21 Mitsuhashi N, Kobayashi S, Doki T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Takeuchi D, Suda K, Miura S, Miyazaki M. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e189-e197
  - 22 Mizejewski GJ, MacColl R. Alpha-fetoprotein growth inhibitory peptides: potential leads for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1243-1255
  - 23 Mizejewski GJ, Butterstein G. Survey of functional activities of alpha-fetoprotein derived growth inhibitory peptides: review and prospects. *Curr Protein Pept Sci* 2006; 7: 73-100
  - 24 Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein (AFP)-derived peptides as epitopes for hepatoma immunotherapy: a commentary. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 159-170
  - 25 Muehleman M, Miller KD, Dauphinee M, Mizejewski GJ. Review of Growth Inhibitory Peptide as a biotherapeutic agent for tumor growth, adhesion, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 441-467
  - 26 Mizejewski GJ. Therapeutic use of human alpha-fetoprotein in clinical patients: is a cancer risk involved? *Int J Cancer* 2011; 128: 239-242
  - 27 Terentiev AA, Moldogazieva NT. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry (Mosc)* 2006; 71: 120-132
  - 28 Deutsch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* 1991; 56: 253-312
  - 29 Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001; 226: 377-408
  - 30 Torres JM, Anel A, Uriel J. Alpha-fetoprotein-mediated uptake of fatty acids by human T lymphocytes. *J Cell Physiol* 1992; 150: 456-462
  - 31 Severin SE, Moskaleva EYu II, Posypanova GA, Belousova YuV VK, Luzhkov YuM R, Andreani J, Severin ES. Alpha-fetoprotein-mediated targeting of anti-cancer drugs to tumor cells in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37: 385-392
  - 32 Moskaleva EYu GA, Shmyrev II, Rodina AV, Mui-zhnek EL, Severin ES, Katukov VYu YM, Severin SE. Alpha-fetoprotein-mediated targeting--a new strategy to overcome multidrug resistance of tumour cells in vitro. *Cell Biol Int* 1997; 21: 793-799
  - 33 Severin SE, Posypanova GA, Katukov VU, Shmyrev II, Luzhkov YuM GK, Zhukova OS, Vorozhtsov GN, Kaliya OL, Lukyanets EA, Severin ES. Antitumor activity of conjugates of the oncofetal protein alpha-fetoprotein and phthalocyanines in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 873-881
  - 34 Vakharia D, Mizejewski GJ. Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63: 41-52
  - 35 Li M, Liu X, Zhou S, Li P, Li G. Effects of alpha fetoprotein on escape of Bel 7402 cells from attack of lymphocytes. *BMC Cancer* 2005; 5: 96
  - 36 Li M, Zhou S, Liu X, Li P, McNutt MA, Li G. alpha-Fetoprotein shields hepatocellular carcinoma cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Lett* 2007; 249: 227-234
  - 37 Tong MJ, Hsien C, Song JJ, Kao JH, Sun HE, Hsu L,

#### 同行评价

本文内容丰富, 具有较好的学术价值, 对提高临床医师的知识结构具有一定的理论价值。

- Han SH, Durazo FA, Saab S, Blatt LM. Factors associated with progression to hepatocellular carcinoma and to death from liver complications in patients with HBsAg-positive cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1337-1346
- 38 Chan SL, Mo FK, Johnson PJ, Hui EP, Ma BB, Ho WM, Lam KC, Chan AT, Mok TS, Yeo W. New utility of an old marker: serial alpha-fetoprotein measurement in predicting radiologic response and survival of patients with hepatocellular carcinoma undergoing systemic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 446-452
- 39 Park UJ, Kim YH, Kang KJ, Lim TJ. [Risk factors for early recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma]. *Korean J Hepatol* 2008; 14: 371-380
- 40 Katz D, Berrodin TJ, Lazar MA. The unique C-termini of the thyroid hormone receptor variant, c-erbA alpha 2, and thyroid hormone receptor alpha 1 mediate different DNA-binding and heterodimerization properties. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 805-814
- 41 Dauphinée MJ, Mizejewski GJ. Human alpha-fetoprotein contains potential heterodimerization motifs capable of interaction with nuclear receptors and transcription/growth factors. *Med Hypotheses* 2002; 58: 453-461
- 42 Li M, Li H, Li C, Guo L, Liu H, Zhou S, Liu X, Chen Z, Shi S, Wei J, McNutt MA, Li G. Cytoplasmic alpha-fetoprotein functions as a co-repressor in RA-RAR signaling to promote the growth of human hepatoma Bel 7402 cells. *Cancer Lett* 2009; 285: 190-199
- 43 Li M, Li H, Li C, Zhou S, Guo L, Liu H, Jiang W, Liu X, Li P, McNutt MA, Li G. Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 2845-2854
- 44 Li C, Wang S, Jiang W, Li H, Liu Z, Zhang C, McNutt MA, Li G. Impact of intracellular alpha fetoprotein on RAR-mediated expression of GADD153 in human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2011 [Epub ahead of print]
- 45 Li M, Li H, Li C, Wang S, Jiang W, Liu Z, Zhou S, Liu X, McNutt MA, Li G. Alpha-fetoprotein: a new member of intracellular signal molecules in regulation of the PI3K/AKT signaling in human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2011; 128: 524-532
- 46 Mizejewski GJ, Muehleemann M, Dauphinee M. Update of alpha fetoprotein growth-inhibitory peptides as biotherapeutic agents for tumor growth and metastasis. *Chemotherapy* 2006; 52: 83-90
- 47 Mizejewski GJ. The alpha-fetoprotein-derived growth inhibitory peptide 8-mer fragment: review of a novel anticancer agent. *Cancer Biother Radiopharm* 2007; 22: 73-98
- 48 Torres CG, Pino AM, Sierralta WD. A cyclized peptide derived from alpha fetoprotein inhibits the proliferation of ER-positive canine mammary cancer cells. *Oncol Rep* 2009; 21: 1397-1404
- 49 Murgita RA, Goidl EA, Kontianen S, Wigzell H. alpha-Fetoprotein induces suppressor T cells in vitro. *Nature* 1977; 267: 257-259
- 50 Peck AB, Murgita RA, Wigzell H. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. III. Role of the MLC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-induced suppression of T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1982; 128: 1134-1140
- 51 Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Heller JB, Dissette VB, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Fine specificity analysis of an HLA-A2.1-restricted immunodominant T cell epitope derived from human alpha-fetoprotein. *Mol Immunol* 2000; 37: 943-950
- 52 Ritter M, Ali MY, Grimm CF, Weth R, Mohr L, Bocher WO, Endrulat K, Wedemeyer H, Blum HE, Geissler M. Immunoregulation of dendritic and T cells by alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 999-1007
- 53 Semeniuk DJ, Boismenu R, Tam J, Weissenhofer W, Murgita RA. Evidence that immunosuppression is an intrinsic property of the alpha-fetoprotein molecule. *Adv Exp Med Biol* 1995; 383: 255-269
- 54 Tomasi TB. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annu Rev Med* 1977; 28: 453-465
- 55 Okuda K, Kotoda K, Obata H, Hayashi N, Hisamitsu T. Clinical observations during a relatively early stage of hepatocellular carcinoma, with special reference to serum alpha-fetoprotein levels. *Gastroenterology* 1975; 69: 226-234
- 56 Wang XW, Xu B. Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. *Int J Cancer* 1998; 75: 596-599

编辑 李军亮 电编 何基才

# 蛋白酶体抑制剂硼替佐米对胃癌SGC7901细胞的抗肿瘤作用及其机制

刘静, 詹运洪, 刘云鹏, 曲秀娟, 徐玲, 张晔, 侯科佐, 胡雪君

刘静, 刘云鹏, 曲秀娟, 徐玲, 张晔, 侯科佐, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001  
詹运洪, 中国医科大学附属盛京医院泌尿外科 辽宁省沈阳市 110004  
胡雪君, 中国医科大学附属第一医院呼吸科 辽宁省沈阳市 110001  
刘静, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤凋亡及耐药机制方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30770993  
作者贡献分布: 此课题由刘静、曲秀娟及刘云鹏设计; 研究过程由刘静、徐玲及张晔操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由侯科佐与胡雪君提供; 数据分析由刘静与詹运洪完成; 论文写作由刘静与曲秀娟完成。  
通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科。  
cmuliuyunpeng@yahoo.cn  
电话: 024-83282312 传真: 024-83282543  
收稿日期: 2011-03-03 修回日期: 2011-04-26  
接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## *In vitro* antitumor effect of the proteasome inhibitor bortezomib on human gastric cancer SGC7901 cells

Jing Liu, Yun-Hong Zhan, Yun-Peng Liu, Xiu-Juan Qu, Ling Xu, Ye Zhang, Ke-Zuo Hou, Xue-Jun Hu

Jing Liu, Yun-Peng Liu, Xiu-Juan Qu, Ling Xu, Ye Zhang, Ke-Zuo Hou, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Yun-Hong Zhan, Department of Urology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Xue-Jun Hu, Department of Respiratory Diseases, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770993  
Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, 155 North Nanjing Avenue, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn  
Received: 2011-03-03 Revised: 2011-04-26  
Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the anti-tumor effect of bortezomib, a proteasome inhibitor, on human gastric cancer SGC7901 cells and to explore possible mechanism involved.

**METHODS:** Human gastric cancer SGC7901 cells were cultured and treated with different concentrations of bortezomib (1-500 nmol/L) for 24-48 h. Cell viability was determined by MTT assay. Apoptosis was detected by flow cytometry. The cleavage of PARP and caspase-3 and level of phosphor-Akt were determined by Western blot.

**RESULTS:** Bortezomib inhibited the viability of SGC7901 cells in a dose- and time-dependent manner. The  $IC_{50}$  value at 48 h was 67.39 nmol/L. Treatment with 60 or 180 nmol/L of bortezomib induced cell cycle arrest at  $G_2/M$  phase at both 24 and 48 h but induced apoptosis only at 48 h. The cleavage of caspase-3 and PARP was observed in cells treated with 60 or 180 nmol/L of bortezomib for 48 h. Treatment with bortezomib for 48 h down-regulated the level of phosphor-Akt in SGC7901 cells.

**CONCLUSION:** Bortezomib induced apoptosis and cell cycle arrest at  $G_2/M$  phase by inhibiting the activity of the PI3K/Akt signaling pathway in human gastric cancer SGC7901 cells.

**Key Words:** Bortezomib; Gastric cancer; PI3K/Akt; Apoptosis

Liu J, Zhan YH, Liu YP, Qu XJ, Xu L, Zhang Y, Hou KZ, Hu XJ. *In vitro* antitumor effect of the proteasome inhibitor bortezomib on human gastric cancer SGC7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1441-1445

## 摘要

**目的:** 研究蛋白酶体抑制剂硼替佐米对胃癌SGC7901细胞凋亡及细胞周期分布的影响, 并进一步探讨其作用机制。

**方法:** 1-500 nmol/L的硼替佐米作用于人胃癌SGC7901细胞24-48 h, MTT法检测细胞存活率, 流式细胞术PI染色检测细胞凋亡。Western blot检测多聚ADP-核糖聚合酶(PARP)和caspase-3裂解及p-Akt表达水平的变化。

## 背景资料

硼替佐米作为一种新型蛋白酶体抑制剂, 临床研究结果提示单药或与化疗联合对晚期胃癌有较好的疗效。研究硼替佐米对胃癌的抗肿瘤作用机制, 对于进一步提高硼替佐米治疗胃癌的疗效, 将其更好的应用于临床具有重要意义。

**同行评议者**  
陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

## ■ 研发前沿

近年来的研究表明,抑制蛋白酶体功能可抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡,蛋白酶体抑制剂因此成为抗肿瘤药物研发的热点。

**结果:** 硼替佐米以浓度和时间依赖方式抑制SGC7901细胞增殖,48 h的 $IC_{50}$ 值为67.39 nmol/L. 细胞凋亡及周期分析显示,硼替佐米作用24、48 h均可诱导细胞发生 $G_2/M$ 期阻滞. 硼替佐米作用细胞24 h时细胞凋亡不明显,48 h可见明显细胞凋亡. Western blot结果发现,60、180 nmol/L硼替佐米在24 h仅轻度裂解caspase-3和PARP,48 h时caspase-3和PARP明显被裂解. 进一步研究发现,硼替佐米作用细胞48 h可明显抑制p-Akt水平.

**结论:** 硼替佐米可抑制SGC7901细胞增殖,诱导细胞凋亡及发生 $G_2/M$ 期阻滞,其抗肿瘤活性可能与抑制PI3K/Akt通路活性有关.

**关键词:** 硼替佐米; 胃癌; PI3K/Akt; 凋亡

刘静, 詹运洪, 刘云鹏, 曲秀娟, 徐玲, 张晔, 侯科佐, 胡雪君. 蛋白酶体抑制剂硼替佐米对胃癌SGC7901细胞的抗肿瘤作用及其机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1441-1445  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1441.asp>

## 0 引言

硼替佐米(bortezomib)是一种新型蛋白酶体抑制剂,可通过抑制26S蛋白酶体功能,阻止蛋白质经泛素-蛋白酶体途径降解,调控多种细胞的生理及病理过程<sup>[1]</sup>. 既往研究结果提示硼替佐米对多种肿瘤细胞有很好的抗肿瘤活性<sup>[2-4]</sup>. 目前硼替佐米已被美国食品与药品管理局批准用于多发性骨髓瘤和套细胞淋巴瘤的治疗<sup>[5]</sup>. 除多发性骨髓瘤和淋巴瘤外,硼替佐米单独或与化疗药联合治疗晚期胃癌的II期临床试验结果也显示出较好的疗效<sup>[6,7]</sup>. 我们之前的研究发现低剂量的硼替佐米可增强胃癌细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)诱导凋亡的敏感性,逆转耐药<sup>[8,9]</sup>. 但关于硼替佐米单独对胃癌细胞的抗肿瘤作用及机制国内尚无报道. 本研究探讨了硼替佐米对胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡及细胞周期分布的影响,并探讨了对PI3K/Akt通路活性的影响,进而探讨硼替佐米诱导胃癌细胞凋亡的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 硼替佐米购自Millennium Pharmaceuticals公司, RPMI 1640培养基购自Gibco公司; 胎牛血清购自天津血液研究所; 碘化丙啶(PI)购自Sigma-Aldrich公司; RNaseA购自Amresco公司; 抗caspase-3、PARP及p-Akt抗体购自Cell

signaling公司, 抗Akt及actin抗体购自Santa Cruz公司. 辣根过氧化物酶标记的二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL试剂盒购于PIERCE公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 人胃癌SGC7901细胞株为本实验室常规传代培养, 生长于含有100 mL/L灭活胎牛血清, 青霉素(100 kU/L)和链霉素(100 g/L)的RPMI 1640培养基中, 于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱内培养. 细胞常规每2-3 d传代1次, 采用对数生长期细胞用于实验.

**1.2.2 MTT法测定细胞活力:** 取对数生长期细胞, 常规胰酶消化成单个细胞悬液, 将细胞浓度调至 $5 \times 10^7/L$ , 接种于96孔板, 于培养箱内孵育过夜后, 每孔加入不同浓度的硼替佐米孵育24或48 h, 之后加入20  $\mu$ L MTT(5 g/L), 继续孵育4 h. 吸走上清, 每孔加入200  $\mu$ L DMSO, 振荡摇匀. 用酶标仪于570 nm波长测定吸光度(A)值. 按照下列公式计算细胞活力: 细胞活力(%) = (实验组A值/对照组A值)  $\times$  100%.

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡:** 细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板, 孵育过夜后加入不同浓度的硼替佐米, 孵育24或48 h后收集细胞, 冷PBS洗2次, 700 mL/L冷乙醇固定过夜. 之后再用PBS洗两次, 加入20 mg/L RNaseA, 37 °C孵育30 min, 之后加入10 mg/L PI, 避光孵育30 min. 使用流式细胞术进行检测, FL2-A代表DNA含量, WinMDI软件进行数据分析.

**1.2.4 Western blot检测蛋白表达变化:** 收集细胞, PBS洗2次, 加入1% Triton裂解液[1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-Cl(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>, 1 mmol/L PMSF, 2 mg/L aprotinin], 冰上裂解30 min, 之后高速离心(15 000 g)30 min, 取上清, Lowry法进行蛋白定量. 将样品与3  $\times$  样品缓冲液混合后, 煮沸5 min, 于10%-12%的SDS-聚丙烯酰胺中进行电泳, 之后电转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 加入一抗4 °C孵育过夜. TBST[10 mmol/L Tris (pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20]洗4次后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温下孵育30 min, TBST洗后, ECL法显色.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析. 所有数据均为3次独立实验结果, 以mean  $\pm$  SD表示. 两组间差异采用t检验,  $P < 0.05$  认为有统计学意义.

## ■ 相关报道

既往报道低剂量硼替佐米可增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)对胃癌细胞的抗肿瘤作用, 但硼替佐米单药对胃癌细胞的影响尚不清楚.

## 2 结果

**2.1 硼替佐米对SGC7901细胞活力的影响** 1-500 nmol/L硼替佐米作用于SGC7901细胞24、48 h, 随着药物浓度的增大, 细胞活力逐渐下降, 作用24 h细胞活力抑制率未达到50%, 作用48 h的 $IC_{50}$ 值为67.39 nmol/L(图1)。这些数据提示硼替佐米以剂量及时间依赖方式抑制SGC7901细胞增殖。

**2.2 硼替佐米对SGC7901细胞凋亡及细胞周期的影响** 采用60、180 nmol/L硼替佐米分别作用细胞24、48 h, 在24 h时凋亡细胞百分比无明显升高, 48 h的细胞凋亡率分别为 $29.13 \pm 2.71\%$ 和 $62.71\% \pm 2.27\%$ , 明显高于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ , 图2)。60及180 nmol/L硼替佐米分别作用细胞24 h后,  $G_2/M$ 期细胞比例明显升高( $P < 0.01$ 或 $< 0.05$ )。60 nmol/L硼替佐米作用细胞48 h,  $G_2/M$ 期细胞比例也明显高于对照组( $P < 0.01$ ); 180 nmol/L硼替佐米作用48 h后,  $G_2/M$ 期细胞比例低于正常对照组( $P < 0.05$ )。

**2.3 硼替佐米对PARP及caspase-3裂解的影响** 60、180 nmol/L硼替佐米作用细胞24 h, caspase-3和PARP无明显裂解, caspase-3前体无明显变化。药物作用细胞48 h后, caspase-3和PARP明显被裂解, 同时caspase-3及PARP前体明显减少(图3)。这些数据提示硼替佐米可诱导SGC7901细胞凋亡。

**2.4 硼替佐米对PI3K/Akt通路活性的影响** 60及180 nmol/L硼替佐米作用细胞24及48 h, 在24 h时p-Akt水平无明显变化, 48 h时p-Akt水平明显下降(图4), 提示Akt通路活性受抑。

## 3 讨论

泛素-蛋白酶体通路是细胞内蛋白质降解的主要途径, 细胞内80%以上的蛋白质经此途径降解<sup>[10]</sup>。在泛素分子和酶的作用下, 细胞周期调控因子、转录因子、细胞表面受体以及突变或受损蛋白质等均可发生多聚泛素化, 经蛋白酶体降解<sup>[10]</sup>。近年来的研究表明, 抑制蛋白酶体功能可抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡, 蛋白酶体抑制剂因此成为抗肿瘤药物研发的热点<sup>[11-14]</sup>。目前开发出来的蛋白酶体抑制剂从结构上大致可分为5类, 包括: 醛基肽类(peptide aldehydes)、乙烯砜肽类(peptide vinyl sulfones)、硼酸肽类(peptide boronates)、环氧酮肽类及 $\beta$ -内酯类<sup>[15]</sup>。硼替佐米属于硼酸肽类化合物, 可选择性作用于26S蛋白酶体, 可逆性地抑制蛋白酶体活性, 阻断多种蛋白的降解过程, 最终影响细胞周期进程, 诱导细胞

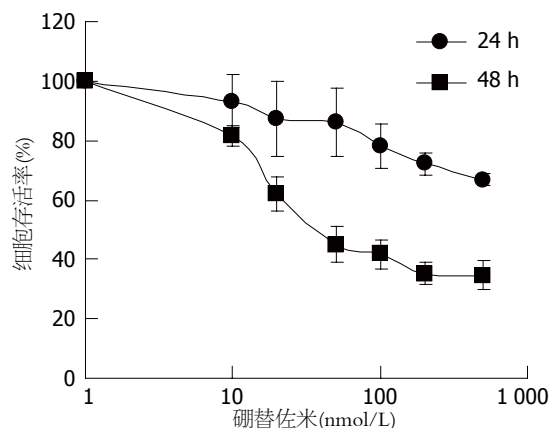


图1 硼替佐米对SGC7901细胞活力的影响。

凋亡<sup>[16-18]</sup>。除单独作用以外, 硼替佐米还可与其他抗肿瘤药联用, 增强药物的抗肿瘤活性<sup>[19-23]</sup>。但是有关硼替佐米对胃癌细胞的抗肿瘤作用研究较少。在本研究中, 我们报道了硼替佐米对胃癌SGC7901细胞有明显的抗肿瘤作用, 提示硼替佐米很可能成为胃癌的有效治疗药物。

有报道揭示, 硼替佐米主要通过诱导细胞凋亡和周期阻滞发挥抗肿瘤作用<sup>[24,25]</sup>。有报道称, 硼替佐米可抑制神经母细胞瘤和胶质瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡和 $G_2/M$ 期阻滞<sup>[26,27]</sup>。本研究中60及180 nmol/L硼替佐米作用细胞24 h时, 细胞活力仅轻度下降, 细胞凋亡不明显, 以 $G_2/M$ 期阻滞为主; 继续作用至48 h, 细胞活力明显受抑, 低剂量(60 nmol/L)硼替佐米可同时诱导 $G_2/M$ 期阻滞和凋亡, 而高剂量(180 nmol/L)硼替佐米作用下大多数细胞发生凋亡, 因此 $G_2/M$ 期细胞比例减少, 周期阻滞消失。这些研究结果提示, 在胃癌细胞中硼替佐米诱导的 $G_2/M$ 期阻滞是凋亡发生的前提条件, 短时间作用下细胞以周期阻滞为主, 随着作用时间的延长, 发生周期阻滞的细胞逐渐走向凋亡。

虽然硼替佐米的抗肿瘤作用已经在多种肿瘤细胞中证实, 但是其作用机制非常复杂, 在不同的细胞中可能涉及不同的分子机制<sup>[28]</sup>。既往研究认为硼替佐米主要通过抑制核因子- $\kappa B$ (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa B$ )通路活性, 发挥其抗肿瘤作用<sup>[29,30]</sup>。近年来的研究表明, 除NF- $\kappa B$ 通路之外, PI3K/Akt通路也参与了硼替佐米的抗肿瘤过程<sup>[31,32]</sup>。PI3K/Akt通路是细胞内调控增殖及凋亡的重要信号传导通路, 该通路的过度活化可导致细胞对抗肿瘤药物诱导的凋亡耐药<sup>[33]</sup>。有报道表明, 硼替佐米可以通过抑制细胞内Akt通路活性, 诱导肝癌细胞凋亡, 提示Akt可

### ■ 创新亮点

本研究首次报道了硼替佐米可诱导胃癌SGC7901细胞凋亡及细胞周期阻滞, 并对PI3K/Akt通路活性有抑制作用, 提示PI3K/Akt通路参与了硼替佐米对胃癌细胞的抗肿瘤过程。

■应用要点

本研究结果为硼替佐米治疗胃癌提供新的理论基础,为将硼替佐米更好的用于胃癌的临床治疗提供依据。

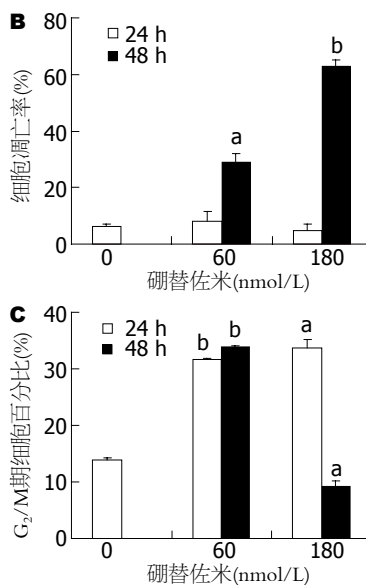
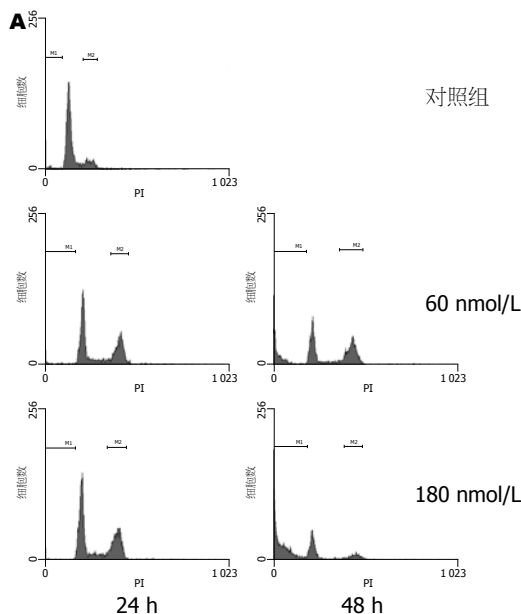


图2 硼替佐米对SGC7901细胞凋亡及周期分布的影响. A: 流式细胞术检测60、180 nmol/L硼替佐米作用细胞24、48 h的细胞凋亡及周期分布; B: 凋亡细胞百分比的柱状图; C: G<sub>2</sub>/M期细胞百分比的柱状图. <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

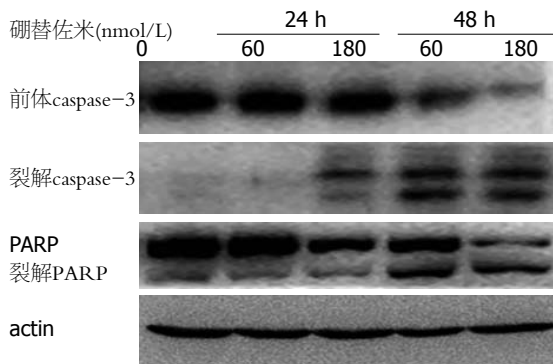


图3 硼替佐米对PARP及caspase-3裂解的影响。

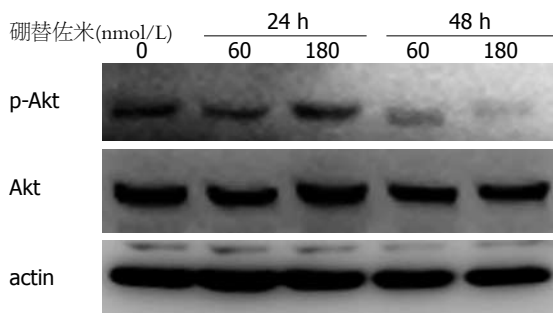


图4 硼替佐米对PI3K/Akt通路活性的影响。

能是硼替佐米的作用靶点之一<sup>[34,35]</sup>。本研究中静息状态下的胃癌细胞内可检测到的Akt的磷酸化,硼替佐米作用24 h磷酸化Akt水平变化不明显,此时细胞凋亡也不明显;继续作用至48 h后,Akt的磷酸化水平被明显抑制,同时细胞凋亡明显增加。这些结果强烈提示硼替佐米可能通过抑制胃癌细胞内PI3K/Akt通路活性,诱导细胞凋亡。

总之,我们的研究证实了在胃癌SGC7901细胞中,硼替佐米可抑制细胞增殖,诱导细胞发生

G<sub>2</sub>/M期阻滞,进而诱导细胞凋亡。这种抗肿瘤作用可能与其抑制PI3K/Akt通路活性有关。本研究结果为进一步明确硼替佐米的抗肿瘤作用机制提供理论依据,并有可能为晚期胃癌提供新的治疗手段。

4 参考文献

- Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002; 7: 9-16
- Luo P, Lin M, Lin M, Zhu D, Wang Z, Shen J, Yang B, He Q. Bortezomib induces apoptosis in human neuroblastoma CHP126 cells. *Pharmazie* 2010; 65: 213-218
- Ling X, Calinski D, Chanan-Khan AA, Zhou M, Li F. Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 8
- Wang Y, Rishi AK, Puliappadamba VT, Sharma S, Yang H, Tarca A, Dou QP, Lonardo F, Ruckdeschel JC, Pass HI, Wali A. Targeted proteasome inhibition by Velcade induces apoptosis in human mesothelioma and breast cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 455-466
- Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 879-895
- Shah MA, Power DG, Kindler HL, Holen KD, Kemeny MM, Ilson DH, Tang L, Capanu M, Wright JJ, Kelsen DP. A multicenter, phase II study of Bortezomib (PS-341) in patients with unresectable or metastatic gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 2010 Jun 25. [Epub ahead of print]
- Jatoi A, Dakhil SR, Foster NR, Ma C, Rowland KM, Moore DF, Jaslowski AJ, Thomas SP, Hauge MD, Flynn PJ, Stella PJ, Alberts SR. Bortezomib, paclitaxel, and carboplatin as a first-line regimen for patients with metastatic esophageal, gastric, and gastroesophageal cancer: phase II results from the North Central Cancer Treatment Group (N044B). *J Thorac Oncol* 2008; 3: 516-520

- 8 Liu J, Qu XJ, Xu L, Zang Y, Qu JL, Hou KZ, Liu YP. Bortezomib synergizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 3361-3368
- 9 刘静, 徐玲, 刘云鹏, 曲秀娟, 张晔, 侯科佐, 胡雪君, 姜又红. 硼替佐米抑制PI3K/Akt通路增强胃癌细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1854-1859
- 10 Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* 2009; 74: 1411-1442
- 11 Testa U. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 968-981
- 12 You BR, Park WH. Proteasome inhibition by MG132 induces growth inhibition and death of human pulmonary fibroblast cells in a caspase-independent manner. *Oncol Rep* 2011; 25: 1705-1712
- 13 Driscoll JJ, Minter A, Driscoll DA, Burris JK. The ubiquitin+proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11: 242-246
- 14 Kuhn DJ, Z Orłowski R, C Bjorklund C. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSI). *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11: 285-295
- 15 Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004; 5: 417-421
- 16 Russo A, Bronte G, Fulfaro F, Cicero G, Adamo V, Gebbia N, Rizzo S. Bortezomib: a new pro-apoptotic agent in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 55-67
- 17 陶海云, 李克, 樊青霞. 硼替佐米对HCT8细胞增殖、凋亡及黏附能力的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 190-193
- 18 Shen L, Au WY, Wong KY, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Cell death by bortezomib-induced mitotic catastrophe in natural killer lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3807-3815
- 19 Seki N, Toh U, Sayers TJ, Fujii T, Miyagi M, Akagi Y, Kusukawa J, Kage M, Shirouzu K, Yamana H. Bortezomib sensitizes human esophageal squamous cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via activation of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1842-1851
- 20 Pasquini L, Petronelli A, Petrucci E, Saule E, Mariani G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Greggi S, Cognetti F, Testa U. Primary ovarian cancer cells are sensitive to the proapoptotic effects of proteasome inhibitors. *Int J Oncol* 2010; 36: 707-713
- 21 Pitts TM, Morrow M, Kaufman SA, Tentler JJ, Eckhardt SG. Vorinostat and bortezomib exert synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in colon cancer cell models. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 342-349
- 22 Combined effects of the proteasome inhibitor bortezomib and Hsp70 inhibitors on the B16F10 melanoma cell line. *Mol Med Report* 2010; 3: 333-339
- 23 Ishii Y, Papa L, Bahadur U, Yue Z, Aguirre-Ghiso J, Shioda T, Waxman S, Germain D. Bortezomib enhances the efficacy of fulvestrant by amplifying the aggregation of the estrogen receptor, which leads to a proapoptotic unfolded protein response. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2292-2300
- 24 Tamura D, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Matsumoto K, Kudo K, Aomatsu K, Fujita Y, Watanabe T, Saijo N, Kotani Y, Nishimura Y, Nishio K. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci* 2010; 101: 1403-1408
- 25 Albero MP, Vaquer JM, Andreu EJ, Villanueva JJ, Franch L, Ivorra C, Poch E, Agirre X, Prosper F, Pérez-Roger I. Bortezomib decreases Rb phosphorylation and induces caspase-dependent apoptosis in Imatinib-sensitive and -resistant Bcr-Abl1-expressing cells. *Oncogene* 2010; 29: 3276-3286
- 26 Brignole C, Marimpietri D, Pastorino F, Nico B, Di Paolo D, Cioni M, Piccardi F, Cilli M, Pezzolo A, Corrias MV, Pistoia V, Ribatti D, Pagnan G, Ponzoni M. Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1142-1157
- 27 Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, Koeffler HP. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 2005; 24: 344-354
- 28 McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008; 11: 164-179
- 29 周伟民, 金培英, 平金良, 钱福初, 张国雷. 硼替佐米抑制核因子- $\kappa$ B活化对LOVO细胞增殖的影响. *温州医学院学报* 2010; 40: 156-159
- 30 Sung MH, Bagain L, Chen Z, Karpova T, Yang X, Silvin C, Voss TC, McNally JG, Van Waes C, Hager GL. Dynamic effect of bortezomib on nuclear factor-kappaB activity and gene expression in tumor cells. *Mol Pharmacol* 2008; 74: 1215-1222
- 31 Huang J, Ding T, Yang M, Liu H, Sun X, Jin J. Antitumor activity and drug interactions of proteasome inhibitor Bortezomib in human high-risk myelodysplastic syndrome cells. *Int J Hematol* 2011; 93: 482-493
- 32 Chung EJ, Moon SW, Jung SA, Cho YJ, Kim SW, Lee JH. Potentiation of bortezomib-induced apoptosis by TGF-beta in cultured human Tenon's fibroblasts: contribution of the PI3K/Akt signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 6232-6237
- 33 张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生. PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙贰化疗的耐药性及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 575-581
- 34 Chen KF, Yeh PY, Yeh KH, Lu YS, Huang SY, Cheng AL. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 6698-6707
- 35 Chen KF, Yeh PY, Hsu C, Hsu CH, Lu YS, Hsieh HP, Chen PJ, Cheng AL. Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2009; 284: 11121-11133

■同行评价  
本文选题恰当, 内容详实, 具有较好的理论价值。

编辑 李薇 电编 何基才

# 人pEGFP-PKARII $\beta$ 重组质粒的构建及其在BGC-823胃癌细胞中的表达

王桂玲, 姜佩佳, 王孝会, 陈薇

## ■背景资料

蛋白激酶A(PKA)是最早发现并且研究最为广泛的激酶之一,他的异常表达和激活可以引起包括恶性肿瘤在内的各种疾病。在我国胃癌的死亡率居各种恶性肿瘤之首,他的发生是由许多因素共同参与和积累造成的,其中将激酶信号通路确定为肿瘤治疗的靶点是未来抗肿瘤药物的一项研发策略。

王桂玲, 姜佩佳, 王孝会, 陈薇, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室 卫生部细胞生物学重点实验室 辽宁省沈阳市 110001

国家自然科学基金资助项目, No. 30871294

作者贡献分布: 此课题设计及论文写作由姜佩佳与王桂玲负责; 课题的具体实施由姜佩佳与王桂玲负责; 分析数据由王孝会与陈薇完成。

通讯作者: 王桂玲, 副教授, 硕士生导师, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室。

wanggl2000@163.com

电话: 024-23256666-5347

收稿日期: 2011-04-10 修回日期: 2011-05-09

接受日期: 2011-05-17 在线出版日期: 2011-05-18

## Construction of a eukaryotic expression plasmid encoding the human PKAR II $\beta$ gene and its expression in human gastric cancer BGC-823 cells

Gui-Ling Wang, Pei-Jia Jiang, Xiao-Hui Wang, Wei Chen

Gui-Ling Wang, Pei-Jia Jiang, Xiao-Hui Wang, Wei Chen, Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology of the Ministry of Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30871294

Correspondence to: Associate Professor Gui-Ling Wang, Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology of the Ministry of Public Health of China & College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wanggl2000@163.com

Received: 2011-04-10 Revised: 2011-05-09

Accepted: 2011-05-17 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To construct a eukaryotic expression plasmid encoding the human protein kinase A regulatory subunit II beta (PKAR II $\beta$ ) gene and to examine its expression and localization in BGC-823 gastric cells using green fluorescent protein as a reporter.

**METHODS:** The coding sequence of the PKAR II $\beta$  gene was amplified from the plasmid pRSETB-PKARII $\beta$  by PCR and subcloned into pEGFP-C1 vector after digestion with *Xho* I

and *Eco*R I. After the identity of recombinant plasmid was verified by direct sequencing, the plasmid was transfected into BGC-823 cells. The expression of the recombinant plasmid in BGC-823 cells was detected by Western blot. The localization of GFP-PKARII $\beta$  in BGC-823 cells was observed by laser scanning confocal microscopy.

**RESULTS:** The coding sequence of the PKARII $\beta$  gene was inserted into the pEGFP-C1 vector successfully. Restriction enzymes digestion showed that the length of the insert was 1.2 kb, matching the expected size. The expression of GFP-PKARII $\beta$  fusion protein, which had a molecular weight of 72 000 Da, was detected in BGC-823 cells by Western blot. The GFP-PKARII $\beta$  protein was localized predominantly to the cytoplasm but sparsely to the nucleus of HEK293 and BGC-823 cells.

**CONCLUSION:** A recombinant plasmid expressing the PKARII $\beta$  gene has been successfully constructed and provides a tool for future investigation of PKARII $\beta$  functions. The GFP-PKARII $\beta$  fusion protein was expressed mainly in the cytoplasm of HEK293 and BGC7901 cells.

**Key Words:** Protein kinase A regulatory subunit II beta; Eukaryotic expression; Green fluorescent protein; Gene transfection; Gastric cancer cells

Wang GL, Jiang PJ, Wang XH, Chen W. Construction of a eukaryotic expression plasmid encoding the human PKAR II $\beta$  gene and its expression in human gastric cancer BGC-823 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1446-1450

## 摘要

**目的:** 研究人的蛋白激酶A调节亚基RII $\beta$ (PKARII $\beta$ )基因的绿色荧光蛋白(GFP)真核表达载体融合蛋白在胃癌细胞BGC-823内的表达和定位,初步探讨其在肿瘤细胞中的分子作用机制。

**方法:** 以pRSETB-PKARII $\beta$ 质粒为模板,PCR

## ■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

扩增出全长PKARII $\beta$ 编码序列, 用*Xho* I 和*Eco*R I 双酶切后, 亚克隆至含有GFP标签的融合表达载体pEGFP-C1中. 测序正确后, 将重组质粒转染到胃癌细胞BGC-823中, 提取细胞蛋白进行Western blot检测. 利用共聚焦激光扫描显微镜观察pEGFP-PKARII $\beta$ 在人胃癌细胞BGC-823内的定位.

**结果:** 将人全长PKARII $\beta$ 编码序列克隆到了真核表达载体pEGFP-C1中, 酶切鉴定片段为1.2 kb, 在预期的位置产生条带. Western blot检测到了融合蛋白正确表达, 分子量约为72 000 Da. 并观察到GFP-PKARII $\beta$ 在HEK293和BGC-823细胞内都有表达, 且定位以细胞质为主, 在细胞核内少量表达.

**结论:** 成功构建了人全长PKARII $\beta$ 编码序列的pEGFP-PKARII $\beta$ 真核表达载体, 证实GFP-PKARII $\beta$ 蛋白在BGC-823细胞质内特异表达, 为进一步研究PKARII $\beta$ 的在胃癌中的功能提供了重要的实验材料.

**关键词:** PKARII $\beta$ ; 真核表达; 绿色荧光蛋白; 基因转染; 胃癌细胞

王桂玲, 姜佩佳, 王孝会, 陈薇. 人pEGFP-PKARII $\beta$ 重组质粒的构建及其在BGC-823胃癌细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1446-1450  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1446.asp>

## 0 引言

蛋白激酶A(protein kinase A, PKA), 是最早被发现同时也是最重要的几个激酶之一, 在细胞的很多信号通路中起到重要作用. 他是由两个催化亚基(catalytic subunit, C)与两个调节亚基(regulatory subunit, R)组成的四聚体, 通常是以无活性形式存在<sup>[1-3]</sup>, 当第二信使3', 5'-环腺苷酸(cAMP)结合到调节亚基上时, 释放出具有活性的催化亚基, 从而PKA被激活<sup>[4]</sup>. 活化的PKA催化亚基可使细胞内某些蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化, 通过改变这些蛋白的活性, 来进一步影响其相关基因的表达<sup>[5]</sup>. PKA在细胞核和细胞质都有分布, 参与众多的信号转导通路. 特别在心血管功能调节, 类固醇激素的生物合成, 细胞的增殖分化和侵袭转移以及免疫系统中发挥着重要功能<sup>[6-10]</sup>. PKA的催化亚基有3种亚型C $\alpha$ 、C $\beta$ 和C $\gamma$ , 其调节亚基有4种亚型RI $\alpha$ 、RI $\beta$ 、RII $\alpha$ 和RII $\beta$ , 他们有着不同的理化性质<sup>[11]</sup>. 现有研究表明, PKA信号通路在多种肿瘤的发生和发展中起重要作用<sup>[12-15]</sup>.

PKARII $\beta$ 是目前研究的最为广泛的PKA调节亚基, 他存在于大多数被检测的组织中, 如胃、卵巢、肺和结肠等<sup>[10,11]</sup>. PKARII $\beta$ 参与一系列的细胞生物学过程, 如与PKA锚定蛋白(A-kinase anchoring protein, AKAP)相互作用把PKA锚定到细胞内特定区域从而使PKA特异性地磷酸化其底物, 来参与不同的信号通路<sup>[16]</sup>. 他的异常表达和定位可能与某些肿瘤的发生相关<sup>[17]</sup>. 目前有关PKARII $\beta$ 的研究越来越引起了人们的关注. 在本研究中我们利用基因重组技术成功构建了pEGFP-PKARII $\beta$ 真核表达载体, 并在胃癌细胞BGC-823内表达和定位, 为今后进一步研究PKARII $\beta$ 在胃癌的生物学功能奠定了基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 为本实验室保存, 原核表达载体pEGFP-C1购自美国Clontech公司; 各种限制性内切酶、Pyrobest<sup>TM</sup> DNA polymerase、电泳凝胶回收试剂盒均购自TaKaRa公司; T4 DNA连接酶购自NEB公司, ECL试剂盒购自Pharmacia公司; 蛋白分子质量标准购自MBI公司; anti-GFP抗体购自Cell Signaling公司; HRP标记羊抗鼠IgG购自Promega公司; ECL发光试剂盒购自Pharmacia; 其他试剂均为国产分析纯; 引物序列合成及DNA序列测定由南京金思瑞公司完成. pRSETB-PKARII $\beta$ 质粒由加州大学Susan S. Taylor教授馈赠.

### 1.2 方法

**1.2.1 全长人PKARII $\beta$ 编码序列扩增:** 以pRSETB-PKARII $\beta$ 为模板, 利用PCR技术对PKARII $\beta$ 进行扩增. 上游引物: 5'-CCGCTC-GAGATGAGCATCGAGATCCCG-3', 下游引物: 5'-CCGAATTCCTTCATGCAGT-GGGTTCAAC-3', 包括*Xho* I 和*Eco*R I 酶切位点. 反应条件分别为: 94 °C变性5 min后, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 2 min, 循环30次, 最后于72 °C延伸5 min. 反应终止后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 与标准DNA片段(Mark神对照, 紫外线检测仪观察, 胶回收试剂盒回收约1.2 kb的PKARII $\beta$ 的PCR产物.

**1.2.2 pEGFP-PKARII $\beta$ 表达载体的构建、鉴定与测序:** 用*Xho* I 和*Eco*R I 对PKARII $\beta$  PCR纯化产物及pEGFP-C1分别进行酶切, 纯化后以T4 DNA连接酶于16 °C连接16 h得到连接产物. 取3  $\mu$ L上述连接反应液转化感受态细胞*E. coli* DH5 $\alpha$ 中, 涂布于含卡那霉素的LB琼脂平板, 37 °C培养过

## ■ 研发前沿

PKARII $\beta$ 是PKA激酶重要的调节亚基, 因在结构上的差异提示PKARII $\beta$ 可能具有与其他调节亚基不同的生物学功能. 目前对PKARII $\beta$ 的功能及其作用机制的研究已逐渐成为热点. 但对其在胃癌细胞中参与的信号转导通路的机制及功能仍不清楚.

## ■ 相关报道

目前, 对PKA研究的重点已逐渐从PKA的催化亚基转移到PKA的调节亚基上, 如在2006年, Inan等报道了PKARII $\beta$ 在cAMP-PKA信号通路中的作用. 但对于胃癌中PKA信号通路的研究目前还很少. 因此对其重要的调节亚基PKARII $\beta$ 参与的信号通路的研究可能为胃癌治疗提供一条新的途径.

### ■创新盘点

PKARII $\beta$ 的研究对阐明PKA信号调控的机制有重要意义. 本文创新之处在于选择了PKA的一个具有广泛调控作用并在胃癌中研究较少的调节亚基PKARII $\beta$ , 将其构建到真核表达载体pEGFP-C1中, 使其在胃癌细胞BGC-823中表达, 为研究PKARII $\beta$ 在胃癌发生发展中的作用奠定了实验基础.

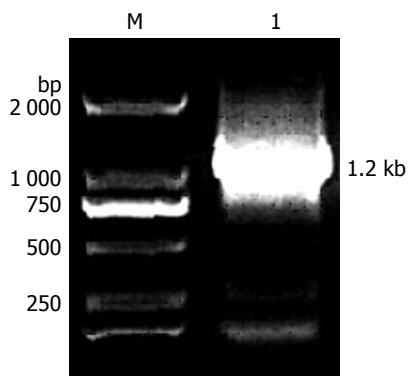


图1 PKARII $\beta$ 全长cDNA的PCR扩增检测. M: DL2000 Marker; 1: PKARII $\beta$ .

夜. 挑取白色菌落4个, 接种于含卡那霉素3 mL的LB培养液中, 37 °C振荡过夜. 用碱裂解法制备质粒DNA, 再用*Xho* I和*Eco*R I酶切重组质粒并测序, 最后测序证实, 将构建的质粒命名为pEGFP-PKARII $\beta$ .

1.2.3 瞬时转染pEGFP-PKARII $\beta$ 表达载体: BGC-823细胞系及HEK-293细胞, 用DMEM高糖培养基培养, 细胞铺于6孔板或12孔板至70%-80%, 用脂质体Lipofectamine™ 2000介导转染BGC-823胃癌细胞及HEK-293细胞. 根据转染质粒及细胞类型的不同分为HEK-293细胞pEGFP-PKARII $\beta$ 转染组及对照组, BGC-823细胞pEGFP-PKARII $\beta$ 转染组. 转染方法按照Lipofectamin™ 2000说明书进行.

1.2.4 蛋白提取与Western blot鉴定: 转染36 h后, 分别将转染空质粒pEGFP-C1和转染pEGFP-PKARII $\beta$ 的BGC-823细胞培养皿置于冰上, 弃掉培养基, 用PBS清洗两遍. 在细胞中加入60  $\mu$ L含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 用橡皮刮刀将细胞缓慢刮下. 收集所有液体到新的离心管中, 冰上放置10 min, 裂解细胞. 13 000  $g$  4 °C离心30 min, 将上清转到新的离心管中, 取上清5  $\mu$ L进行定量. 将蛋白定量后, 取80  $\mu$ g总蛋白经10% SDS-PAGE凝胶分离, 4 °C过夜恒压转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭3 h, TBST洗膜15 min, 3次. 用anti-GFP抗体(1:1 000稀释), TBST洗膜15 min, 3次. 再用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠(1:5 000稀释)二抗孵育1 h, TBST洗膜15 min, 3次. ECL显色, 压片. 以GAPDH为内对照, 分别检测两组实验细胞PKARII $\beta$ 的表达.

1.2.5 荧光及共聚焦激光扫描显微镜观察pEGFP-PKARII $\beta$ 细胞内定位: 瞬时转染pEGFP-PKARII $\beta$ 及pEGFP-C1中瞬时转染到HEK-293细胞及胃癌细胞BGC-823, 培养24 h后, 用荧光显

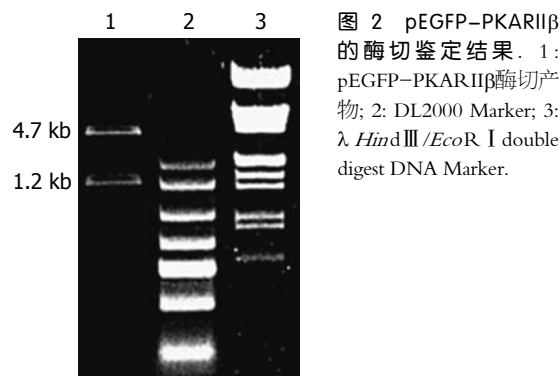


图2 pEGFP-PKARII $\beta$ 的酶切鉴定结果. 1: pEGFP-PKARII $\beta$ 酶切产物; 2: DL2000 Marker; 3:  $\lambda$  *Hind*III/*Eco*R I double digest DNA Marker.

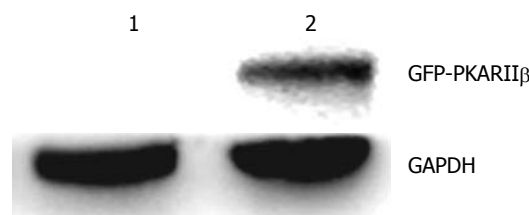


图3 Western blot鉴定pEGFP-PKARII $\beta$ 蛋白表达结果. 1: 转染空质粒pEGFP-C1的BGC-823细胞; 2: 转染 pEGFP-PKARII $\beta$ 的BGC-823细胞.

显微镜及激光共聚焦扫描显微镜进行扫描, 激发光波长为488 nm, 观察转染后细胞内绿色荧光表达.

## 2 结果

2.1 PKARII $\beta$ 全长基因的扩增 PCR扩增结果显示, 目的条带约为1.2 kb左右(图1), 片段大小与已报道的PKARII $\beta$ 基因片段大小相同.

2.2 pEGFP-PKARII $\beta$ 重组表达质粒的构建及鉴定 将pEGFP-PKARII $\beta$ 经*Xho* I和*Eco*R I双酶切后电泳显示, 得到约4.7 kb和1.2 kb左右的两条带, 与预期结果相符, 初步确定得到预期重组质粒(图2). 对酶切鉴定的重组质粒pEGFP-PKARII $\beta$ 测序, 结果正确, 无碱基突变.

2.3 重组pEGFP-PKARII $\beta$ 表达产物的Western blot鉴定 融合GFP-PKARII $\beta$ 蛋白在转染后的BGC-823细胞中表达, 其中重组质粒pEGFP-PKARII $\beta$ 在72 000 Da附近出现一明显的特异性蛋白带, 其分子量与预期相符(图3).

2.4 荧光及共聚焦激光显微镜观察 pEGFP-PKARII $\beta$ 在细胞内的定位, 转染pEGFP-PKARII $\beta$ 及空质粒pEGFP-C1的HEK-293细胞, 荧光显微镜观察空质粒pEGFP-C1的HEK-293细胞绿色荧光遍布核质(图4A); 而pEGFP-PKARII $\beta$ 在细胞质内均匀分布, 细胞核内有少量表达(图4B). 为进一步观察pEGFP-PKARII $\beta$ 在胃癌BGC-823细胞质内定位, 共聚焦激光扫描显微镜观察pEGFP-PKARII $\beta$ 在细

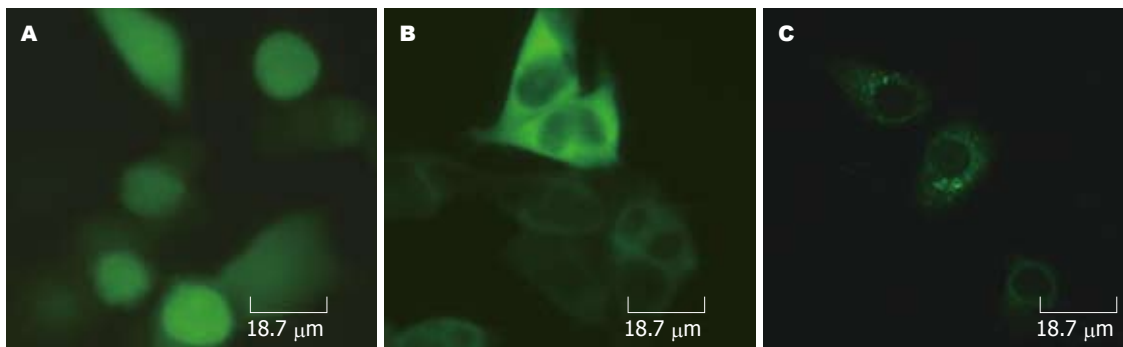


图4 pEGFP-PKARI $\beta$ 融合蛋白在细胞中的定位( $\times 400$ )。A: 转染的空质粒pEGFP-C1(荧光显微镜); B: pEGFP-PKARI $\beta$ 在HEK-293细胞内定位; C: pEGFP-PKARI $\beta$ 在BGC-823细胞的定位(共焦激光扫描显微镜)。

胞质内特异位定位(图4C)。

### 3 讨论

人源PKARI $\beta$ 位于第7号染色体上, 其cDNA大小为1 257 bp, 编码418个氨基酸<sup>[18]</sup>。生物信息学分析表明PKARI $\beta$ 的序列与其他PKA调节亚基的序列上有很大的差别, 只有大约50%序列相同, 而正是PKARI $\beta$ 与其他PKA调节亚基在结构上的差异提示PKARI $\beta$ 可能具有不同的生物学功能<sup>[19]</sup>。因此, 目前对PKARI $\beta$ 的功能及其作用机制的研究已逐渐成为热点。然而, 目前国内外对PKA调节亚基在肿瘤细胞中的功能方面研究还不是很多, 尤其对于他们在肿瘤细胞中参与的信号转导通路的机制仍不很清楚。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)来源于海洋生物水母, 在蓝光或紫光下可发出荧光, 可用来进行实时检测, 目前已被广泛的用作报告基因进行在体和离体的实验研究<sup>[20,21]</sup>。同时在研究基因表达, 细胞分化及蛋白在生物体内定位和转运方面起到了重要作用<sup>[22-24]</sup>, 并且还可用以检测目的基因的高效转染和表达<sup>[25,26]</sup>。

在本研究中, 我们以pRSETB-PKARI $\beta$ 为模板, 设计了2对特异性的引物, 并在引物中掺入了限制性酶切位点, 扩增出PKARI $\beta$ 基因cDNA全长序列, 联合利用酶切鉴定以及基因测序分析的方法, 证实了pEGFP-PKARI $\beta$ 重组质粒构建成功。并将融合质粒转染到HEK293和BGC-823细胞中, 经Western blot验证了融合蛋白在两种细胞中的都成功表达, 利用荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察到绿色荧光所代表的融合蛋白主要在细胞质中表达, 证实了该重组蛋白在两种细胞内的表达与定位, 并且可以清楚地观察到两种细胞中pEGFP-PKARI $\beta$ 定位的差异。通过构建pEGFP-PKARI $\beta$ 融合蛋白真核表达载体, 我们可以比较正常细胞和肿瘤

细胞中PKARI $\beta$ 功能上的差异, 并能利用其对细胞进行瞬时或稳定转染, 使细胞中PKARI $\beta$ 高表达, 进而检测PKARI $\beta$ 调节的下游靶基因的启动子、mRNA及蛋白水平的表达, 分析PKARI $\beta$ 在信号转导中所担当的角色; 而且, 利用稳定高表达PKARI $\beta$ 的细胞系还可以观察PKARI $\beta$ 对肿瘤细胞生长、侵袭、凋亡、细胞周期等的影响<sup>[27]</sup>。

目前已有证据表明, 多种癌症的发生, 包括食管癌、卵巢癌、胰腺癌以及急性成淋巴细胞性白血病等, 都与PKA的异常激活相关<sup>[29-35]</sup>, 但对于胃癌中PKA信号通路的研究目前还很少, 因此对PKARI $\beta$ 参与的信号通路的研究可能为胃癌治疗提供一条新的途径。寻找肿瘤治疗靶点是目前肿瘤研究的热点, 通过比较正常细胞和胃癌细胞中PKARI $\beta$ 在信号通路中功能的差异可能为我们研究肿瘤提供更广泛的思路, 而我们对于PKARI $\beta$ 结构和功能的探索将为未来治疗胃癌及其他恶性肿瘤药物的开发提供新的策略。

### 4 参考文献

- 1 Taskén K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004; 84: 137-167
- 2 Skälhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2000; 5: D678-D693
- 3 Kim C, Vigil D, Anand G, Taylor SS. Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 651-654
- 4 Shemarova IV. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35: 23-42
- 5 Wojtal KA, Hoekstra D, van Ijzendoorn SC. cAMP-dependent protein kinase A and the dynamics of epithelial cell surface domains: moving membranes to keep in shape. *Bioessays* 2008; 30: 146-155
- 6 Scott JD, Santana LF. A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* 2010; 121: 1264-1271
- 7 Yuan W, López Bernal A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth* 2007; 7 Suppl 1: S10

### ■应用要点

本文通过构建GFP-PKARI $\beta$ 载体, 并成功在胃癌BGC-823细胞中表达及定位, 通过比较正常细胞和胃癌细胞中PKARI $\beta$ 在信号通路中功能的差异可能为研究肿瘤提供新的思路和干预靶点, 为探讨PKARI $\beta$ 在胃癌发生发展中的作用具有重要的意义。

### ■同行评价

本文方法先进, 设计合理, 对胃癌发病机制探讨有重要的临床意义.

- 8 Luconi M, Cantini G, Baldi E, Forti G. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci* 2011; 16: 1315-1330
- 9 Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 2008; 20: 1592-1607
- 10 Yaqub S, Taskén K. Role for the cAMP-protein kinase A signaling pathway in suppression of anti-tumor immune responses by regulatory T cells. *Crit Rev Oncog* 2008; 14: 57-77
- 11 Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 216-221
- 12 Merkle D, Hoffmann R. Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: cross-talk with the androgen receptor. *Cell Signal* 2011; 23: 507-515
- 13 Boikos SA, Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R80-R87
- 14 Mantovani G, Bondioni S, Lania AG, Rodolfo M, Peverelli E, Polentarutti N, Veliz Rodriguez T, Ferrero S, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A. High expression of PKA regulatory subunit 1A protein is related to proliferation of human melanoma cells. *Oncogene* 2008; 27: 1834-1843
- 15 Li Y, Chen Y, Tao Y, Wang Y, Chen Y, Xu W. Fibronectin increases RhoA activity through inhibition of PKA in the human gastric cancer cell line SGC-7901. *Mol Med Report* 2011; 4: 65-69
- 16 Welch EJ, Jones BW, Scott JD. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv* 2010; 10: 86-97
- 17 Gu L, Lau SK, Loera S, Somlo G, Kane SE. Protein kinase A activation confers resistance to trastuzumab in human breast cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7196-7206
- 18 Solberg R, Sistonen P, Träskelin AL, Bérubé D, Simard J, Krajci P, Jahnsen T, de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 1992; 14: 63-69
- 19 Inan M, Lu HC, Albright MJ, She WC, Crair MC. Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. *J Neurosci* 2006; 26: 4338-4349
- 20 Kisgati M, Asmis R. Generation of retroviruses for the overexpression of cytosolic and mitochondrial glutathione reductase in macrophages in vivo. *Cytotechnology* 2007; 54: 5-14
- 21 Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. *Cytotechnology* 2007; 54: 15-24
- 22 Malecaze F, Couderc B, de Neuville S, Serres B, Mallet J, Douin-Echinard V, Manenti S, Revah F, Darbon JM. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2365-2372
- 23 Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, Metzger ME, Krouse A, Donahue RE, Kepes S, Gray J, Dunbar CE, Persons DA, Nienhuis AW. Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 2004; 103: 4062-4069
- 24 Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 929-939
- 25 Zhong F, Zhong ZY, Liang S, Li XJ. [Transfection of GFP mRNA in dendritic cells and analysis of some factors involved]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2006; 22: 716-719
- 26 张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2607-2612
- 27 Diviani D. Modulation of cardiac function by A-kinase anchoring proteins. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 166-173
- 28 刘康栋, 王瑾瑾, 赵继敏, 杨洪艳, 黄幼田, 郑智敏, 董子明. 互隔交链孢毒素活化NIH3T3细胞中蛋白激酶A. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2637-2641
- 29 Naviglio S, Caraglia M, Abbruzzese A, Chiosi E, Di Gesto D, Marra M, Romano M, Sorrentino A, Sorvillo L, Spina A, Illiano G. Protein kinase A as a biological target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 83-92
- 30 Park SY, Cho SJ, Kwon HC, Lee KR, Rhee DK, Pyo S. Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. *Cancer Lett* 2005; 224: 123-132
- 31 Chen Y, Wang Y, Yu H, Wang F, Xu W. The cross talk between protein kinase A- and RhoA-mediated signaling in cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; 230: 731-741
- 32 Waschek JA, Diccico-Bloom E, Nicot A, Lelievre V. Hedgehog signaling: new targets for GPCRs coupled to cAMP and protein kinase A. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 120-128
- 33 Stratakis CA. New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300: 152-157
- 34 Cheadle C, Nesterova M, Watkins T, Barnes KC, Hall JC, Rosen A, Becker KG, Cho-Chung YS. Regulatory subunits of PKA define an axis of cellular proliferation/differentiation in ovarian cancer cells. *BMC Med Genomics* 2008; 1: 43
- 35 Ji Z, Mei FC, Miller AL, Thompson EB, Cheng X. Protein kinase A (PKA) isoform RIIbeta mediates the synergistic killing effect of cAMP and glucocorticoid in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 21920-21925

编辑 李薇 电编 何基才

# 胃癌中靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体的构建及功能

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波, 山东大学附属山东省立医院胃肠外科 山东省济南市 250021

程力, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤发生机制的研究。

作者贡献分布: 程力与李乐平对此文所作贡献均等; 此课题由郭晓波、程力及李乐平设计; 实验过程由郭晓波、徐韬及李辰生操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由靖昌庆与张黎提供; 数据分析由郭晓波与徐韬完成; 本论文写作由郭晓波与程力完成。

通讯作者: 郭晓波, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属山东省立医院胃肠外科. guo992352@hotmail.com

电话: 0531-85187117

收稿日期: 2011-02-07 修回日期: 2010-03-25

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Construction of a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene

Li Cheng, Le-Ping Li, Li Zhang, Chang-Qing Jing, Tao Xu, Chen-Sheng Li, Xiao-Bo Guo

Li Cheng, Le-Ping Li, Li Zhang, Chang-Qing Jing, Tao Xu, Chen-Sheng Li, Xiao-Bo Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Bo Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. guo992352@hotmail.com

Received: 2011-02-07 Revised: 2011-03-25

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To explore the potential role of miR-331 in gastric carcinogenesis by constructing a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene and investigating the impact of transfection with this vector on the expression of E2F1, a direct target of miR-331.

**METHODS:** A recombinant plasmid carrying miR-331 (pSuper/miR-331) was transfected into SGC-7901 cells by Lipofectin-mediated method. Cells stably expressing miR-331 were selected using G418. Untransfected SGC-7901 cells and those transfected with empty pSuper plasmid were used as controls. The expression of miR-331 was detected by TaqMan real-time PCR, while the expression of E2F1 protein was

detected by Western blot.

**RESULTS:** Compared with untransfected SGC-7901 cells, the expression level of E2F1 protein exhibited a 4.27-fold decrease in cells stably expressing miR-331 ( $0.206 \pm 0.037$  vs  $0.879 \pm 0.082$ ,  $P < 0.05$ ). The rate of colony formation on soft agar significantly decreased in cells stably transfected with the recombinant vector when compared to control cells ( $1.863 \pm 0.098$  vs  $7.074 \pm 0.182$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** A eukaryotic expression vector stably expressing miR-331 has been successfully constructed and can be used to study the functions of miR-331 in human gastric cancer.

**Key Words:** Gastric carcinoma; MiR-331; Expression vector; SGC-7901 cells

Cheng L, Li LP, Zhang L, Jing CQ, Xu T, Li CS, Guo XB. Construction of a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1451-1456

## 摘要

**目的:** 研究构建靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体, 评估其转染人胃癌细胞株SGC-7901细胞后对E2F1基因的干扰效果及其功能, 探讨miR-331在胃癌中可能的作用机制。

**方法:** 将外源性重组真核表达载体pSuper/miR-331转染到人胃癌细胞株SGC-7901内, 经G418筛选并建立高表达miR-331的稳定转染细胞株。稳定表达该miR-331的细胞为SGC-7901-pSuper/miR-331组, 转染空质粒细胞及未处理细胞SGC-7901-pSuper组和SGC-7901组作为对照, 采用实时荧光定量PCR验证miR-331在稳定转染细胞的表达, 蛋白印迹检测其对E2F1基因表达的干扰效果和SGC-7901细胞的功能。

**结果:** 与SGC-7901-pSuper组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞中

## ■背景资料

胃癌在世界范围内仍是引起高死亡率的肿瘤之一, 其发生发展非常复杂, 涉及到多种免疫与分子机制, 与多种基因有关, 包括癌基因激活和抑癌基因失活。迄今, 有关胃癌的发生与发展的机制尚未取得突破性的进展。

## ■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

## ■ 研究前沿

近年来, microRNA的相关研究属研究领域的热点问题。

E2F1蛋白表达明显减少, 降低了4.27倍( $0.206 \pm 0.037$  vs  $0.879 \pm 0.082$ ,  $P < 0.05$ ); 与SGC-7901-pSuper组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞的克隆形成明显减少, 降低了3.80倍( $1.863 \pm 0.098$  vs  $7.074 \pm 0.182$ ,  $P < 0.05$ ), 而SGC-7901-pSuper组与SGC-7901组组间无统计学意义。

**结论:** miR-331真核表达载体构建和稳定表达胃癌细胞筛选成功, 为继续深入的研究miR-331在胃癌中的功能奠定了基础。

**关键词:** 胃癌; 微小RNA-331; 表达载体; SGC-7901细胞

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波. 胃癌中靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体的构建及功能. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1451-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1451.asp>

## 0 引言

近年来, microRNA的相关研究属研究领域的热点问题. 人的miR-331(MI0000812)定位于12号染色体长臂12q22, 与人的miR-3685属于同一个家族, miR-331前体长度为94 bp, 其成熟体分为miR-331-5p和miR-331-3p. 我们前期在对miR-331-3p的研究发现miR-331-3p直接靶向细胞周期相关基因E2F1, 上调miR-331-3p的表达具有抑制胃癌细胞生长和克隆形成的能力<sup>[1]</sup>. 本研究首先通过PCR技术扩增miR-331前体357 bp扩增后, 定向克隆到microRNA真核表达载体pSUPER.neo+GFP上, 并将其转染至SGC-7901细胞株中, 筛选稳定表达miR-331胃癌细胞株SGC-7901细胞后, 采用实时荧光定量PCR和蛋白印迹检测其对E2F1基因表达的干扰效果和SGC-7901细胞的功能. 以初步探讨miR-331在胃癌细胞的作用, 为今后深入研究该microRNA在胃癌发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株SGC-7901购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所细胞库. 反转录酶、限制性内切酶、LA-Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司; Transwell小室、Taq DNA聚合酶购自Promega公司; T4连接酶购自天根公司; 小量质粒抽提试剂盒购自上海申能博采公司; 大量质粒抽提试剂盒购自Qiagen公司; 低分子量标准蛋白质购自华美公司; DNA Marker、琼脂糖购自Gibco BRL公司; 蛋白Marker购自天

根公司; Lipofectamine脂质体购自Invitrogen公司; microRNA抽提、逆转、定量分析购自Qiagen公司; miR-331前体引物试剂均购自Ambion公司; E2F1、GAPDH蛋白单克隆抗体购自Abcam公司; pSuper.gfp/neo空载体由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 miR-331真核表达载体的构建:** 以人胃癌细胞株SGC-7901基因组为模板扩增miR-331前体. 引物设计Pre-microRNA-331(上海生工公司合成)上游引物5'-GCGAGATCTCCTGGTACAGTCGTGGAGGT-3'. 下游引物5'-GCGCTCGAGTATAATGCCAAAGGCTGGGA-3'. 其中引入*Bgl* II和*Xho* I两个酶切位点. PCR扩增条件94 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环, 最后72 °C延长10 min. 凝胶电泳鉴定可见约357 bp目的条带. 用上海申能博采公司纯化试剂盒纯化PCR产物. *Bgl* II和*Xho* I(购于TaKaRa公司)双酶切后再次纯化得到miR-331前体目的片段. pSuper.gfp/neo载体用*Bgl* II和*Xho* I双酶切并纯化后, 插入miR-331前体目的片段, 载体构建成功后即pSuper/miR-331送博尚生物有限公司测序鉴定。

**1.2.2 稳定转染胃癌细胞SGC-7901的筛选:** 胃癌细胞SGC-7901用RPMI-1640(10% HYCLONE 血清)培养, 转染前1 d种6孔板, 每孔细胞数为 $1 \times 10^5$ 个, 细胞生长至90%融合时用Lipofectamine2000脂质体进行转染. 将pSuper.gfp/neo空载体和pSuper/miR-331载体转染胃癌细胞SGC-7901转染24 h后, 加入含G418(1 000 mg/L)的培养液筛选稳定转染细胞株, 3-4 wk克隆形成后, 荧光显微镜下观察克隆的荧光显示情况, 若克隆集中显示荧光, 则挑出克隆继续扩群培养, G418改为400 mg/L的维持浓度. 最后通过定量PCR验证miR-331的表达。

**1.2.3 Western blot检测E2F1蛋白表达水平:** 提取细胞总蛋白, 定量, 与上样缓冲液按比例混匀, 100 °C煮5 min, 8% SDS-PAGE电泳后电转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗涤3次, 每10 min换液1次. 加入二抗, 37 °C孵育45 min, TBST洗涤3次, 每15 min换液1次, 在暗室中压片, 然后显影、定影. 图像应用AlphaImager 2200软件进行分析. 以GAPDH(单抗工作浓度为1:4 000)为内参照。

**1.2.4 软琼脂克隆的形成:** PBS配1.2%软琼脂, 均匀铺在6孔板底层, 待其凝固, 4 °C保存备用,

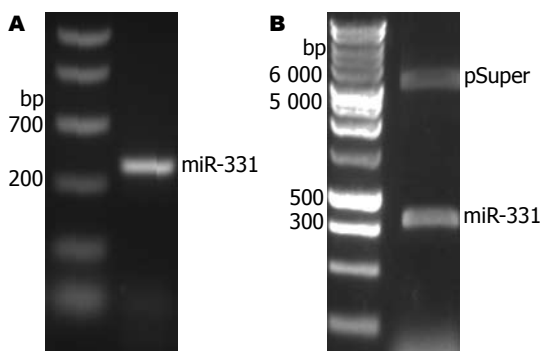


图1 miR-331真核表达载体的构建. A: PCR扩增miR-331前体, 大小约357 bp; B: pSuper/miR-331真核表达载体双酶切鉴定, 片段大小完全正确.

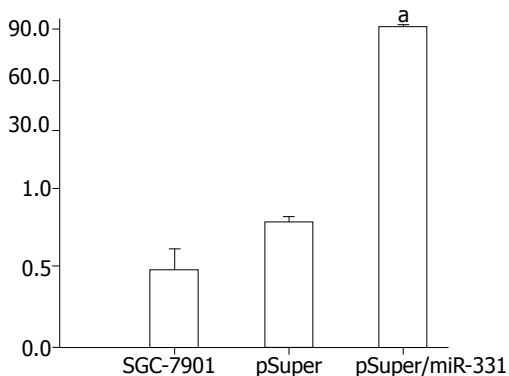


图2 稳定转染胃癌细胞SGC-7901中miR-331定量分析. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs pSuper.

将0.6%软琼脂与含血清培养基按1:1稀释(至0.3%软琼脂), 37℃恒温保存. 收集细胞并计数, 取 $1 \times 10^2$ 的细胞数与适量的0.3%软琼脂充分混合, 平铺于0.6%软琼脂层之上. 细胞培养箱培养(37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>), 直至见到克隆形成(约3-4 wk). 用染色液染色并在显微镜下分别计数10个不同视野含50个细胞以上的克隆数. 实验重复3次, 取均值.

1.2.5 体外Matrigel侵袭实验: 用Transwell小室作为胃癌细胞侵袭模型, 在上室面铺一层基质胶Matrigel Matrix(50 μg/cm<sup>2</sup>), 加入 $1 \times 10^8$ /L浓度的稳定转染胃癌细胞SGC-7901, 下室加入培养液, 观察两组细胞的侵袭能力.

统计学处理 用医用SPSS15.0统计软件进行分析、处理. 数据以mean±SD表示. 组间均数的比较采用单因素方差分析. 行\*列表资料的率差别采用 $\chi^2$ 检验.  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 miR-331重组质粒表达载体的构建 以人胃癌细胞株SGC-7901基因组为模板扩增miR-331前体, 可得到约357 bp目的条带(图1A). 将目的

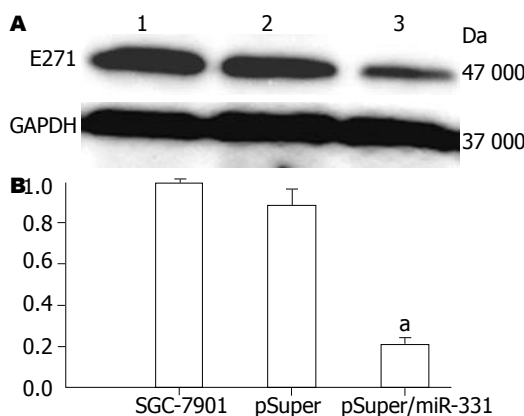


图3 miR-331对E2F1基因表达的影响. A: miR-331高表达抑制E2F1基因表达; B: E2F1基因mRNA相对表达量降低. 1: SGC-7901; 2: pSuper; 3: pSuper/miR-331. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs pSuper.

条带纯化后并经过*Bgl* II和*Xho* I双酶切克隆入microRNA表达载体pSuper.gfp/neo载体, 挑选阳性克隆鉴定(图1B), DNA测序表明miR-331真核表达载体构建成功.

2.2 RT-PCR验证miR-331的表达 在人胃癌细胞SGC-7901、转染pSuper空载体组和转染pSuper/miR-331载体组定量值分别是:  $0.469 \pm 0.138$ 、 $0.769 \pm 0.043$ 和 $91.583 \pm 0.865$ , 与对照组pSuper空载体组相比较, 转染了pSuper/miR-331载体组miR-331表达量具有显著差异( $P < 0.05$ , 图2), 表明稳转细胞筛选成功.

2.3 Western blot检测E2F1蛋白表达水平 与pSuper空载体组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞中E2F1蛋白表达明显减少, 降低了4.27倍( $0.206 \pm 0.037$  vs  $0.879 \pm 0.082$ ,  $P < 0.05$ ). 而转染了pSuper空载体组的SGC-7901细胞组与正常组间无统计学意义( $P > 0.05$ ). 结果表明转染了miR-331的SGC-7901细胞E2F1蛋白的表达水平明显减少(图3). 实验结果表明E2F1蛋白是miR-331靶向之一.

2.4 miR-331高表达对克隆形成和侵袭的影响 与转染pSuper空载体的SGC-7901细胞对照组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞的克隆形成明显减少, 降低了3.80倍( $1.863 \pm 0.098$  vs  $7.074 \pm 0.182$ ,  $P < 0.05$ , 图4), 而转染了pSuper空载体的SGC-7901细胞组与正常组间无统计学意义( $P > 0.05$ ), 实验结果提示miR-331高表达抑制胃癌细胞SGC-7901克隆形成; 同样miR-331高表达抑制胃癌细胞SGC-7901侵袭.

## 3 讨论

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 但目前我们

### ■ 相关报道

Epis等在前列腺癌细胞中研究发现miR-331-3p在前列腺癌组织中低表达, 转染miR-331-3p前体能抑制ERBB-2基因的表达并能阻止下游PI3K/AKT雄激素受体信号通路, 通过降低雄激素刺激前列腺特异性抗原启动子活性, 抑制前列腺特异性抗原的表达.

### 应用要点

本文构建了pSuper/miR-331真核表达载体,通过实验证明其可在胃癌SGC-7901细胞中有效表达并转变为成熟的miR-331发挥生物学作用.

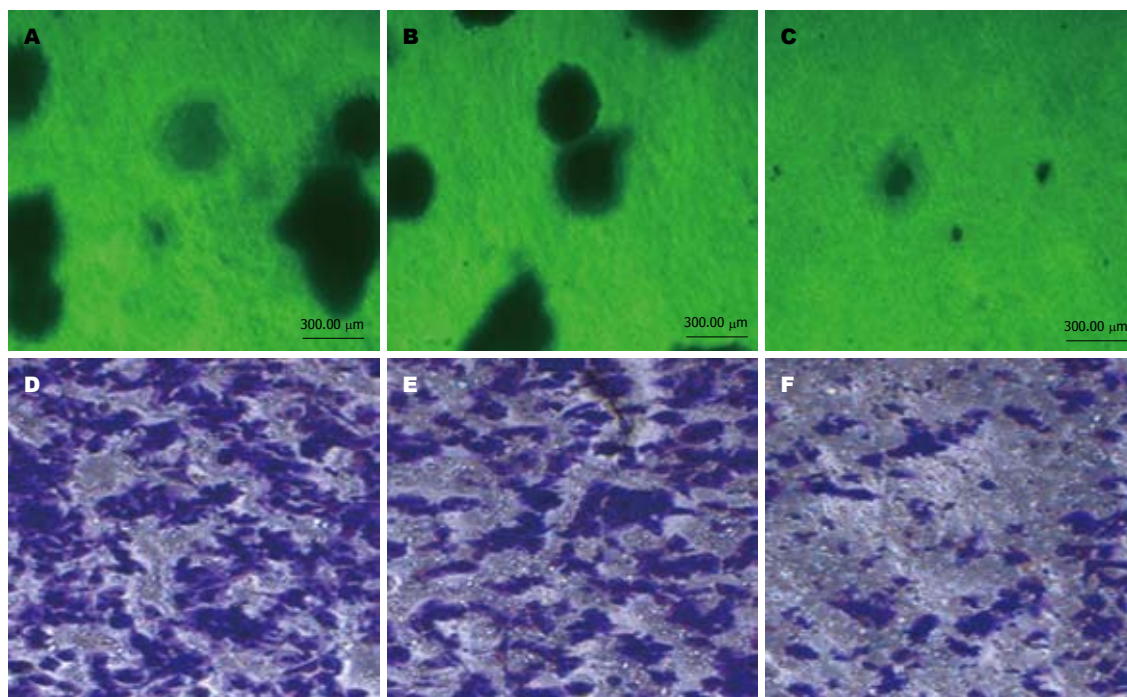


图4 miR-331抑制胃癌细胞克隆形成和侵袭( $\times 100$ ). A-C: 克隆形成; D-F: 侵袭. A, D: SGC-7901; B, E: pSuper; C, F: pSuper/miR-331.

对胃癌的发病机制尚缺乏全面和深入的了解. 已有研究报道, 胃癌中也存在广泛的microRNA表达失调<sup>[2-6]</sup>. miRNA是近年才被发现的一类小分子单链RNA, 长度通常21-25 nt, 具有发夹样茎-环二级结构, 他主要通过与成熟mRNA的3'-UTR序列相结合, 抑制mRNA的翻译或使mRNA降解, 从而抑制基因的表达<sup>[7-10]</sup>. 成熟microRNA通过与靶基因完全(植物内)或不完全(动物内)互补结合, 促进靶基因mRNA降解或者抑制翻译, 调控基因表达, 广泛参与生命过程中一系列重要进程, 包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、脂肪代谢和细胞分化<sup>[7,8,11-13]</sup>. 目前, 对于microRNA功能研究主要通过真核表达载体、体外转录以及直接合成3种方法为主. 由于RNA本身容易受RNA酶污染而降解, 合成价格昂贵、使用次数有限, 使得后两种方法的应用有限, 而采用真核表达载体, 却有独特的优势<sup>[3,14-16]</sup>. 在本研究中我们首先通过生物信息学的方法分析了miR-331, 人的miR-331(MI0000812)定位于12号染色体长臂12q22, 与人的miR-3685属于同一个家族, miR-331前体长度为94 bp, 其成熟体分为miR-331-5p和miR-331-3p. Epis等<sup>[17]</sup>在前列腺癌细胞中研究发现miR-331-3p在前列腺癌组织中低表达, 转染miR-331-3p前体能抑制ERBB-2基因的表达并能阻止下游PI3K/Akt雄激素受体信号通路, 通过降低雄激素刺激前列腺特异性

抗原启动子活性, 抑制前列腺特异性抗原的表达; Wang等<sup>[18]</sup>通过对90个永生化淋巴瘤母细胞系366种miRNAs和14 174 mRNAs之间关联分析研究发现, miR-331与细胞周期相关. 为了更好地研究miR-331在胃癌中的作用, 本研究采用microRNA表达载体pSuper.gfp/neo载体, 此载体具有H1型启动子和绿色荧光蛋白, 当microRNA插入此载体多克隆位点时被宿主细胞Dicer酶切割, 成为成熟的microRNA. 构建的miR-331真核表达载体转染到SGC-7901细胞, 该细胞本身低表达miR-331<sup>[11]</sup>, 转染进的miR-331前体能被宿主细胞Dicer酶切割, 成为成熟的miR-331, 本实验为构建microRNA表达载体提出新的思路与方法. 其次, 构建的质粒转染入细胞后可整合到细胞基因组中, 稳定表达并与绿色荧光蛋白融合表达, 绿色荧光蛋白的表达可以间接反映microRNA表达情况, 并可以衡量质粒导入细胞过程中的转染效率以及表达情况. 通过越来越多的证据显示, 人类的一些恶性肿瘤组织中microRNA基因的表达发生改变, 如肺癌<sup>[8,14]</sup>、肝癌<sup>[19]</sup>、结肠癌<sup>[15]</sup>、乳腺癌<sup>[12]</sup>、食管癌<sup>[20]</sup>. microRNA在胃癌中的调节作用也被越来越多的实验证实<sup>[3,21-25]</sup>, Wan等<sup>[26]</sup>发现miR-9在人类胃癌中下调, 过表达的miR-9抑制人胃癌MGC-803细胞的生长, miR-9打靶NF- $\kappa$ B1, 并且调节胃癌细胞的生长. miR-150在胃癌细胞系和组织中高表达, 异位表

达的miR-150促进肿瘤和胃癌细胞扩散. 荧光素酶报告基因分析表明, EGR2是miR-150的直接靶位点<sup>[27]</sup>. 人类结肠癌细胞系中, miR-200b表达上调, 加入5-氟尿嘧啶处理之后miR-200b表达下调. miR-200b抑制络氨酸磷酸酶蛋白-PTPN12, 从而使c-Abl、Src和Ras等癌基因失活<sup>[28]</sup>. 为了更好阐明miR-331在胃癌发生发展中的作用, 我们通过蛋白印迹实验显示miR-331高表达抑制细胞周期相关基因E2F1的表达, 并通过克隆形成和侵袭实验对其进行了初步探讨, 本实验发现, miR-331高表达对胃癌SGC-7901细胞的克隆形成具有明显的抑制作用, 过表达的miR-331能够抑制胃癌SGC-7901细胞的侵袭. 目前, 虽然已经鉴定出了大量的microRNA, 但其作用机理以及许多microRNA的生理功能还不是很清楚. 本实验构建了pSuper/miR-331真核表达载体, 通过实验证明其可在胃癌SGC-7901细胞中有效表达并转变为成熟的miR-331发挥生物学作用, 表明真核表达载体pSuper/miR-331转染细胞可用于其功能研究. 此结果为进一步研究miR-331在胃癌发生发展中的作用提供了实验基础.

#### 4 参考文献

- Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Zhang J, Chen X, Cai Q, Li J, Gu Q, Liu B, Zhu Z, Yu Y. miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 1-6
- Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 537-542
- Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer and Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells in Combination with Trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2725-2733
- Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pilozzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 272-286
- Zeng Y, Sun QM, Liu NN, Dong GH, Chen J, Yang L, Wang B. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3578-3583
- Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2883-2888
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632
- Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 2006; 25: 6176-6187
- Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol* 2006; 209: 266-269
- Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 2010; 148: 381-392
- Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5004-5008
- Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP, Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Sheils O, Sheppard B, O'Leary J. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer* 2008; 7: 35
- Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2030-2037
- 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
- 严辉, 陈卫昌, 岑建农, 沈宏杰, 郭凌川, 顾冬梅, 谢学顺. 转染GKLF基因对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 7-12
- Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, Leedman PJ. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem* 2009; 284: 24696-24704
- Wang L, Oberg AL, Asmann YW, Sicotte H, McDonnell SK, Riska SM, Liu W, Steer CJ, Subramanian S, Cunningham JM, Cerhan JR, Thibodeau SN. Genome-wide transcriptional profiling reveals microRNA-correlated genes and biological processes in human lymphoblastoid cell lines. *PLoS One* 2009; 4: e5878
- Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
- Zhou SL, Wang LD. Circulating microRNAs: novel biomarkers for esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2348-2354
- Jin Z, Selaru FM, Cheng Y, Kan T, Agarwal R, Mori Y, Olaru AV, Yang J, David S, Hamilton JP, Abraham JM, Harmon J, Duncan M, Montgomery EA, Meltzer SJ. MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression in vitro. *Oncogene* 2011; 30: 1577-1585
- Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010; 5: e13247
- Song YX, Yue ZY, Wang ZN, Xu YY, Luo Y, Xu HM,

#### 同行评价

本文方法先进, 设计合理, 对胃癌的治疗有重要的指导意义.

- Zhang X, Jiang L, Xing CZ, Zhang Y. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer* 2011; 10: 1
- 24 Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2066-2073
- 25 Takei Y, Takigahira M, Mihara K, Tarumi Y, Yanagihara K. The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1442-1453
- 26 Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 16
- 27 Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392: 340-345
- 28 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253

编辑 曹丽鸥 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》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.

# 外源性IL-10对急性坏死性胰腺炎大鼠胰腺及肝组织STAT3表达的影响

梁志海, 王琚平, 唐国都

梁志海, 王琚平, 唐国都, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

梁志海, 副主任医师, 主要从事急性胰腺炎发病机制的基础与临床研究。

广西自然科学基金资助项目(桂科自), No. 0447054

作者贡献分布: 此课题由唐国都、梁志海及王琚平共同设计; 研究过程由唐国都指导; 梁志海与王琚平操作完成; 数据分析由王琚平完成; 本论文写作由唐国都指导; 梁志海与王琚平共同完成。

通讯作者: 唐国都, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。

tguodu02@yahoo.com.cn

电话: 0771-5356501

收稿日期: 2011-03-30 修回日期: 2011-05-06

接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Exogenous IL-10 down-regulates STAT3 expression in pancreatic and hepatic tissue of rats with acute necrotizing pancreatitis

Zhi-Hai Liang, Jun-Ping Wang, Guo-Du Tang

Zhi-Hai Liang, Jun-Ping Wang, Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Gui Ke Zi No. 0447054

Correspondence to: Professor Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. tguodu02@yahoo.com.cn

Received: 2011-03-30 Revised: 2011-05-06

Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-05-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of treatment with exogenous interleukin-10 (IL-10) on the expression of signal transducer and activator of transcription3 (STAT3) in pancreatic and hepatic tissue of rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP).

**METHODS:** Ninety-two male Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups: control group ( $n = 24$ ), ANP group ( $n = 36$ ), and IL-10 group ( $n = 32$ ). ANP was induced in rats by intraperitoneal injection (ip) of *L*-arginine. The IL-10 group was treated with 10 000 units

of recombinant human IL-10 (rhIL-10) by ip at 2, 5, and 8 h after the last *L*-arginine injection. Rats were killed at 4, 12, 24, and 36 h after the last *L*-arginine injection. Pancreatic and hepatic histopathological changes were scored, and the expression of STAT3 was detected by immunohistochemical (IHC) staining.

**RESULTS:** Pancreatic and hepatic histopathological scores at all time points were significantly higher in the ANP group and IL-10 group than in the control group (all  $P < 0.01$  or  $0.05$ ). Compared to the ANP group, pancreatic histopathological scores at 12, 24, and 36 h and hepatic histopathological score at 24 h were significantly lower in the IL-10 group (all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The expression levels of STAT3 in pancreatic and hepatic tissue at all time points were significantly lower in the ANP group and IL-10 group than in the control group (all  $P < 0.01$ ). The expression levels of STAT3 in pancreatic (12 h:  $174.61 \pm 6.25$  vs  $146.10 \pm 10.51$ ; 24 h:  $178.55 \pm 10.36$  vs  $150.63 \pm 9.11$ ; 36 h:  $193.37 \pm 21.54$  vs  $155.55 \pm 11.70$ , all  $P < 0.01$  or  $0.05$ ) and hepatic tissue (24 h:  $89.88 \pm 18.89$  vs  $38.85 \pm 10.27$ ; 36 h:  $48.79 \pm 15.38$  vs  $23.51 \pm 5.67$ , all  $P < 0.01$ ) were significantly higher in the IL-10 group than in the ANP group.

**CONCLUSION:** STAT3 may be involved in the early inflammatory response to ANP. Exogenous IL-10 could improve pancreatic and hepatic tissue injury in ANP rats possibly by down-regulating STAT3 expression.

**Key Words:** Acute necrotizing pancreatitis; Interleukin-10; Signal transducer and activator of transcription 3; Pancreatic tissue; Hepatic tissue

Liang ZH, Wang JP, Tang GD. Exogenous IL-10 down-regulates STAT3 expression in pancreatic and hepatic tissue of rats with acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1457-1462

### 摘要

**目的:** 探讨外源性人重组白介素10(IL-10)在急

### ■背景资料

IL-10可以减轻急性胰腺炎的病理损伤、炎症反应,但其作用机制尚未完全阐明; JAK1/STAT3信号转导途径与IL-10密切相关,但目前关于STAT3与急性胰腺炎的关系报道不多,关于急性胰腺炎肝损伤的STAT3表达相关研究更少。

### ■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## ■ 研发前沿

IL-10的抗炎作用已经得到公认,目前研究的热点主要是IL-10对炎症性疾病的保护作用及机制。目前所知可能与此有关的信号转导途径包括NF- $\kappa$ B、JAK/STAT、MAPK等;IL-10受体、IL-10家族的其他成员在炎症反应中发挥的作用也引人关注。

性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠胰腺及肝组织中对信号转导和转录激活因子3(STAT3)表达的影响。

**方法:** 92只健康SD  $\delta$  大鼠随机分为正常对照组(C组,  $n = 24$ )、ANP组(A组,  $n = 36$ )和IL-10后干预组(I组,  $n = 32$ )。采用腹腔注射左旋精氨酸(*L*-arginine)的方法诱导大鼠ANP模型,注射*L*-arginine后2、5、8 h,腹腔注射重组IL-10 10 000 U干预后,分别于4、12、24、36 h分批处死各组大鼠,苏木精-伊红染色(HE)观察大鼠胰腺及肝组织病理学变化,快捷免疫组织化学MaxVision™法检测在胰腺和肝组织中STAT3的表达变化。

**结果:** A组、I组各时点胰腺病理学评分显著高于C组(均 $P < 0.01$ ),12、24、36 h的I组胰腺评分较A组低(均 $P < 0.05$ )。肝组织A组各时点病理学评分均显著高于C组(均 $P < 0.05$ 或 $0.01$ );I组肝脏病理评分高于C组(均 $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),除24 h较A组下降以外,其余各时点与A组无差异。胰腺组织和肝组织的A组、I组各时点STAT3灰度值均显著低于C组( $P < 0.01$ );I组胰腺12、24、36 h的STAT3灰度值显著高于A组(12 h:  $174.61 \pm 6.25$  vs  $146.10 \pm 10.51$ ; 24 h:  $178.55 \pm 10.36$  vs  $150.63 \pm 9.11$ ; 36 h:  $193.37 \pm 21.54$  vs  $155.55 \pm 11.70$ , 均 $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。I组肝组织24、36 h的STAT3灰度值显著高于A组(24 h:  $89.88 \pm 18.89$  vs  $38.85 \pm 10.27$ ; 36 h:  $48.79 \pm 15.38$  vs  $23.51 \pm 5.67$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** 外源性IL-10后干预对ANP胰腺及肝组织损伤有一定保护作用,STAT3可能早期即参与ANP胰腺和肝脏组织的炎症反应,IL-10可能通过抑制STAT3途径对胰腺、肝组织起保护作用。

**关键词:** 急性坏死性胰腺炎;白介素10;信号转导和转录激活因子3;胰腺组织;肝组织

梁志海,王瑞平,唐国都. 外源性IL-10对急性坏死性胰腺炎大鼠胰腺及肝组织STAT3表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1457-1462

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1457.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急症,其中15%-20%发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP),SAP常并发多器官损伤,病死率较高,其死亡原因多为多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),其中AP肝功能衰竭的发生率虽

然只有5%,但一旦肝功能衰竭发生,多会导致死亡。国外一项对178例SAP相关MODS患者的回顾性研究中,具有最高死亡率的是肝衰竭患者占83%,而多器官衰竭患者中,又以肝肾衰竭死亡率最高91%<sup>[1]</sup>。国内文献报道,AP肝损伤发生率40.1%-73.0%,肝功能衰竭发生率约5%;SAP肝损伤发生率88.9%-100.0%<sup>[2]</sup>。

AP发病机制至今尚未完全阐明,细胞因子级联瀑布效应是AP不断恶化的重要机制。酪氨酸蛋白激酶(janus kinas 1, JAK1)/信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)通路是细胞因子信息传递最重要的通道之一,目前已发现多种细胞因子,如IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 等,均可通过激活JAK/STAT信号转导通路,在炎症反应的发生、发展过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。STAT3是单核吞噬细胞系统(mononuclear phagocyte system, MPS)中抗炎信号的最重要中间体,在细胞因子诱导的细胞特异性应答反应中起关键作用。目前STAT3介导的IL-10抗炎反应机制逐渐被了解,有学者认为IL-10的产生与STAT3途径被激活有关<sup>[4]</sup>,并有望成为调节炎症的新途径。本实验通过建立ANP大鼠模型,给予外源性IL-10对ANP大鼠进行后干预,应用免疫组织化学法观察STAT3在胰腺和肝组织表达随时点变化的情况,探讨IL-10在ANP大鼠胰腺及肝组织中对STAT3表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康SD  $\delta$  大鼠92只,清洁级,鼠龄2-3 mo,体质量250-350 g,由广西医科大学实验动物中心提供。*L*-arginine(美国Sigma)、rhIL-10(美国R&D)、兔抗大鼠多克隆抗体(美国Lab Vision)、MaxVision™试剂盒(福州迈新)。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱导ANP模型及干预方法:** 同本课题组文献所述<sup>[5]</sup>,92只健康SD  $\delta$  大鼠随机分为正常对照组(C组,  $n = 24$ )、ANP组(A组,  $n = 36$ )和IL-10后干预组(I组,  $n = 32$ )。A组大鼠分3次给予6% *L*-arginine( $3 \times 1.0$  mg/g体质量)ip,注射间隔1 h,诱导ANP模型;I组于末次*L*-arginine注射后2、5、8 h分别ip外源性rhIL-10各10 000 U,共30 000 U;C组大鼠予0.9%生理盐水ip对照。各组大鼠均于末次注射*L*-arginine后4、12、24、36 h分批处死并取材。

**1.2.2 胰腺及肝组织病理检查:** 胰腺组织病理学评分采用Kusske法<sup>[6]</sup>,肝组织病理学评分法参考

表 1 大鼠胰腺、肝组织病理评分 (mean ± SD)

分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
胰腺					
C组	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
A组	9	4.45 ± 1.33 <sup>b</sup>	5.33 ± 1.66 <sup>b</sup>	7.89 ± 1.67 <sup>b</sup>	8.33 ± 1.12 <sup>b</sup>
I组	8	4.13 ± 1.23 <sup>a</sup>	3.75 ± 1.28 <sup>ca</sup>	4.75 ± 1.75 <sup>ad</sup>	6.75 ± 1.39 <sup>ad</sup>
肝脏					
C组	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
A组	9	1.78 ± 0.44 <sup>b</sup>	2.11 ± 0.33 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.53 <sup>b</sup>	2.78 ± 0.44 <sup>a</sup>
I组	8	1.50 ± 0.53 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.53 <sup>b</sup>	1.88 ± 0.64 <sup>bc</sup>	2.38 ± 0.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs C组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs A组.

Suzuki法<sup>[7]</sup>.

1.2.3 免疫组织化学检测: 采用MaxVision™法检测胰腺及肝组织STAT3的表达变化. 按说明书操作, 设阳性及阴性对照. 结果判断标准: 在400倍镜下观察组织切片, 每张切片选取四周及中央共5个区域, 以细胞胞质或胞核出现棕黄色颗粒, 且着色强度明显高于背景非特异性染色者判断为阳性. 使用Leica QWin分析软件检测视野灰度值进行定量分析, 取值范围为0-255, 白色为255, 黑色为0. 灰度值越高, 染色越浅, STAT3表达产物越少; 灰度值越低, 染色越深, STAT3表达产物越高.

**统计学处理** 应用SPSS13.0分析, 对实验数据进行方差分析(方差齐时用One-way ANOVA, 以LSD进行多重比较; 方差不齐时用非参数检验, 以Mann-Whitney U进行多重比较. 所有实验数据均以mean ± SD表示,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 胰腺病理学改变 C组各时点胰腺腺泡结构完整、腺小叶清晰; A组胰腺可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 在胰腺实质、间质内有中性粒细胞、淋巴细胞浸润以及出血病灶形成. 随时间延长病变加重, 24 h以后可见大片胰腺组织凝固性坏死. A组各时点病理学评分显著高于C组( $P < 0.01$ ), I组病理损伤较A组轻( $P < 0.05$ , 表1).

2.2 肝脏病理学改变 ANP大鼠肝脏大体标本没有明显变化. 光镜观察: C组各时点标本肝血管、肝细胞, 间质均正常, 可见正常肝组织存在淋巴细胞及巨噬细胞, 无细胞坏死, 评分为0分; A组肝脏标本在镜下可见充血、少量中性粒细胞浸润普遍存在, 可见血栓形成、肝细胞水肿明显, 个别有门脉周围炎, 随时间延长病变加重, 出现

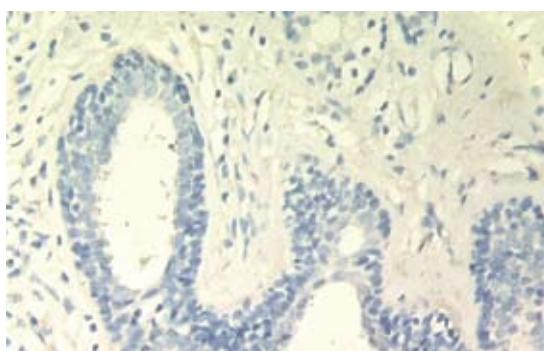


图 1 IHC染色阴性对照(×400).

灶状肝细胞凝固性坏死、大量炎症细胞浸润; I组大鼠肝脏血栓、坏死、炎症细胞浸润较A组轻, 但明显重于C组, 可见少量中性粒细胞浸润, 偶有肝细胞水肿, 血栓少见, 未见肝细胞凝固性坏死. A组4、12、24 h病理学评分显著高于C组( $P < 0.01$ ), 36 h病理学评分显著高于C组( $P < 0.05$ ), A组各时点评分呈上升趋势; I组4、12、24 h病理学评分显著高于C组( $P < 0.01$ ), 36 h病理学评分显著高于C组( $P < 0.05$ ); 除24 h病理学评分低于A组( $P < 0.05$ )外, 其余各时点病理评分与A组无差异(表1).

2.3 胰腺组织中STAT3表达 C组呈阴性表达, 细胞胞质淡蓝色, 胞核深蓝色; A组各时点均见阳性产物表达, 主要在胰岛细胞的胞质表达, 呈棕黄色颗粒, 部分呈棕褐色, 其他部位胞质、胞膜和腺泡腔表达较少, 呈浅黄色, 组织边缘处阳性表达强于内部; I组表达部位似A组, 为棕黄和浅黄色颗粒. A组各时点STAT3灰度值显著低于C组( $P < 0.01$ ); 提示A组STAT3的表达4 h已显著高于C组, 随后表达减少. I组各时点STAT3灰度值显著低于C组( $P < 0.01$ ), STAT3灰度值随时间延长从4 h开始逐渐增高, 12、24、36 h灰度值显著高于A组( $P < 0.01$ 或 $< 0.05$ )(表2, 图1, 2); 提示I

### ■ 相关报道

Keceli等研究提示外源性IL-10可以减轻雨蛙肽诱导的急性胰腺炎大鼠胰腺损伤; 李敏利等进行的体外实验结果提示特异性的JAK2抑制剂AG490可以通过抑制促炎细胞因子IL-18诱导JAK/STAT信号通路的活化, 达到减少炎症反应和肝损伤.

### ■创新盘点

本研究是国内首次研究外源性IL-10干预对急性胰腺炎的胰腺和肝脏病理损伤和STAT3表达的影响,丰富了外源性IL-10应用于治疗急性胰腺炎的理论体系。

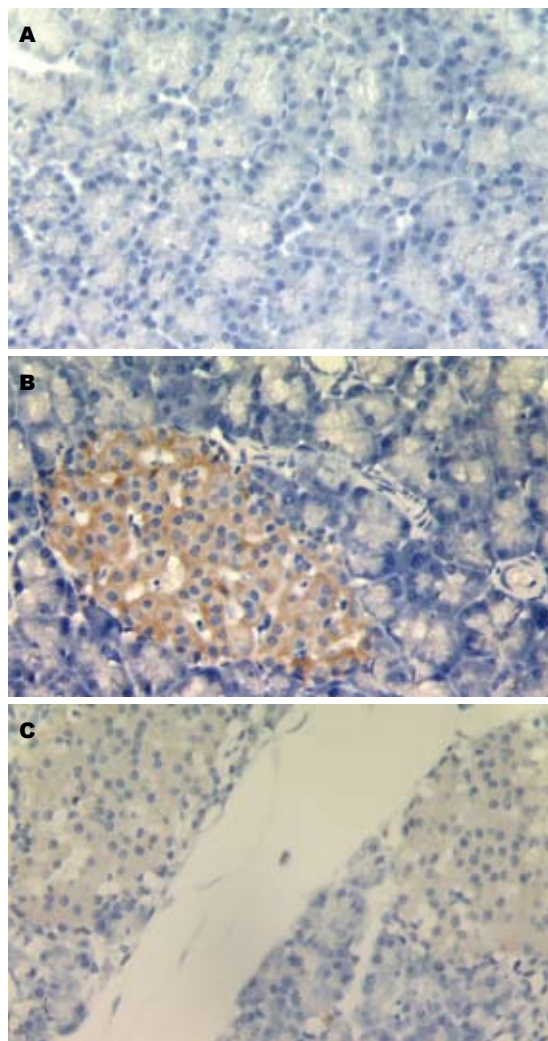


图2 STAT3在胰腺组织中的表达( $\times 400$ )。A: C组; B: A组第4小时; C: I组第36小时。

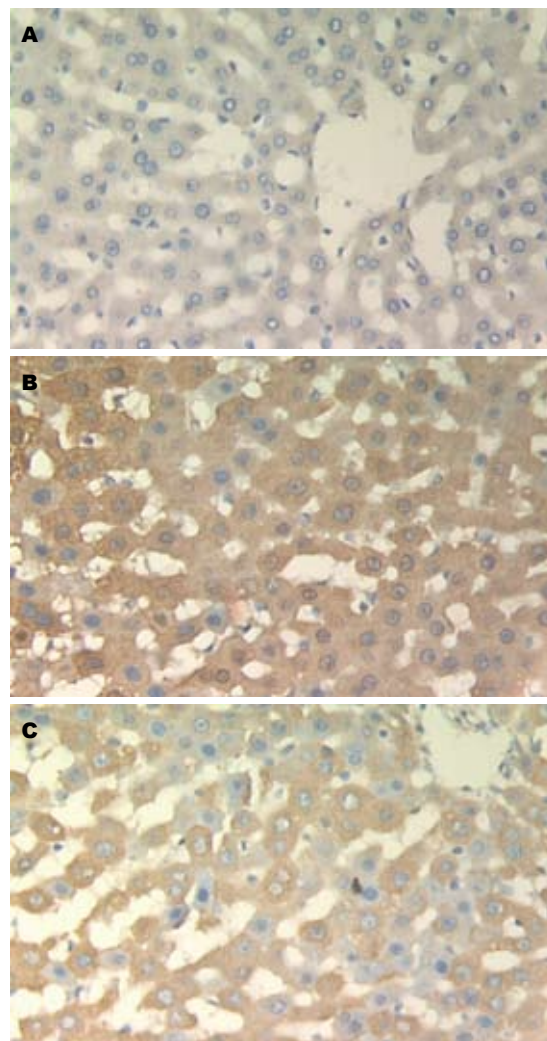


图3 STAT3在肝组织中的表达( $\times 400$ )。A: C组; B: A组第4小时; C: I组第36小时。

组STAT3表达高于C组,表达随时间延长而减少,表达高峰位于4 h, rhIL-10后干预的I组12、24、36 h时点STAT3表达比A组减少。

2.4 肝脏组织中STAT3表达 C组呈阴性表达。A组各时点均见阳性产物表达,主要在肝细胞胞质中表达,部分胞核有表达,呈深棕褐色颗粒,部分呈深棕黄色,组织边缘处阳性表达强于内部;I组表达部位似A组,着色介于前两组之间。A组各时点STAT3灰度值显著低于C组( $P < 0.01$ ),并随时间延长灰度值逐渐减少;说明A组肝组织STAT3表达高于比C组,从4 h开始高表达,随时间延长逐渐上升。I组各时点STAT3灰度值显著低于C组( $P < 0.01$ ),24、36 h的STAT3灰度值显著高于A组( $P < 0.01$ );提示I组肝组织STAT3从4 h开始表达,24、36 h表达低于A组(表2,图3)。

### 3 讨论

IL-10主要由Th2细胞分泌,具有很强的免疫抑

制及免疫调控作用,是目前研究较多的抗炎因子。IL-10可广泛抑制活化巨噬/单核细胞的功能,抑制产生IL-1、TNF等细胞因子,减少这两种细胞因子通过诱导次级介质来扩大炎症反应。也可抑制活化的单核细胞产生趋化因子,并增强促炎细胞因子天然拮抗物的表达<sup>[8]</sup>。IL-10抗炎作用的信号转导系统与JAK/STAT系统、核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)有关,其作用机制与激活JAK-STAT3-SOCS3途径、增强靶分子mRNA不稳定性而促进其降解有关<sup>[9]</sup>。已经有动物实验和临床前期研究表明IL-10在诊断和治疗AP中具有重要的临床价值<sup>[10]</sup>,内源性IL-10和外源性IL-10均被认为对AP有保护作用<sup>[11,12]</sup>。本课题组既往研究结果提示,外源性IL-10后干预可减轻ANP胰腺组织的病理损伤,其机制可能与减少NF- $\kappa$ B的活化、减少促炎细胞因子释放有关<sup>[13]</sup>。Feng等<sup>[14]</sup>在进行药物性肝损伤的研究中发现,敲除IL-10基因的小鼠肝损伤更为严重,

表 2 大鼠胰腺、肝组织STAT3免疫组化图像灰度值 (mean ± SD)

分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
胰腺					
C组	6	207.05 ± 14.72	202.92 ± 3.35	202.23 ± 7.43	204.20 ± 10.16
A组	9	168.52 ± 11.72 <sup>b</sup>	146.10 ± 10.51 <sup>b</sup>	150.63 ± 9.11 <sup>b</sup>	155.55 ± 11.70 <sup>b</sup>
I组	8	170.19 ± 5.01 <sup>b</sup>	174.61 ± 6.25 <sup>bd</sup>	178.55 ± 10.36 <sup>bd</sup>	193.37 ± 21.54 <sup>bc</sup>
肝脏					
C组	6	200.70 ± 30.70	212.09 ± 51.97	191.77 ± 49.01	191.46 ± 65.49
A组	9	50.85 ± 6.40 <sup>b</sup>	47.36 ± 7.45 <sup>b</sup>	38.85 ± 10.27 <sup>b</sup>	23.51 ± 5.67 <sup>b</sup>
I组	8	51.46 ± 23.04 <sup>b</sup>	62.58 ± 22.22 <sup>b</sup>	89.88 ± 18.89 <sup>bd</sup>	48.79 ± 15.38 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs C组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs A组.

而且促炎细胞因子IL-8水平上升, 其机制可能与NF- $\kappa$ B、p38促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)途径激活有关, 同时发现STAT1、STAT3表达增高, 因此认为外源性IL-10对肝损伤有保护作用, 其作用机制可能与减少NF- $\kappa$ B、p38 MAPK、STAT相关途径的激活有关. 本实验提取大鼠胰腺、肝脏进行病理评分发现, A组胰腺、肝脏病理评分较C组高, 说明L-arginine大剂量腹腔注射诱导的大鼠ANP可同时发生肝脏病理损伤. rhIL-10后干预的I组胰腺病理评分较A组下降, 说明IL-10可减轻ANP胰腺损伤. 另外, 虽然rhIL-10干预后肝脏病理学评分各时点病理评分数据均较A组有所减少, 但统计学分析仅有24 h大鼠肝脏病理评分较A组低( $P < 0.05$ ), 因此本研究尚不足以说明rhIL-10后干预可使ANP大鼠的肝损伤减轻, 有待于通过增大样本量或延长观察时点观察rhIL-10干预是否对ANP肝脏病理损伤有保护作用.

STAT3是STAT家族的重要成员, 他可被JAK激酶通过酪氨酸磷酸化激活, STAT3是MPS中JAK1/STAT3抗炎症信号转导途径的最重要中间体, 在细胞因子诱导的细胞特异性应答反应中起关键作用, 参与细胞生长、恶性转化、凋亡等生理功能的调控<sup>[15]</sup>. 由于STAT3的活化过程与IL-10受体(IL-10R)有关, 因此STAT3被认为是IL-10反应中的一个关键调节物. STAT3的活化过程是: 在MPS中IL-10结合于IL-10R1的细胞外结构域, 形成同源或异源二聚体, 激活受体连接的JAK1, JAK1使位于IL-10R1链细胞内结构域特异的酪氨酸残基发生磷酸化. 一旦磷酸化, 这些酪氨酸残基为潜在的转录因子STAT3提供一个暂时锚靠位点. STAT3通过其SH2结构域结合于这些位点, STAT3分子上的酪氨酸依次被连接于受体的JAK1磷酸化. 活化的STAT3离开受体,

在胞质内形成同源或异源二聚体, 迅速转位入核, 与其特异的DNA序列结合, 启动细胞核内DNA转录, 开始抗炎症的级联反应<sup>[10,16]</sup>. Benkhart等<sup>[17]</sup>发现在人IL-10启动子区-120 bp处的序列特定地与STAT3连接, 而不与其他的STAT蛋白连接, 认为STAT3通过连接IL-10启动子上-120 bp处的motif而控制着人IL-10基因的表达. 因此, JAK1/STAT3通路可能与IL-10的抗炎作用密切相关. 这些基础研究的结论也得到相关研究结果支持. 如人类单核细胞受到酒精的刺激后, 可引起IL-10的释放增多和IL-10 mRNA表达上调, 作者认为其机制与STAT3活化有关<sup>[18]</sup>; Murray<sup>[19,20]</sup>研究表明, IL-10在应激的MPS中, 需要活化的STAT3参与, 最终抑制炎症介质产生; 肝损伤动物实验发现, 敲除IL-10基因可使STAT3表达增高<sup>[14]</sup>; 在心肌梗死后的左室重构研究中, Krishnamurthy等<sup>[21]</sup>发现IL-10可通过激活STAT3而抑制炎症反应. 本实验中胰腺组织A组STAT3表达4 h已显著高于C组, 高峰位于12 h, 随后24、36 h表达减少, 故推测STAT3可能早期即参与ANP胰腺组织的炎症反应; A组与I组STAT3表达在4 h无显著差异, 12、24、36 h可见I组的STAT3表达较A组降低, 提示rhIL-10可以下调STAT3在胰腺的表达, 推测rhIL-10可能是通过下调STAT3表达从而减轻在AP的胰腺损伤.

STAT3与肝损伤关系密切, 如在酒精肝动物实验中, 敲除STAT3基因的小鼠肝窦内皮细胞凋亡减少、炎症减轻<sup>[22]</sup>; CCl<sub>4</sub>致肝损伤的实验中, 也发现敲除STAT3基因后实验动物肝脏损伤的炎症反应减轻<sup>[23]</sup>; Horiguchi等<sup>[24]</sup>用肝细胞特异性敲除STAT3基因的小鼠(H-STAT3 KO mice)制备酒精性肝损伤模型, 发现H-STAT3 KO小鼠几乎无炎症反应, 同时促炎症因子低表达. 国内学者在动物实验中也发现抑制JAK2/STAT3信号转

#### 应用要点

本研究结果表明JAK/STAT信号转导途径与急性胰腺炎发病后的炎症反应有关, 抑制STAT3的表达可能为急性胰腺炎的治疗提供新途径.

### ■同行评价

本文选题较好, 方法可靠, 有一定的指导价值。

导通路可显著减轻大鼠肝移植缺血再灌注损伤, 同时减少细胞凋亡<sup>[25]</sup>。国内体外实验结果表明, 抑制JAK/STAT通路的活化可下调elastase诱导Kupffer细胞分泌促炎症因子IL-18的表达, 可能有助于减轻AP的炎症反应和肝损伤<sup>[26]</sup>。这些都说明抑制STAT3后, 肝细胞中的炎症反应可以得到改善。本实验中肝组织A组STAT3表达4 h已显著高于C组, 且随时间延长表达逐渐增多, 推测STAT3可能早期即参与ANP肝组织的炎症反应。rhIL-10后干预的I组大鼠肝组织STAT3表达水平于24、36 h比A组明显降低, 说明rhIL-10干预可以抑制STAT3表达, 可能rhIL-10通过下调STAT3发挥对ANP大鼠肝组织的保护作用。

总之, STAT3可能早期即参与ANP胰腺和肝脏组织的炎症反应, IL-10可能通过下调STAT3介导的炎症反应对胰腺、肝脏组织起保护作用, 通过调控JAK/STAT信号转导途径可能是减轻AP发病后炎症反应的新手段。

### 4 参考文献

- Halonon KI, Pettilä V, Leppäniemi AK, Kempainen EA, Puolakkainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2002; 30: 1274-1279
- 张晓华, 李兆申, 许国铭, 屠振兴. 急性胰腺炎肝脏损伤的表现及其发病机制的研究进展. *第二军医大学学报* 2003; 24: 1143-1145
- Lee C, Lim HK, Sakong J, Lee YS, Kim JR, Baek SH. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 production. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1041-1047
- Wang H, Brown J, Garcia CA, Tang Y, Benakanakere MR, Greenway T, Alard P, Kinane DF, Martin M. The role of glycogen synthase kinase 3 in regulating IFN- $\beta$ -mediated IL-10 production. *J Immunol* 2011; 186: 675-684
- 赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2233-2236
- Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-228; discussion 289
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55: 1265-1272
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771-5777
- 任大宾, 孙仁宇. 白介素-10的抗炎功能及其分子机制. *国外医学·呼吸系统分册* 2005; 25: 175-178
- 王刚, 孙备. 白介素10在急性胰腺炎中的应用现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 69-71
- Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, Rickaert F, Robberecht P, Devière J. Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice. *Gut* 1998; 43: 408-413
- Keceli M, Kucuk C, Sozuer E, Kerek M, Ince O, Arar M. The effect of interleukin-10 on acute pancreatitis induced by cerulein in a rat experimental model. *J Invest Surg* 2005; 18: 7-12
- 孙学成, 唐国都, 梁志海, 邓德海, 吴建胜. 重组人白细胞介素-10抑制急性坏死性胰腺炎中核因子- $\kappa$ B活化的实验研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 637-639
- Feng D, Wang Y, Xu Y, Luo Q, Lan B, Xu L. Interleukin 10 deficiency exacerbates halothane induced liver injury by increasing interleukin 8 expression and neutrophil infiltration. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 277-284
- Hoey T, Grusby MJ. STATs as mediators of cytokine-induced responses. *Adv Immunol* 1999; 71: 145-162
- Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 379-386
- Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165: 1612-1617
- Norkina O, Dolganiuc A, Shapiro T, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinases to promote IL-10 production in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 752-762
- Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated anti-inflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8686-8691
- Murray PJ. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1028-1031
- Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res* 2009; 104: e9-e18
- Miller AM, Wang H, Park O, Horiguchi N, Lafdil F, Mukhopadhyay P, Moh A, Fu XY, Kunos G, Pacher P, Gao B. Anti-inflammatory and anti-apoptotic roles of endothelial cell STAT3 in alcoholic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: 719-725
- Horiguchi N, Lafdil F, Miller AM, Park O, Wang H, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Fu XY, Pacher P, Gao B. Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. *Hepatology* 2010; 51: 1724-1734
- Horiguchi N, Wang L, Mukhopadhyay P, Park O, Jeong WI, Lafdil F, Osei-Hyiaman D, Moh A, Fu XY, Pacher P, Kunos G, Gao B. Cell type-dependent pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. *Gastroenterology* 2008; 134: 1148-1158
- 蓝柳根, 彭民浩, 卢景宁, 陈滨. FK409对大鼠肝脏移植缺血再灌注损伤后JAK2/STAT3信号通路的影响. *中国现代医学杂志* 2009; 19: 390-394
- 李敏利, 朱人敏, 张晓华, 史薇, 杨妙芳, 季洪赞, 郭婧芸. JAK/STAT信号通路在胰弹性蛋白酶诱导大鼠Kupffer细胞分泌IL-18中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 877-881

编辑 李薇 电编 何基才

# 人宫颈癌基因RNA干扰真核表达载体的构建及其稳定转染胰腺癌细胞株的建立

张盛, 朱亚青, 张国新, 蒋佳凯

张盛, 朱亚青, 蒋佳凯, 常州市第三人民医院肝胆外科 江苏省常州市 213000

张国新, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

张盛, 主治医师, 主要从事肝胆胰相关外科方面的研究。

常州市社会发展科技计划基金资助项目, No. CS20102014

作者贡献分布: 此课题由张国新与蒋佳凯设计; 研究过程由张盛与蒋佳凯操作完成; 本论文写作由张盛、朱亚青及蒋佳凯完成。

通讯作者: 蒋佳凯, 213000, 江苏省常州市, 常州市第三人民医院肝胆外科, jackjiang78@sina.com

收稿日期: 2011-02-16 修回日期: 2011-04-25

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Construction of eukaryotic expression vectors expressing siRNAs targeting the HCCR2 gene and their transfection into PANC1 cells

Sheng Zhang, Ya-Qing Zhu, Guo-Xin Zhang, Jia-Kai Jiang

Sheng Zhang, Ya-Qing Zhu, Jia-Kai Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

Guo-Xin Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development and Science & Technology Fund of Changzhou, No. CS20102014

Correspondence to: Jia-Kai Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. jackjiang78@sina.com

Received: 2011-02-16 Revised: 2011-04-25

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To construct eukaryotic expression vectors expressing small interfering RNAs (siRNAs) targeting the human cervical cancer oncogene 2 (HCCR2) gene and transfect them into human pancreatic cancer cell line PANC1 to obtain a cell line stably transfected with the HCCR2 siRNA plasmid.

**METHODS:** Multiple siRNAs targeting the HCCR2 gene were designed, chemically synthesized, and cloned into the eukaryotic expression vector pGCsi-H1/Hygro/NEGative. The

resulting recombinant vectors were identified by direct sequencing. After the recombinant pGCsi-HCCR plasmids were co-transfected with an HCCR eukaryotic expression vector into 293T cells, the protein expression of HCCR-2 was analyzed by Western blotting to identify the pGCsi-HCCR vector that had the highest gene knockdown efficiency. This recombinant vector was then transfected into PANC1 cells with Lipofectamine™ 2000. G418-resistant clones were selected to obtain a stably transfected cell line. The expression of HCCR2 protein in stably transfected cell line was detected by Western blot.

**RESULTS:** The pGCsi-HCCR-3 plasmid had the highest gene knockdown efficiency and was used to transfect PANC1 cells. Western blotting analysis demonstrated that HCCR2 expression was significantly inhibited in PANC-1 cells stably transfected with the pGCsi-HCCR-3 plasmid compared to cells transfected with the empty vector.

**CONCLUSION:** Eukaryotic expression vectors expressing siRNAs targeting the HCCR2 gene were successfully constructed and a PANC-1 cell line stably transfected with the pGCsi-HCCR-3 plasmid was successfully established.

**Key Words:** RNA interference; Human cervical cancer oncogene; PANC1 cells; Stable transfection

Zhang S, Zhu YQ, Zhang GX, Jiang JK. Construction of eukaryotic expression vectors expressing siRNAs targeting the HCCR2 gene and their transfection into PANC1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1463-1468

## 摘要

**目的:** 构建针对人宫颈癌基因2(HCCR2)有效靶点的RNA干扰真核表达载体, 鉴定获得干扰质粒稳定转染的人胰腺癌PANC1细胞株。

**方法:** 设计并合成多个针对HCCR2基因的RNA干扰序列, 并将其插入真核表达慢病毒

## ■背景资料

人宫颈癌基因(HCCR)因最先在宫颈癌中发现而得名, 国外研究发现HCCR在乳腺癌、肝癌和子宫癌等多种肿瘤中均有过度表达, 在早期肿瘤的表达更明显, 提示HCCR与人类多种恶性肿瘤的早期发生有关。

## ■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

## ■ 研究前沿

近年来, HCCR与多种肿瘤的关系日益引起人们的关注。目前对胰腺癌治疗的研究则倾向于分子靶向治疗和相关信号转导通路的深入研究。

载体pGCsi-H1/Hygro/NEGative, 通过测序和与HCCR过表达载体共转染293T细胞后行Western blot检测, 筛选出有效干扰质粒; 通过脂质体转染法将该有效干扰质粒pGCsi-HCCR2稳定转染至人胰腺癌细胞株PANC1。抗生素G418筛选获得稳转细胞株; Western blot检测稳转细胞株中HCCR2蛋白表达水平。

**结果:** HCCR2干扰载体和过表达载体共转染293T细胞后Western blot检测结果表明干扰质粒3具有最佳干扰效果, 选其作为最终干扰质粒。将该质粒稳定转染至胰腺癌PANC1细胞后, Western blot检测显示, 干扰组的PANC1细胞株与空载体组比较, HCCR2蛋白表达水平下调, 表明获得HCCR2的RNA干扰质粒稳定转染的PANC1细胞株。

**结论:** 成功构建了HCCR2的RNA干扰真核表达载体及其稳定转染的人胰腺癌PANC1细胞株。

**关键词:** RNA干扰; 人宫颈癌基因; PANC1细胞; 稳定转染

张盛, 朱亚青, 张国新, 蒋佳凯. 人宫颈癌基因RNA干扰真核表达载体的构建及其稳定转染胰腺癌细胞株的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1463-1468

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1463.asp>

## 0 引言

人宫颈癌基因(human cervical cancer oncogene, HCCR)因最先在人宫颈癌组织中发现而得名。研究发现, HCCR在多种肿瘤如宫颈癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胃癌、结肠癌<sup>[1]</sup>等中均有过度表达。由于其前体mRNA选择性拼接加工结果不同, HCCR可分为HCCR1和HCCR2两种亚型。细胞克隆形成及裸鼠成瘤实验结果提示HCCR2比HCCR1有更强的致癌性<sup>[1]</sup>。我们之前曾构建组织芯片研究了HCCR和胰腺癌的关系, 结果发现胰腺癌组织和细胞中HCCR均有明显过度表达<sup>[2]</sup>。因此, 本研究采用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术, 设计了针对HCCR2 mRNA的干扰序列, 并与真核表达载体pGCsi-H1/Hygro/NEGative重组构建质粒, 经过鉴定后将该真核表达质粒转染人胰腺癌PANC1细胞, 筛选获得了稳定转染细胞株, 以进一步研究HCCR和胰腺癌之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HCCR siRNA引物由上海生工生物工程有限公司合成; 人胰腺癌细胞系PANC1购自中国科

学院上海细胞所; 293T细胞由上海吉凯公司提供; HCCR过表达载体和siRNA干扰慢病毒载体由上海吉凯公司构建, 测序及进行有效靶点筛选。脂质体细胞转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; 鼠抗人HCCR单抗由本实验室制备; HRP标记的羊抗鼠二抗、HRP标记的羊抗兔二抗购自晶美公司; G418购自美国Sigma公司; BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光试剂盒购自Pierce公司; 蛋白预染Marker、DNA Marker购自Fermentas公司; 其余试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 293T细胞干扰质粒筛靶实验分组: (1)293T细胞+OV组: 仅有293T细胞, 转染时不加入慢病毒质粒, 仅有HCCR过表达质粒; (2)NC+OV组1, 2: 转染时加入不含干扰靶点的空质粒和HCCR过表达质粒; (3)RNAi+OV组1, 2, 3: 转染时加入构建好的干扰质粒和HCCR过表达质粒。用最佳效果的干扰质粒稳定转染PANC1细胞后, 所得细胞株的进行Western blot鉴定实验分组: (1)RNAi Clone1, 2: 干扰质粒稳转PANC1细胞株; (2)Vector Clone1, 2: 空载体质粒稳转PANC1细胞株。

**1.2.2 HCCR siRNA真核表达质粒构建及有效靶点筛选:** 利用GenBank中HCCR cDNA序列和siRNA设计软件设计出干扰序列, 靶向cDNA前后序列分别为: SR54-3F: TGCTGAATCACATC-GGAATGCTCATTGTTTTGGCCACTGACT-GACAATGAGCACCGATGTGATT; SR54-3R: CCTGAATCACATCGGTGCTCATTGTGTCAGT-CAGTGGCCAAAACAATGAGCATTCCGATGTGATTC。将干扰序列与双酶切后的真核表达慢病毒载体pGCsi-H1/Hygro/NEGative在连接酶作用下进行连接, 连接产物转化细菌感受态细胞, 对长出的克隆提取质粒, 进行测序和分析比对, 比对正确的即为构建成功的HCCR2 siRNA表达质粒载体。将针对靶基因不同干扰靶点的siRNA表达质粒载体和HCCR2的过表达质粒pEGFP-HCCR2(前期已构建成功), 分别共转染培养好的工具细胞(即293T细胞), 转染24 h荧光显微镜下观测转染效果, 转染36-48 h收集细胞抽提蛋白, 采用Western blot检测目的蛋白的表达情况, 进而判断不同靶点的干扰效果, 获得有效靶点。

**1.2.3 细胞培养与稳定转染:** 转染前24 h取对数生长期PANC1细胞 $2.5 \times 10^5$ 个接种于35 mm培养皿中, 置于不含有抗生素的含有100 mL/L新

生牛血清的DMEM培养液中培养, 次日观察细胞生长至80%融合时开始转染. 取转染质粒2  $\mu\text{g}$  稀释于无抗生素的DMEM 125  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  脂质体Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000稀释于DMEM 125  $\mu\text{L}$ , 室温孵育20 min后两者混匀加入培养皿, 置于37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱, 6 h后更换新鲜的含100 mL/L新生牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养液, 其后每2 d换液. 细胞转染后24 h按1:9的比例传代, 48 h后开始用含500 mg/L G418的选择性培养液进行筛选, 2-3 wk以后克隆形成. 以克隆环挑取细胞克隆转移至6孔板扩大培养、传代, 最后转入60 mL培养瓶, 阳性克隆在荧光显微镜下可见绿色荧光表达.

**1.2.4 Western blot检测HCCR蛋白及其相关基因的表达:** 收集各组细胞, 冰PBS洗2次, 加入细胞裂解液适量裂解细胞, 用细胞刮尽可能收集全部细胞裂解液放置于1.5 mL离心管, 超声细胞破碎仪破碎细胞并离心, BCA标准蛋白制备标准曲线, 根据标准曲线求得各待测样品的蛋白浓度, 从而计算上样体积. 检测不同蛋白选择适当的总蛋白上样量(20-60  $\mu\text{g}$ ), 行稳流(电流40 mA)SDS-PAGE电泳, 稳压(电压100 mV)冰浴电转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h后TBST漂洗5 min, 加入一抗(工作浓度: HCCR 1:400)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜. 次日TBST漂洗3 $\times$ 5 min后再加HRP标记的二抗(工作浓度分别为羊抗鼠1:4000; 羊抗鼠1:2000)室温孵育1 h, TBST漂洗3 $\times$ 5 min. ECL化学发光法曝光、显影, 同法处理内参照. 实验均重复3次.

## 2 结果

**2.1 HCCR siRNA真核表达质粒构建及鉴定** 经上海生工生物工程公司测序鉴定, 重组获得的3个干扰真核表达质粒与预期完全相同. 将这3个干扰载体分别与HCCR2真核表达载体共转染293T细胞, 24 h后荧光显微镜下观察其转染情况(图1). 干扰载体具有的GFP表达元件能够表达绿色荧光. 绿色荧光显示, 转染效率达到70%以上. 转染后36-48 h收集细胞, 抽提总蛋白进行Western blot检测HCCR蛋白表达(图2). 干扰质粒3具有最好的敲减效果, 后续试验选取该质粒作为干扰质粒.

**2.2 RNA干扰质粒稳定转染的PANC1细胞株的鉴定** 将获取的有效干扰靶点质粒和空载体质粒分别转染胰腺癌PANC1细胞, 抗生素筛选并挑取后的阳性克隆在荧光显微镜下可见绿色荧光

表达(图3). RNAi Clone组和Vector Clone组阳性克隆细胞经Western blot多次检测, 获得HCCR2蛋白表达明显低于对照组的RNA干扰稳定转染细胞(图4).

## 3 讨论

胰腺癌是恶性程度较高的肿瘤之一, 其发病率在国内外均呈上升趋势. 胰腺癌预后极差, 5年生存率不足5%<sup>[3-5]</sup>. 由于胰腺癌早期症状隐匿, 加上胰腺位于腹腔深部, 影像检测准确率不高, 使得胰腺癌的早期诊断存在一定的困难. 目前CA19-9是诊断胰腺癌较常用的血清标志物, 其敏感性和特异性不高, 仅为68%和76%, 对早期胰腺癌敏感性更低<sup>[6,7]</sup>. 寻找胰腺癌新的早期诊断标志物和有效治疗靶点对于指导临床治疗, 提高胰腺癌患者的生存具有重要意义. 目前对胰腺癌的治疗的研究则倾向于分子靶向治疗和相关信号转导通路的深入研究<sup>[8]</sup>.

近年来, HCCR与多种肿瘤的关系日益引起人们的关注. HCCR是2003年Ko等用差异显示RT-PCR的方法从宫颈癌组织及宫颈癌细胞株中筛选出的差异表达癌基因<sup>[1,9]</sup>, 定位于人染色体12q. 由于其前体mRNA选择性拼接加工结果不同, 其分为HCCR-1和HCCR-2两种亚型. HCCR在白血病、肝癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤中均可见过量表达, 这提示HCCR在人的恶性肿瘤发生发展中具有重要作用<sup>[9,10]</sup>. Kim等用间接ELISA法来检测血清HCCR的水平, 发现血清HCCR浓度在肝癌患者显著高于肝硬化、非酒精性脂肪肝、慢性活动性肝炎等患者. 检测570例血清样本中HCCR蛋白水平, 发现对肝癌的特异性为95.7%, 敏感性为78.2%, 而AFP的敏感性仅为64.6%. 说明HCCR作为肝癌诊断标志物优于AFP, 尤其是在诊断早期肝癌及小肝癌方面, HCCR阳性率较高<sup>[11]</sup>. 作为检测指标, HCCR对乳腺癌的敏感性为86.8%, 比糖类抗原CA15-3高21%. 因而认为在早期检测诊断乳腺癌时, HCCR远较CA15-3优越<sup>[12]</sup>. 研究表明, NIH/3T3细胞转染HCCR基因后, 细胞发生恶性转型, 并在软琼脂上形成了更多的克隆, 并分化成上皮细胞癌<sup>[1,13]</sup>; HCCR转基因鼠可自发形成乳腺癌, 并伴有转移灶形成; 表明HCCR与肿瘤的发生相关<sup>[14]</sup>. *p53*是重要的肿瘤抑制基因<sup>[15-17]</sup>, 转染HCCR基因的细胞内P53的稳定性增加, 但与P53相关的基因*p21*、*bax*等基因的表达下调; 表明HCCR可能通过失活P53来促进肿瘤发生、发

### ■ 相关报道

Kim等用间接ELISA法来检测血清HCCR的水平, 发现血清HCCR浓度在肝癌患者显著高于肝硬化、非酒精性脂肪肝、慢性活动性肝炎等患者.

### ■创新盘点

目前尚未有HCCR与胰腺癌的深入研究,本研究首次运用RNA干扰技术来研究HCCR和胰腺癌的关系,探求其作为胰腺癌诊断标记物和基因治疗靶点的可行性,为研究、开发RNA干扰药物提供理论依据.

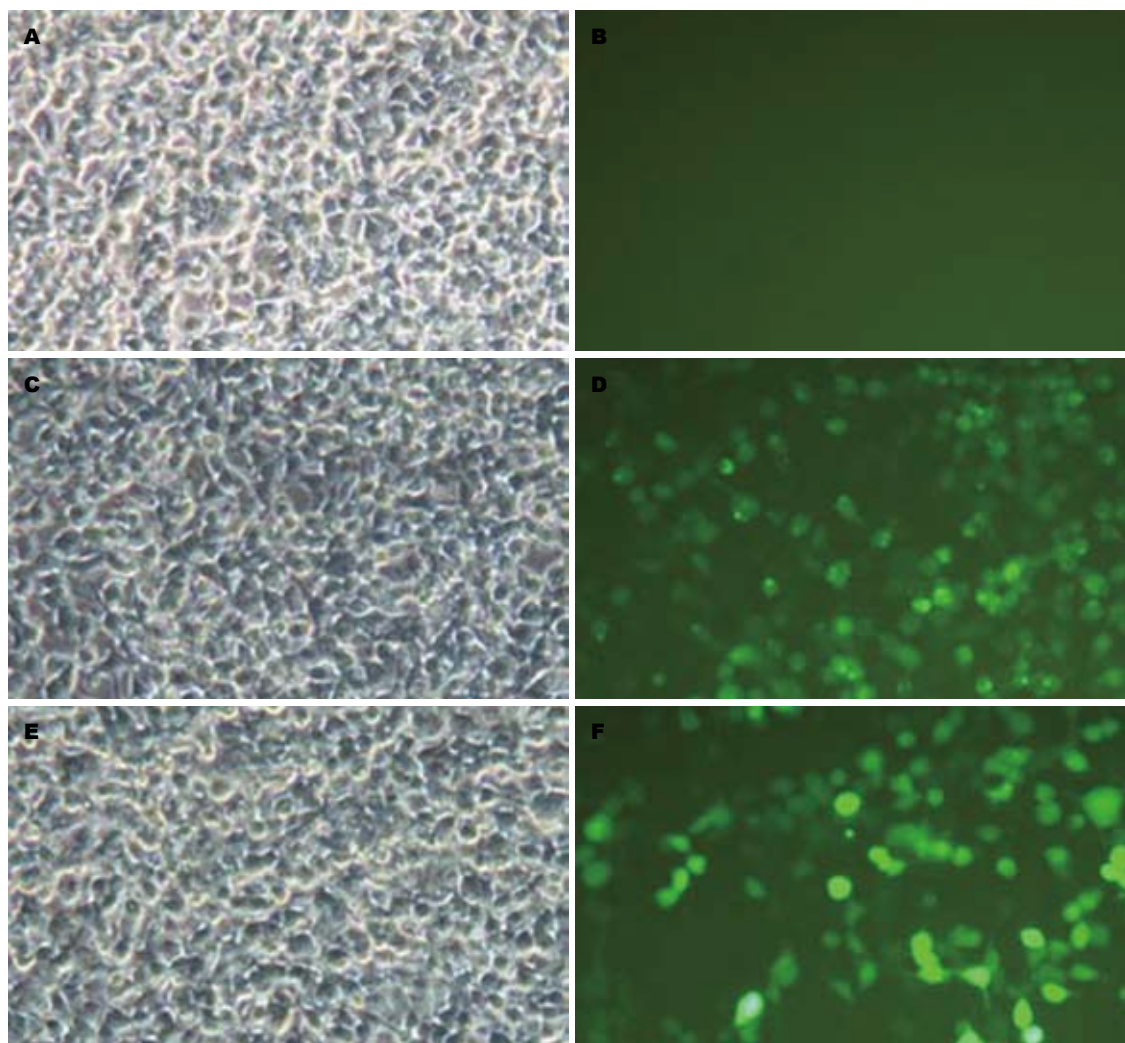


图1 构建的干扰质粒和HCCR真核表达质粒共转染293T细胞,常规显微镜和荧光显微镜观察转染情况( $\times 200$ ). A, B: 293T+OV组; C, D: NC+OV组; E, F: RNAi+OV组; A, C, E: 白光; B, D, F: 绿色荧光.

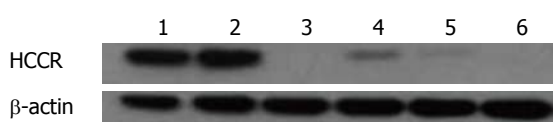


图2 Western blot检测3个干扰质粒和HCCR2真核表达质粒共转染293T细胞. 1: NC1+OV组; 2: NC2+OV组; 3: 293T+OV组; 4: RNAi1+OV组; 5: RNAi2+OV组; 6: RNAi3+OV组.  $\beta$ -actin: 内参.

展<sup>[1]</sup>. PI3K/Akt信号通路是人类肿瘤发生过程中一条重要调控通路,参与调节细胞周期和调控细胞凋亡等,同样研究发现HCCR的表达可能受其调控<sup>[18]</sup>. HCCR通过减少乳腺癌细胞中载脂蛋白E(apoE)的分泌来抑制apoE的抗增殖功能<sup>[19]</sup>.

本研究小组成员曾构建了HCCR蛋白表达载体,制备出HCCR单克隆抗体,并研究了其在肝癌及胃癌中的表达及意义<sup>[20-22]</sup>. 目前尚未有HCCR与胰腺癌之间的相关性研究,因此,为了探明HCCR与胰腺癌之间是否相关,前期我

们构建了组织芯片,高通量检测了胰腺癌组织及癌旁正常胰腺组织的HCCR表达. 结果显示,胰腺癌组织中HCCR蛋白阳性表达率高达77.5%(138/178),明显高于其在癌旁组织及良性肿瘤组织中的表达48.9%(23/47),且与病理组织学分级相关,Western blot结果发现三株胰腺癌细胞PANC1、SW1990、CFPAC1中HCCR蛋白均呈过量表达. 由此说明HCCR编码蛋白与胰腺癌关系密切<sup>[2]</sup>.

RNAi现象,即真核细胞中存在的非编码siRNA片段通过与mRNA按照碱基配对原则结合来调控目的基因的表达. 两位美国科学家安德鲁·菲尔和克雷格·梅洛因该发现而获得2006年诺贝尔医学奖. RNAi目前是研究基因功能和治疗疾病的强有力工具<sup>[23]</sup>,在肿瘤的基因功能研究中已得到广泛应用<sup>[24,25]</sup>. 有文献报道,瞬时转染HCCR siRNA质粒到肝癌细胞株HepG2中,发现细胞增殖受到抑制,细胞凋亡增加<sup>[26]</sup>. 本

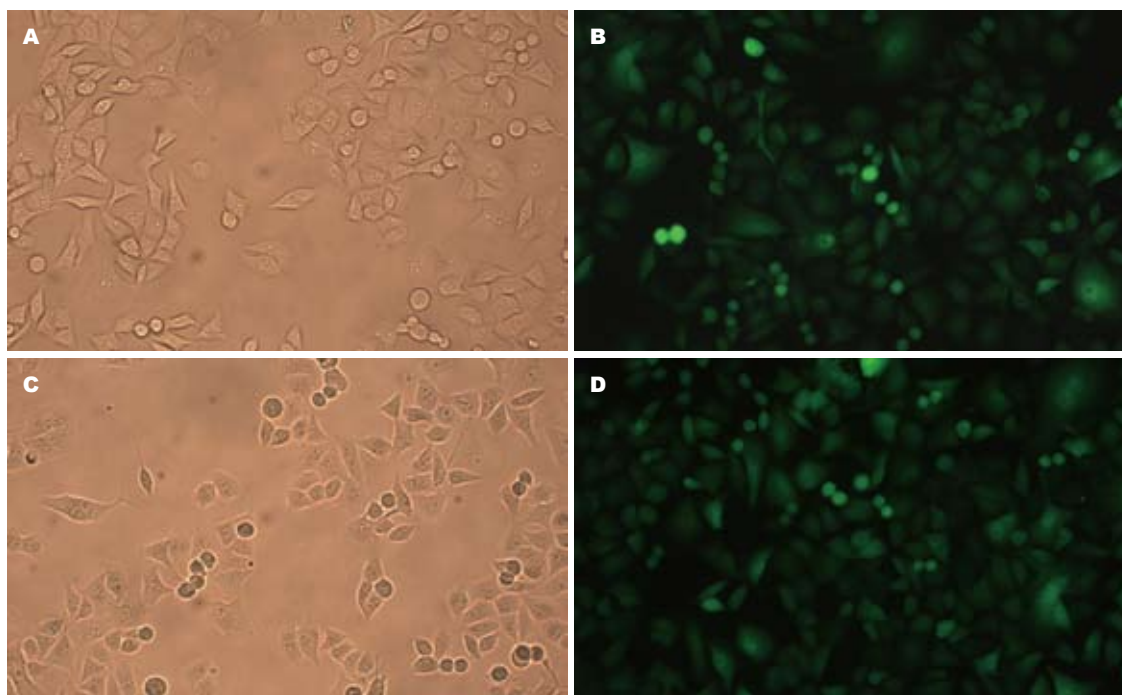


图3 RNAi Clone组和Vector Clone组的稳定转染PANC1细胞的阳性克隆在常规显微镜(白光)和荧光显微镜(显示绿色荧光)下所见( $\times 200$ )。A, B: RNAi Clone; C, D: Vector Clone; A, C: 白光; B, D: 绿色荧光。

■同行评价  
本文设计科学、合理,方法先进,结果可信,为今后进一步研究HCCR与胰腺癌的关系奠定了实验基础。

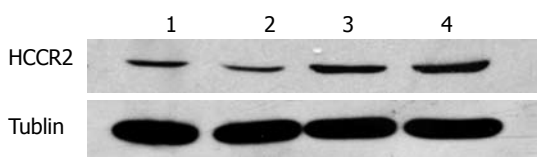


图4 Western blot检测干扰质粒稳转PANC1细胞和载体质粒稳转PANC1细胞中HCCR2的表达。1: RNAi Clone1; 2: RNAi Clone2; 3: Vector Clone1; 4: Vector Clone2。Tublin: 内参。

HCCR蛋白水平的表达情况。经过Western blot反复鉴定挑选出的数十株稳定转染单克隆细胞株,检测HCCR蛋白表达情况,确定其敲减效果,最终获得持续效果较佳的稳定表达RNA干扰效果的胰腺癌细胞株两株,为进一步探讨HCCR与胰腺癌的关系,进行相关生物学实验和信号通路研究打下实验基础,观察其能否作为胰腺癌诊治的靶点。

实验中RNA干扰真核表达载体pGCsi-H1/Hygro/NEGative为慢病毒载体,具有高效的质粒重组性能和转染效率<sup>[27]</sup>。293T细胞是转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系,具有较高的转染效率,蛋白表达水平高,是重要的用于转染的工具细胞<sup>[27,28]</sup>。获得的3个重组干扰质粒与HCCR真核过表达载体共转染293T细胞,通过绿色荧光观察到具有较高的转染效率,Western blot检测HCCR蛋白在293T细胞中的表达,从而保证获得最佳筛选靶点。

与瞬时转染不同,稳定转染获得的干扰细胞株生物学特性相对稳定,实验结果更真实可信,且能够为进一步实验打下更好的基础。本实验通过稳定转染来获得RNA干扰的PANC1细胞株,无论干扰组还是空载体组,经抗生素G418筛选并挑取后的阳性干扰细胞克隆在荧光显微镜下可见绿色荧光表达,表明慢病毒载体已成功转染进细胞株。但最终干扰效果,还是取决于

#### 4 参考文献

- 1 Ko J, Lee YH, Hwang SY, Lee YS, Shin SM, Hwang JH, Kim J, Kim YW, Jang SW, Ryoo ZY, Kim IK, Namkoong SE, Kim JW. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. *Oncogene* 2003; 22: 4679-4689
- 2 张翼, 徐泽宽, 张国新. 组织芯片检测人宫颈癌癌基因和存活素在胰腺癌中的表达及临床意义. *中华消化杂志* 2008; 28: 129-130
- 3 Cleary SP, Gryfe R, Guindi M, Greig P, Smith L, Mackenzie R, Strasberg S, Hanna S, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Prognostic factors in resected pancreatic adenocarcinoma: analysis of actual 5-year survivors. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 722-731
- 4 Pliarchopoulou K, Pectasides D. Pancreatic cancer: current and future treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 431-436
- 5 Hines OJ, Reber HA. Pancreatic neoplasms. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 452-458
- 6 Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD, Goel R,

- Mathivanan S, Marimuthu A, Kashyap M, Vizza RF, Mayer RJ, Decaprio JA, Srivastava S, Hanash SM, Hruban RH, Pandey A. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med* 2009; 6: e1000046
- 7 Fry LC, Mönkemüller K, Malfertheiner P. Molecular markers of pancreatic cancer: development and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 883-890
- 8 Furukawa T. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer: current knowledge and perspectives from bench to bedside. *J Gastroenterol* 2008; 43: 905-911
- 9 Chung YJ, Kim JW. Novel oncogene HCCR: its diagnostic and therapeutic implications for cancer. *Histol Histopathol* 2005; 20: 999-1003
- 10 Shin SM, Chung YJ, Oh ST, Jeon HM, Hwang LJ, Namkoong H, Kim HK, Cho GW, Hur SY, Kim TE, Lee YS, Park YG, Ko J, Kim JW. HCCR-1-interacting molecule & quot; deleted in polyposis 1 & quot; plays a tumor-suppressor role in colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 2074-2086
- 11 Yoon SK, Lim NK, Ha SA, Park YG, Choi JY, Chung KW, Sun HS, Choi MJ, Chung J, Wands JR, Kim JW. The human cervical cancer oncogene protein is a biomarker for human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 5434-5441
- 12 Jung SS, Park HS, Lee IJ, Namkoong H, Shin SM, Cho GW, Ha SA, Park YG, Lee YS, Ko J, Kim JW. The HCCR oncoprotein as a biomarker for human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7700-7708
- 13 Ha SA, Shin SM, Lee YJ, Kim S, Kim HK, Namkoong H, Lee H, Lee YS, Cho YS, Park YG, Jeon HM, Oh C, Kim JW. HCCRB-1 directly interacting with HCCR-1 induces tumorigenesis through P53 stabilization. *Int J Cancer* 2008; 122: 501-508
- 14 Ko J, Shin SM, Oh YM, Lee YS, Ryoo ZY, Lee YH, Na DS, Kim JW. Transgenic mouse model for breast cancer: induction of breast cancer in novel oncogene HCCR-2 transgenic mice. *Oncogene* 2004; 23: 1950-1953
- 15 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310
- 16 Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; 26: 2157-2165
- 17 Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pêtré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 1-12
- 18 Cho GW, Shin SM, Namkoong H, Kim HK, Ha SA, Hur SY, Kim TE, Chai YG, Kim JW. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates the HCCR-1 oncogene expression. *Gene* 2006; 384: 18-26
- 19 Ha SA, Shin SM, Kim HK, Kim S, Namkoong H, Lee YS, Kim HJ, Jung SM, Lee YS, Chung YJ, Park YG, Jung SS, Kim JW. Dual action of apolipoprotein E-interacting HCCR-1 oncoprotein and its implication for breast cancer and obesity. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 3868-3875
- 20 林艳, 杨杨, 张国新, 刘兵团, 郝波, 黄祖瑚. 人HCCR蛋白表达载体的构建、表达及其蛋白纯化. *南京医科大学学报* 2006; 26: 757-760
- 21 杨杨, 张国新, 施瑞华, 林艳, 郝波, 王晓勇, 王宏娣, 黄祖瑚. 人宫颈癌基因蛋白在人肝细胞癌中的表达及其临床意义. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 223-224
- 22 王晓勇, 张国新, 施瑞华, 林艳, 郝波, 杨杨, 王宏娣, 黄祖瑚. 人宫颈癌基因蛋白多抗的制备及其在胃癌中的表达和意义. *中华消化杂志* 2007; 27: 568-569
- 23 Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 2009; 457: 396-404
- 24 金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波. RNA干扰HIF-1 $\alpha$ 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2762-2766
- 25 葛金华, 朱月永, 刘豫瑞, 江家骥, 董菁. siRNA降低COX-2基因表达对肝癌细胞系HepG2增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2244-2250
- 26 杨燕, 周学峰, 刘安定. 人宫颈癌基因小干扰RNA抑制HepG2细胞生长的作用及其机制. *中华肝脏病杂志* 2008; 16: 612-615
- 27 钱倩, 王晓通, 谢玉波, 李雷, 肖强. Cd $\times$ 2基因RNA干扰慢病毒载体的构建与鉴定. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 245-249
- 28 Gavrilescu LC, Van Etten RA. Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells. *J Vis Exp* 2007: 550

编辑 李薇 电编 何基才

# 新疆蜂胶挥发油对结直肠癌HCT-116细胞增生、周期及凋亡的影响

阿布力克木·吾甫尔, 依米提·热合曼, 吐尔逊娜依·阿布都热依木, 阿尔孜古丽·吐尔逊, 木塔力甫·艾买提

阿布力克木·吾甫尔, 依米提·热合曼, 木塔力甫·艾买提, 新疆大学生命科学与技术学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830046

吐尔逊娜依·阿布都热依木, 新疆乌鲁木齐市友谊医院疼痛科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830049

阿尔孜古丽·吐尔逊, 新疆医科大学第一附属医院医学研究中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

阿布力克木·吾甫尔, 硕士研究生, 主要从事蜂胶挥发油成分分析及其抗肿瘤作用的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30860072

新疆大学博士启动基金资助项目, No. 070270

作者贡献分布: 此课题由阿布力克木·吾甫尔与依米提·热合曼设计; 研究过程由阿布力克木·吾甫尔操作完成; 本论文写作由阿布力克木·吾甫尔完成; 由吐尔逊娜依·阿布都热依木编写; 研究所用的某些试剂由吐尔逊娜依·阿布都热依木提供; 实验操作技术由阿尔孜古丽·吐尔逊带教; 由阿布力克木·吾甫尔、依米提·热合曼及木塔力甫·艾买提完成数据分析。

通讯作者: 依米提·热合曼, 副教授, 博士, 硕士生导师, 830046, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市天山区胜利路14号, 新疆大学生命科学与技术学院生物工程系, yimitrahman@gmail.com

收稿日期: 2011-01-25 修回日期: 2011-04-18

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-05-18

## Effect of essential oils extracted from Xinjiang propolis on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HCT-116

Ablikim·Ghupur, Yimit·Rahman, Tursunay·Abdureyim, Aertziguli·Tuerxun, Mutallip·Amet

Ablikim·Ghupur, Yimit·Rahman, Mutallip·Amet, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Tursunay·Abdureyim, Department of Pain Management, Urumqi Friendship Hospital, Urumqi 830049, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Aertziguli·Tuerxun, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30860072; and the Doctoral Startup Foundation of Xinjiang University, No. 070270

Correspondence to: Associate Professor Yimit·Rahman, College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, 14 Shengli Road, Tianshan District, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. yimitrahman@gmail.com

Received: 2011-01-25 Revised: 2011-04-18

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To study the effect of essential oils extract-

ed from Xinjiang propolis on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HCT-116.

**METHODS:** After HCT-116 cells were treated with different concentrations of essential oils for different durations, cell growth was evaluated by MTT assay; cell cycle progression was analyzed by flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) staining; apoptosis was detected by FCM with annexin V-FITC/PI double labeling.

**RESULTS:** Treatment with essential oils inhibited the growth of HCT-116 cells. FCM analysis showed that treatment with 5.0, 10, and 20 mg/L of essential oils for 24 h increased the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase (57.57 ± 2.31, 67.94 ± 1.90, 86.09 ± 1.72 vs 44.60 ± 3.43, all *P* < 0.01), decreased the proportion of cells in S phase (33.51 ± 3.40, 27.30 ± 4.65, 7.30 ± 4.76 vs 47.78 ± 4.54, all *P* < 0.01), and increased the apoptosis rate (58.33% ± 2.44%, 44.53% ± 2.59%, 35.40% ± 0.42% vs 4.38% ± 0.92%, all *P* < 0.01), suggesting a dose-dependent effect.

**CONCLUSION:** Essential oils inhibited the proliferation of human colorectal cancer HCT-116 cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis.

**Key Words:** Propolis; Essential oils; HCT-116 cells; MTT assay; Cell cycle; Apoptosis

Ablikim·Ghupur, Yimit·Rahman, Tursunay·Abdureyim, Aertziguli·Tuerxun, Mutallip·Amet. Effect of essential oils extracted from Xinjiang propolis on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HCT-116. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1469-1475

## 摘要

**目的:** 探讨新疆蜂胶挥发油对体外培养的大肠癌细胞HCT-116细胞增生、细胞周期和凋亡的影响。

**方法:** 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)显色法, 检测不同浓度蜂胶挥发油作用不同时间对

## ■背景资料

天然物蜂胶(propolis)是蜜蜂从植物花苞及树干上采集的树脂, 混入其上颚腺分泌物和蜂蜡等物质而成的一种具有芳香气味的胶状固体物质。蜂胶挥发油是蜂胶中的挥发性芳香组分, 一般采用水蒸气蒸馏法、有机溶剂萃取或超临界CO<sub>2</sub>萃取法从蜂胶中提取, 它是蜂胶中的重要活性组分, 约占蜂胶成分的10%。

## ■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

## ■ 相关报道

1988年Grunberger等从以色列的蜂胶中首次分离出具有抗癌作用的CAPE. 1991年,日本国立预防卫生研究所松野哲也博士研究证明,蜂胶中的二萜类等化合物对肿瘤具有特异性杀伤作用. 1997年, Matsuno等采用高效液相色谱法从巴西蜂胶中分离出artepillin C, 他的抗肿瘤活性不亚于常规的化疗药物5-氟尿嘧啶.

HCT-116细胞生长所产生的不同影响; 倒置显微镜观察凋亡细胞的形态特点; PI染色、流式细胞仪检测细胞周期分布; Annexin V-FITC/PI双染色、流式细胞仪检测细胞凋亡率.

**结果:** 蜂胶挥发油能抑制HCT-116细胞生长, 其抑制活性与5-氟尿嘧啶(5-FU)一致, 在一定剂量和时间范围内, 可见凋亡细胞明显增多, 给予5、10、20 mg/L蜂胶挥发油处理HCT-116细胞24 h后, 较对照组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞(%)增多(57.57±2.31, 67.94±1.90, 86.09±1.72 vs 44.60±3.43, 均P<0.01), S期细胞(%)减少(33.51±3.40, 27.30±4.65, 7.30±4.76 vs 47.78±4.54, 均P<0.01), G<sub>2</sub>/M期细胞无明显变化, 细胞凋亡率明显上升, 呈剂量依赖性(58.33%±2.44%, 44.53%±2.59%, 35.40%±0.42% vs 4.38%±0.92%, 均P<0.01).

**结论:** 新疆蜂胶挥发油对HCT-116细胞具有明显的增殖抑制作用, 其机制与其阻滞细胞周期和诱导凋亡有关.

**关键词:** 蜂胶; 挥发油; 结直肠癌HCT-116细胞株; MTT比色法; 细胞周期; 凋亡

阿布力克木·吾甫尔, 依米提·热合曼, 吐尔逊娜依·阿布都热依木, 阿尔孜古丽·吐尔逊, 木塔力甫·艾买提. 新疆蜂胶挥发油对结直肠癌HCT-116细胞增生、周期及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1469-1475

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1469.asp>

## 0 引言

天然物蜂胶(propolis)是蜜蜂从植物花苞及树干上采集的树脂, 混入其上颚腺分泌物和蜂蜡等物质而成的一种具有芳香气味的胶状固体物质<sup>[1]</sup>. 蜂胶从公元前300年开始作为民间药物广泛使用<sup>[2]</sup>. 蜂胶具有抗氧化<sup>[3-5]</sup>、抗菌<sup>[6-9]</sup>、抗炎<sup>[10,11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12-15]</sup>等多种生物活性作用. 蜂胶成分及其生物活性取决于其收集产地<sup>[16-18]</sup>, 由于蜂胶的化学成分十分复杂, 迄今发现的有300多种成分<sup>[19,20]</sup>. 蜂胶挥发油是蜂胶中的挥发性芳香组分, 一般采用水蒸气蒸馏法、有机溶剂萃取或超临界CO<sub>2</sub>萃取法从蜂胶中提取, 它是蜂胶中的重要活性组分, 约占蜂胶成分的10%. 蜂胶挥发油化学成分也较为复杂, 含有多种生物活性较强或具有芳香气味的萜烯类、芳香族、脂肪族及其含氧衍生物如醇、醛、酮、酸、酚、醚、酯、内酯等. 近年来国内外学者对蜂胶及其挥发油成分的抗肿瘤作用及其活性组分进行了大量研究, 取得了一定的进展. 1988年Grunberger等<sup>[21]</sup>从以

色列的蜂胶中首次分离出咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE), 近年来国外研究报道, CAPE作为蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分, 对白血病<sup>[22]</sup>、结肠癌<sup>[23]</sup>、乳腺癌<sup>[24]</sup>、宫颈癌<sup>[25]</sup>、黑色素瘤<sup>[21]</sup>等细胞均有抑制增殖和诱导凋亡作用. 日本国立预防卫生研究所的研究证明, 蜂胶中的二萜类等化合物对肿瘤具有特异性杀伤作用<sup>[26]</sup>, 癌症患者在服用蜂胶后, 不仅癌细胞可以消失, 而且能减轻化疗、放疗引起的不良反应. Matsuno等采用高效液相色谱法从巴西蜂胶中分离出3, 5-二异戊二烯基-4-羟基肉桂酸(artepillin C)<sup>[27]</sup>, 该化合物对肿瘤细胞表现出明显的细胞毒性<sup>[27]</sup>, 他的抗肿瘤活性并不亚于常规的化疗药物5-氟尿嘧啶(5-FU). 日本Awale等<sup>[28]</sup>从巴西蜂胶中分离出3种新的化合物, 其中(6aR, 11aR)-3, 8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan(12.5 μmol/L)对人胰腺癌细胞PANC-1具有很强的杀死作用. 我们采用水蒸气蒸馏法从新疆伊犁蜂胶中分离出挥发油成分, 并对其进行GC-MS成分分析, 从中共分离出59个峰, 经核对标准谱图及有关资料, 鉴定出其中的42个化合物. 这些化合物中含有萜烯类及其衍生物, 即有机酸类、烯炔类、脂肪酸类、芳香类、酯类、醇类以及少量的酚、醛、酮类等物质成分. 文献报道蜂胶挥发油所含的一些化合物特别是萜烯类及其衍生物和有机酸类具有抗肿瘤活性, 但对不同肿瘤细胞的作用存在不一致的结果. 本研究根据从蜂胶中分离出的新疆伊犁蜂胶挥发油含有萜烯类、有机酸类等多种活性成分的实验依据, 进一步研究新疆伊犁蜂胶挥发油对体外培养的结直肠癌HCT-116细胞的增殖抑制作用及其对细胞周期和凋亡的影响, 并探讨其抗肿瘤作用的机制, 为开发新疆伊犁蜂胶挥发油所含的某些化合物成为新的抗肿瘤药物提供重要的实验数据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 蜂胶采至新疆伊犁那拉提养蜂场, 采集时间是2009-10. 蜂胶挥发油是采用水蒸气蒸馏法从蜂胶中分离, 并进一步对其进行纯化. 结直肠癌细胞株HCT-116购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库. 二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为Sigma公司产品. Mocoys 5A培养基由Hyclone公司提供、胎牛血清由Gibco公司提供. 细胞周期检测试剂盒为凯基生物公司产品, Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒

为珠海健康元生物医药有限公司产品. 流式细胞仪为美国贝克曼库尔特(Beckman)公司所生产.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HCT-116细胞置孵箱(37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>)内培养, 给予100 mL/L胎牛血清的McCoy's 5A培养基, 其内另加1.0×10<sup>5</sup> U/L青霉素和链霉素, 调pH至7.2. 根据细胞生长状况每2-3 d换液1次, 当细胞生长进入对数生长期时, 分别给予蜂胶挥发油和5-FU, 临用前以DMSO溶解配成浓度分别为160、80 g/L的母液, 用McCoy's 5A培养液稀释成不同浓度(McCoys 5A培养液中DMSO浓度<0.1%).

1.2.2 蜂胶挥发油对结直肠癌HCT-116细胞增殖抑制作用的检测: 取对数生长期的HCT-116细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化培养细胞, 用含100 mL/L胎牛血清的McCoy's 5A培养液配成单个细胞悬液, 以每孔4×10<sup>3</sup>个细胞接种于96孔培养板培养, 将培养板移入CO<sub>2</sub>孵箱中, 在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下常规培养. 24 h后吸除原培养液, 加入含蜂胶挥发油浓度分别为5、10、20、40、80、160 mg/L的McCoy's 5A培养液200 μL, 并设对照组(仅加相同浓度的DMSO), 另设只加培养液, 不加细胞和药物的空白组. 此外再设含40、80 mg/L 5-FU的McCoy's 5A培养液为阳性对照, 其结果用于蜂胶挥发油和5-FU的活性对比, 以上各组均设6个复孔. 分别将各组细胞继续培养24、48、72、96 h后, 进行MTT实验. 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 继续培养4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入DMSO 150 μL, 轻轻振荡10 min, 使结晶充分溶解, 用酶联免疫标记分析仪在490 nm波长处测定各孔的吸光度A值(A<sub>490</sub>), 按下列公式计算细胞生长抑制率: 细胞生长抑制率R = [1-(A实验组-A空白组)/(A对照组-A空白组)]×100%.

1.2.3 用倒置显微镜动态观察细胞形态学变化: 取对数生长期的HCT-116细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 以每孔5×10<sup>4</sup>个细胞接种于6孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液, 加入蜂胶挥发油浓度分别为5、10、20、40、80、160 mg/L的McCoy's 5A培养液2 mL, 继续培养24 h后, 用倒置显微镜观察细胞形态学变化.

1.2.4 蜂胶挥发油对结直肠癌细胞株HCT-116细胞周期的影响: 取对数生长期的HCT-116细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 以每孔5×10<sup>4</sup>个细胞接种于6孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液,

加入蜂胶挥发油浓度分别为5、10、20 mg/L的McCoy's 5A培养液2 mL, 设培养液中不加药物(加相同浓度的DMSO)的为对照组, 继续培养24 h后, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 收集细胞, 离心(2 000 r/min, 4 °C)5 min后弃上清, 用PBS重悬, 离心(2 000 r/min, 4 °C), 弃上清, 再次重悬离心(2 000 r/min, 4 °C)后弃上清, 缓慢加入体积分数为700 mL/L预冷的乙醇固定, 4 °C过夜. 染色前用PBS洗涤, 离心(2 000 r/min, 4 °C)5 min, 去除固定液, 用100 μL RNaseA消化, 37 °C水浴30 min, 再加入400 μL碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液混匀, 4 °C避光染色30 min, 流式细胞仪进行DNA含量和细胞周期分析, 得出细胞各周期的百分率.

1.2.5 蜂胶挥发油对结直肠癌细胞株HCT-116细胞凋亡的影响: 取对数生长期的HCT-116细胞经2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 以每孔5×10<sup>4</sup>个细胞接种于6孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液, 加入蜂胶挥发油浓度分别为5、10、20 mg/L的McCoy's 5A培养液2 mL, 设培养液中不加药物(加相同浓度的DMSO)的为对照组, 继续培养24 h后收集细胞, 离心(1 500 r/min, 4 °C)5 min后弃上清, 用PBS重悬细胞并计数, 取大约1.5×10<sup>5</sup>细胞悬液, 离心(1 500 r/min, 4 °C), 弃上清, 再次重悬离心后弃上清, 加入500 μL的1×Binding Buffer(用蒸馏水稀释10×Binding Buffer), 再加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI, 轻轻混匀. 在室温下, 避光反应5-15 min, 在1 h内进行流式细胞仪检测, 检测时激发波长Ex = 488 nm, 发射波长Em = 530 nm, FITC的绿色荧光FITC通道为FL1, PI红色荧光PI通道为FL2.

**统计学处理** 所有数据均以mean±SD表示. 以SPSS17.0版专用统计分析软件对各组数据进行t检验. 以CalcuSyn Demo Version 1.1.4统计软件计算IC<sub>50</sub>.

## 2 结果

2.1 蜂胶挥发油对结直肠癌HCT-116细胞增殖的抑制作用 用蜂胶挥发油分别作用24、48、72、96 h后HCT-116细胞的生长明显受到抑制(图1), 随着蜂胶挥发油浓度的增加和作用时间的延长, HCT-116细胞的增殖抑制率逐渐升高, 抑制作用表现剂量依赖性和时间依赖性(表1). 蜂胶挥发油作用结直肠癌HCT-116细胞24、48、72、96 h后的IC<sub>50</sub>分别为25.95、19.50、9.68、8.24 mg/L. 40、80 mg/L蜂胶挥发油组的吸光度A值以不同

### ■创新点

本研究首次通过测定新疆产蜂胶挥发油的抗大肠癌细胞活性, 为实现蜂胶产品产业化、标准化, 进一步将其开发成新型抗大肠癌药物打下坚实的基础. 本研究同时对新疆蜂胶挥发油的抗结直肠癌细胞作用机制研究奠定了一定基础.

### 应用要点

本研究表明,蜂胶挥发油对HCT-116细胞具有明显的增生抑制作用.本实验首次研究分析的新疆伊犁蜂胶挥发油所含的一些化合物有望研究为新的抗肿瘤药物.

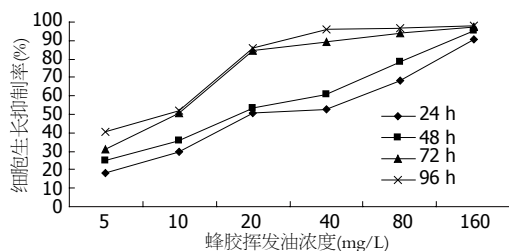


图1 不同浓度蜂胶挥发油对HCT-116细胞增殖的抑制作用.

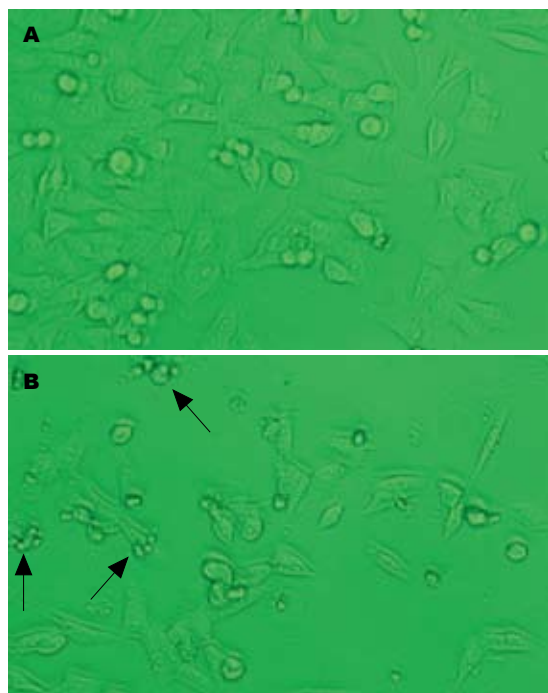


图2 蜂胶挥发油作用24 h后HCT-116细胞形态学变化( $\times 200$ ). A: 对照组; B: 20 mg/L蜂胶挥发油.

时间段分别与40、80 mg/L 5-FU组比较均无显著性差异( $P>0.05$ ). 蜂胶挥发油对HCT-116细胞的抑制作用与经典的抗癌药物5-FU一致.

**2.2 蜂胶挥发油作用后细胞形态学变化** 不同浓度的蜂胶挥发油作用HCT-116细胞24 h后,在倒置显微镜下均可见悬浮细胞增多,细胞质混浊,细胞胞体缩小、变圆、皱缩,核固缩碎裂,细胞折光性减弱,细胞内出现颗粒样物质,培养液中有较多的细胞碎片.以20 mg/L蜂胶挥发油组最明显(图2),结果提示,20 mg/L蜂胶挥发油作用24 h后HCT-116细胞的生长明显受到抑制.

**2.3 蜂胶挥发油对HCT-116细胞周期的影响** 结直肠癌HCT-116细胞经5、10、20 mg/L的蜂胶挥发油作用24 h后,细胞 $G_0/G_1$ 期比例增加,S期比例细胞明显减少,在 $G_0/G_1$ 期和S期各浓度蜂胶挥发油组与对照组比较差异均有显著性( $P<0.01$ ).而且随着蜂胶挥发油剂量的增加, $G_0/G_1$ 期细胞

表1 蜂胶挥发油对HCT-116细胞增殖的抑制作用(%)

蜂胶挥发油浓度(mg/L)	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	18.3	24.7	31.4	40.4
10	29.4	36.1	50.8	52.1
20	51.0	53.5	84.3	85.6
40	52.7	60.9	89.5	95.7
80	68.3	78.3	93.8	96.7
160	90.5	95.1	97.6	97.8

表2 蜂胶挥发油对HCT-116细胞周期的影响(mean  $\pm$  SD, %)

蜂胶挥发油浓度(mg/L)	$G_0/G_1$ 期	S期	$G_2/M$ 期
0	44.60 $\pm$ 3.43	47.78 $\pm$ 4.54	7.62 $\pm$ 1.39
5	57.57 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>	33.51 $\pm$ 3.40 <sup>b</sup>	9.10 $\pm$ 2.20
10	67.94 $\pm$ 1.90 <sup>bd</sup>	27.30 $\pm$ 4.65 <sup>bc</sup>	4.75 $\pm$ 3.86
20	86.09 $\pm$ 1.72 <sup>bf</sup>	7.30 $\pm$ 4.76 <sup>bf</sup>	6.63 $\pm$ 3.07

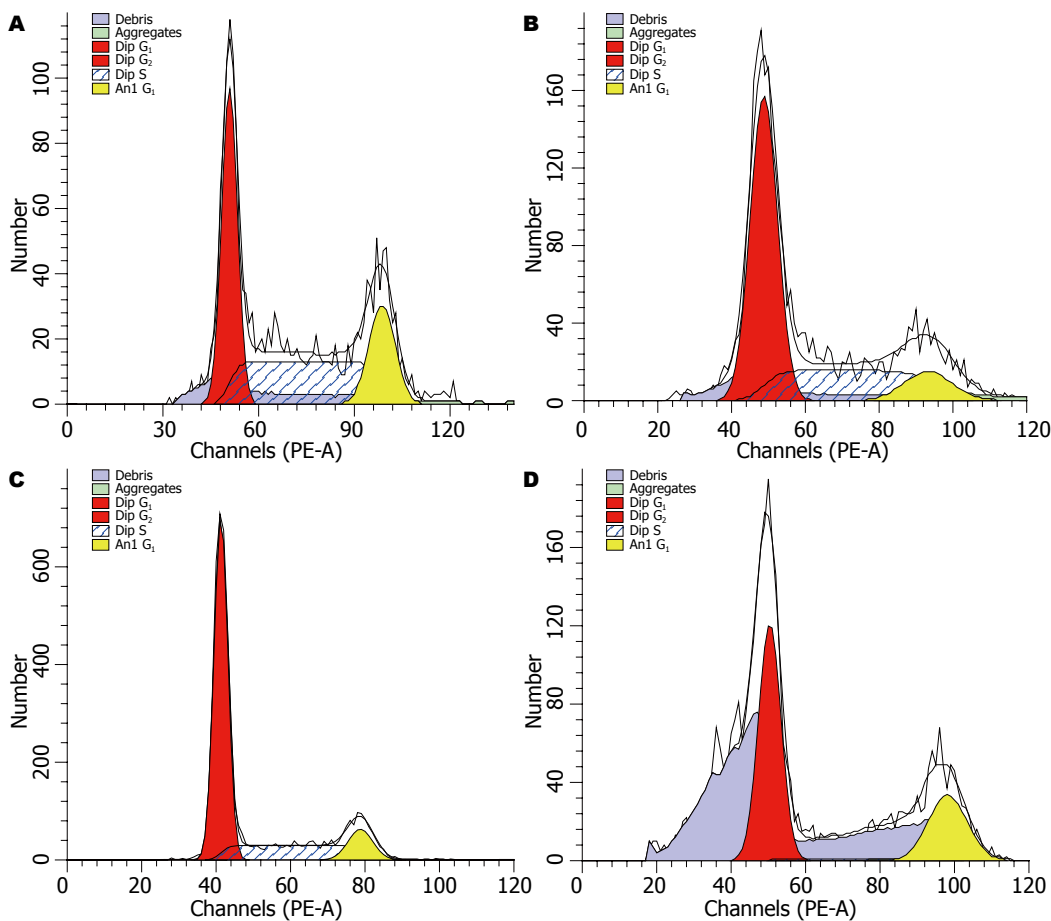
<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 5 mg/L组; <sup>f</sup> $P<0.01$  vs 10 mg/L组.

比例逐渐增加,S期细胞比例逐渐下降,10 mg/L组 $G_0/G_1$ 期和S期细胞比例分别与5 mg/L组比较均有显著性差异( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ).20 mg/L组 $G_0/G_1$ 期和S期细胞比例与10 mg/L组比较,差异极显著( $P<0.01$ ),而 $G_2/M$ 期比例均无明显变化(表2,图3).

**2.4 蜂胶挥发油对HCT-116细胞凋亡的影响** 对照组HCT-116细胞自然凋亡率为4.38%  $\pm$  0.92%,5、10、20 mg/L的蜂胶挥发油作用24 h后凋亡率分别为35.40%  $\pm$  0.42%,44.53%  $\pm$  2.59%,58.33%  $\pm$  2.44%,均显著高于对照组( $P<0.01$ ),随着蜂胶挥发油剂量的增加,凋亡率逐渐增加(图4,5).10 mg/L组凋亡率与5.0 mg/L组比较,20 mg/L组凋亡率与10 mg/L组比较差异极显著( $P<0.01$ ).

### 3 讨论

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病呈上升趋势<sup>[23]</sup>,严重威胁人民生命健康,积极探索更为有效、安全的治疗方法具有重要的临床意义.我们应用蜂胶挥发油作用人结肠癌HCT-116细胞24、48、72、96 h,发现蜂胶挥发油能明显抑制细胞增生,随着蜂胶挥发油浓度的增加和作用时间的延长,其对HCT-116细胞生



**同行评价**  
本文科学性较好, 对开发新的抗肿瘤药物具有重要的潜在的临床意义。

图 3 不同浓度蜂胶挥发油对HCT-116细胞周期的影响. A: 0 mg/L组; B: 5 mg/L组; C: 10 mg/L组; D: 20 mg/L组.

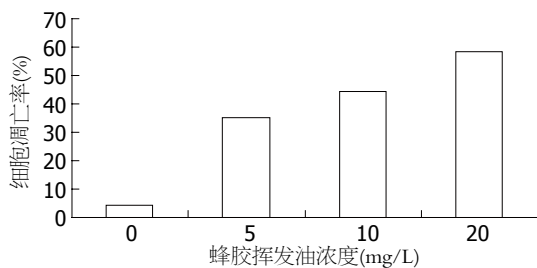


图 4 不同浓度蜂胶挥发油对HCT-116细胞凋亡的影响.

长的抑制率逐渐升高, 抑制作用表现为剂量依赖性和时间依赖性.

从形态学角度观察不同浓度的蜂胶挥发油作用HCT-116细胞24 h后细胞形状的变化, 发现细胞出现核固缩、核碎裂、染色质边集和凋亡小体等典型的凋亡形态学特征.

我们发现, 蜂胶挥发油作用HCT-116细胞24 h后, 细胞受阻于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, S期细胞减少, 且呈剂量依赖性. 在一个完整的细胞周期中, 有多个影响各时期过渡的限制点, 他们分别处在由G<sub>1</sub>期到M期和M期到G<sub>1</sub>期的过渡阶段中. 由于不同生物细胞的增生周期时间不同, 主要表现在G<sub>1</sub>

期持续时间的差异, 而且G<sub>1</sub>期的启动是细胞周期的关键. 因此G<sub>1</sub>-S期的调控尤为重要. G<sub>1</sub>期阻滞使HCT-116细胞生长周期延长, 细胞的恶性增生相应减慢. S期即DNA合成期, 可反映细胞的增生情况. S期细胞占细胞周期的比例高则提示DNA合成活跃, 细胞增生活跃. 与此相反, S期细胞比例低则意味DNA合成缓慢, 细胞增生减慢, 一般而言, 肿瘤细胞的S期比例较正常细胞要高, 其增生活性也较正常细胞高. 因此, 我们能够表明蜂胶挥发油可调控细胞周期, 使细胞受阻于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 而不能进入S期, 限制细胞增生.

我们应用Annexin V-FITC/PI双染色法检测蜂胶挥发油对HCT-116细胞凋亡的影响, 该方法是目前检测凋亡的最敏感的方法之一, 能检测出早期凋亡细胞, 并能区分出坏死细胞. 本项研究结果显示, 蜂胶挥发油作用HCT-116细胞24 h后, 细胞凋亡率明显升高, 呈剂量依赖性特点. 根据现有的研究结果认为, 蜂胶挥发油在体外对肿瘤具有较强的诱导凋亡作用, 可能是通过抑制凋亡调控基因Bcl-2表达, 激活凋亡相关基因Fas、Bax, 启动细胞凋亡过程等而诱发

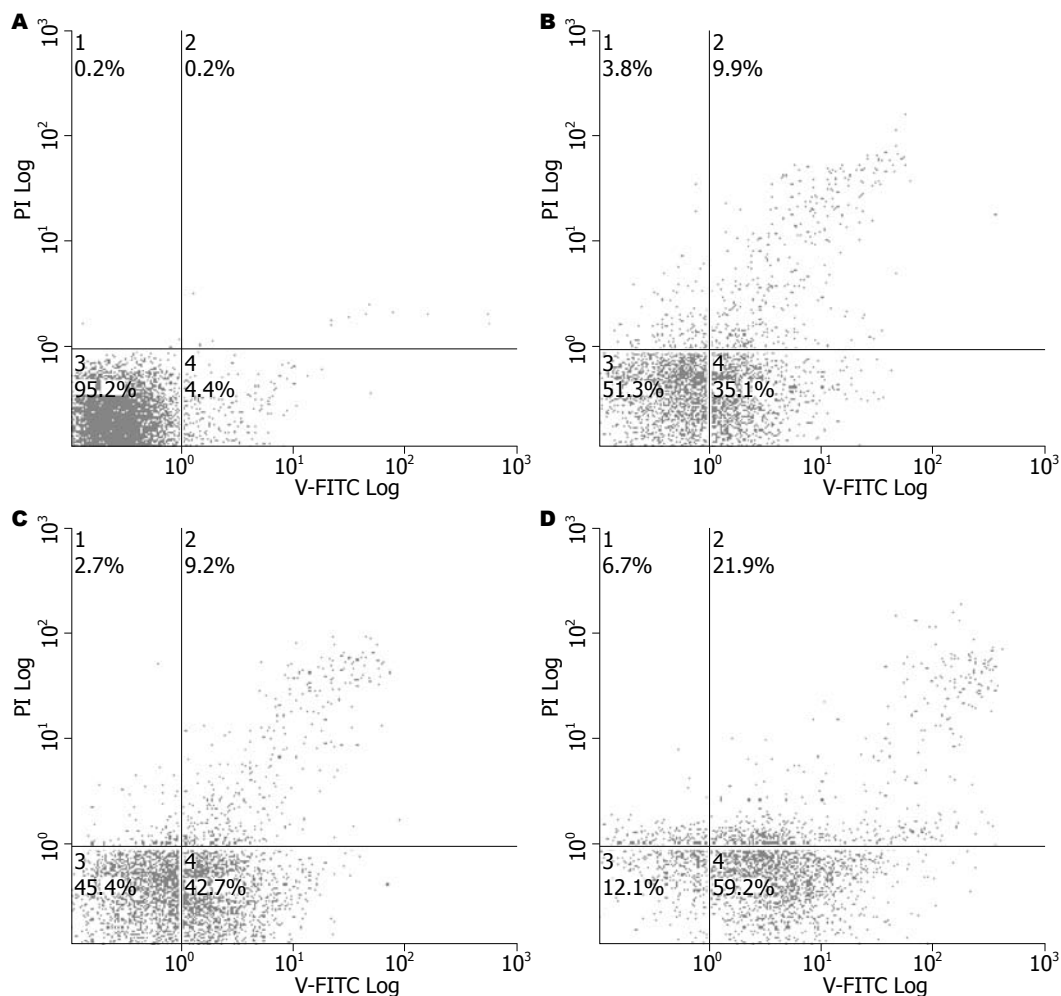


图 5 不同浓度蜂胶挥发油对HCT-116细胞凋亡的影响。A: 0 mg/L组; B: 5 mg/L组; C: 10 mg/L组; D: 20 mg/L组。

HCT-116细胞凋亡<sup>[29]</sup>, 本研究的结果还需要进一步深入研究证实。

#### 4 参考文献

- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* 2001; 8: 16-23
- Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod* 1998; 61: 896-900
- Sheng JC, Zhou J, Wang L, Xu J, Hu QH. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *J Eur Food Res Technol* 2007; 225: 249-253
- Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *J Food Chemistry* 2007; 103: 729-733
- Kanbur M, Eraslan G, Silici S. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72: 909-915
- Bastos EM, Simone M, Jorge DM, Soares AE, Spivak M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *J Invertebr Pathol* 2008; 97: 273-281
- Ramanauskienė K, Inkenienė AM, Savickas A, Mastekova R, Brusokas V. Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Pol Pharm* 2009; 66: 681-688
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235-240
- Murad JM, Calvi SA, Soares AM, Bankova V, Sforcin JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331-334
- Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, Ohara N. Anti-inflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytother Res* 2007; 21: 452-456
- Paulino N, Dantas AP, Bankova V, Longhi DT, Scremin A, de Castro SL, Calixto JB. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 307-313
- 高春义, 张建, 赵跃然, 游力, 冯进波, 田志刚. 蜂胶提取物抗肿瘤作用及对免疫功能的影响. *中国中医药信息杂志* 2000; 7: 27-28
- Mishima S, Narita Y, Chikamatsu S, Inoh Y, Ohta S, Yoshida C, Araki Y, Akao Y, Suzuki KM, Nozawa Y.

- Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 5-11
- 14 Orsolić N, Terzić S, Mihaljević Z, Sver L, Basić I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1928-1933
- 15 Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1057-1059
- 16 Gabrys J, Konecki J, Krol W, Scheller S, Shani J. Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *Pharmacol Res Commun* 1986; 18: 513-518
- 17 李雅萍, 贺丽苹, 陈玉芬, 卢占列, 郑尧隆, 潘建国, 林励. SPME-GC/MS联用技术分析蜂胶中挥发性成分的研究. *现代食品科技* 2007; 23: 78-80
- 18 Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 5434-5440
- 19 Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolčić-Bubalo A, Medić-Sarić M, Mayer L, Romić Z, Bućan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 548-554
- 20 郭伽, 周立东. 蜂胶的化学成分研究进展(综述). *中国养蜂* 2000; 51: 17-18
- 21 Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232
- 22 Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Tsai TH, Wang SY. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 5615-5619
- 23 Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4008-4012
- 24 Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6017-6026
- 25 Hung MW, Shiao MS, Tsai LC, Chang GG, Chang TC. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 4773-4780
- 26 松野哲也, 谏南辉. 蜂胶中的活性物质. *中国养蜂* 1993; 44: 38-40
- 27 黄文诚. 蜂胶的生物活性和药理作用的研究进展(三). *蜜蜂杂志* 2006; 26: 28-30
- 28 Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 181-189
- 29 张建, 高春义, 赵跃然, 游力, 田志刚. 蜂胶体外抗肿瘤实验及其诱发肿瘤细胞凋亡的研究. *中华肿瘤杂志* 2000; 22: 468-469

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》外文字符标准

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

# 核转录因子- $\kappa$ B在原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤中的表达及临床意义

刘方方, 葛军辉, 刘惠敏, 何金, 袁振刚, 王良哲, 马小梅

## ■背景资料

原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤(PGI-DLBCL)在临床上恶性程度及侵袭性比结内DLBCL高,且与胃肠道一般疾病或癌症难以区别,因此发现时分期较晚,误诊率较高,且其标准治疗的方法仍未确定.因此,迫切需要寻找适合的分子靶点,为PGI-DLBCL临床诊治提供指导.

刘方方, 葛军辉, 刘惠敏, 何金, 王良哲, 马小梅, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科上海市200003  
袁振刚, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院血液科上海市200003  
刘方方, 在读硕士, 医师, 主要从事淋巴瘤的分子诊断方面的研究. 国家自然科学基金资助项目, No. 81071865  
上海市科学技术委员会科研计划基金资助项目, No. 10411963700  
作者贡献分布: 此课题实验操作由刘方方与何金完成; 免疫组织化学分析由葛军辉与马小梅完成; 病例采集、数据分析由刘方方、袁振刚及王良哲完成; 本论文撰写由刘方方与葛军辉完成; 刘惠敏负责实验设计、论文修改及审阅.  
通讯作者: 刘惠敏, 教授, 200003, 上海市黄浦区凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科.  
ahnulxy@yahoo.com.cn  
电话: 021-81886121  
收稿日期: 2011-04-05 修回日期: 2011-05-12  
接受日期: 2011-05-17 在线出版日期: 2011-05-18

## Clinical significance of nuclear factor $\kappa$ B expression in primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma

Fang-Fang Liu, Jun-Hui Ge, Hui-Min Liu, Jin He, Zhen-Gang Yuan, Liang-Zhe Wang, Xiao-Mei Ma

Fang-Fang Liu, Jun-Hui Ge, Hui-Min Liu, Jin He, Liang-Zhe Wang, Xiao-Mei Ma, Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China  
Zhen-Gang Yuan, Department of Hematology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81071865; and the Shanghai Research Programs of Committee of Science and Technology, No. 10411963700  
Correspondence to: Professor Hui-Min Liu, Department of Pathology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 415 Fengyang Road, Huangpu District, Shanghai 200003, China. ahnulxy@yahoo.com.cn  
Received: 2011-04-05 Revised: 2011-05-12  
Accepted: 2011-05-17 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical significance of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) expression in primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma (PGI-DLBCL).

**METHODS:** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD10, Bcl-6, Mum-1

and NF- $\kappa$ B p65 in PGI-DLBCL. The relationship of NF- $\kappa$ B p65 expression with tumor subtype, biological behavior and prognosis was analyzed.

**RESULTS:** Of 54 cases of PGI-DLBCL detected, 28% were positive for CD10, 69% positive for Bcl-6, and 81% positive for Mum-1; 19 were classified as germinal center B-cell-like (GCB) subtype, and 35 as activated B-cell like (ABC) subtype. The positive rate of NF- $\kappa$ B p65 expression in PGI-DLBCL was 72% (39/54). The positive rate of NF- $\kappa$ B p65 expression was significantly higher in ABC-DLBCL than in GCB-DLBCL (74.4% vs 25.6%,  $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B p65 expression was correlated with extranodal invasion site in PGI-DLBCL ( $P < 0.05$ ). The overall survival time of NF- $\kappa$ B p65-negative PGI-DLBCL patients was longer than that of NF- $\kappa$ B p65-positive ones (45.8 mo  $\pm$  35.9 mo vs 20.3 mo  $\pm$  29.3 mo,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** NF- $\kappa$ B p65 expression was positively correlated with the subtype, development, and invasion of PGI-DLBCL. NF- $\kappa$ B p65 can be used as a prognostic factor for PGI-DLBCL and may represent a new molecular target for the therapy of GI-DLBCL.

**Key Words:** NF- $\kappa$ B p65; Gastrointestinal tract; Lymphoma; Large B cells; Prognosis

Liu FF, Ge JH, Liu HM, He J, Yuan ZG, Wang LZ, Ma XM. Clinical significance of nuclear factor  $\kappa$ B expression in primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1476-1482

## 摘要

**目的:** 探讨原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤(PGI-DLBCL)中核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达及临床意义.

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测PGI-DLBCL患者中CD10、Bcl-6、Mum-1、NF- $\kappa$ B p65的表达, 结合临床随访资料, 分析NF- $\kappa$ B p65与PGI-DLBCL免疫分型、临床生物学行为及预后的关系.

## ■同行评议者

宋军, 副教授, 武汉协和医院消化科

结果: PGI-DLBCL中CD10阳性15例(28%), Bcl-6阳性37例(69%), Mum1阳性44例(81%), 将其分为生发中心B细胞型(GCB型)19例(35%), 活化B细胞(ABC型)35例(65%). NF- $\kappa$ B p65阳性表达率为72%(39/54), ABC型中NF- $\kappa$ B p65的表达率明显高于GCB型(74.4% vs 25.6%,  $P < 0.05$ ). PGI-DLBCL中NF- $\kappa$ B p65的表达程度与结外侵犯部位有显著差异( $P < 0.05$ ), 其阳性表达率在结外侵犯部位中“ $\geq 2$ ”组的77%(10/13)表达强度大于“0-1”组的71%(29/41)( $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B p65表达阴性患者平均生存期明显长于阳性组(45.8 mo  $\pm$  35.9 mo vs 20.3 mo  $\pm$  29.3 mo,  $P < 0.05$ ).

结论: NF- $\kappa$ B p65和ABC型呈正相关, 和PGI-DLBCL的发展和侵袭有关, 对PGI-DLBCL预后判断具有一定临床意义, 在PGI-DLBCL的高表达可作为新的治疗靶点.

关键词: NF- $\kappa$ B p65; 胃肠道; 淋巴瘤; 大B细胞; 预后

刘方方, 葛军辉, 刘惠敏, 何金, 袁振刚, 王良哲, 马小梅. 核转录因子- $\kappa$ B在原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1476-1482  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1476.asp>

## 0 引言

胃肠道是结外非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin's lymphoma, NHL)常发生的部位, 据统计原发性胃肠道淋巴瘤(primary gastrointestinal lymphoma, PGIL)占整个NHL的4%-20%. 其中原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤(primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma, PGI-DLBCL)是胃肠道最常见的淋巴瘤, 占全部胃肠道淋巴瘤的40%-50%<sup>[1,2]</sup>. PGI-DLBCL的形态学和分子生物学与结内弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)无区别, 恶性程度及侵袭性比结内DLBCL高, 且与胃肠道一般疾病或癌症难以区别. 因此发现时分期较晚、误诊率较高. 由于手术切除存在致死性的并发症, 近年来将化疗作为胃肠道DLBCL的首选治疗<sup>[3,4]</sup>, 而部分患者对常规化疗不敏感, 预后差. 故进一步寻找合适的治疗靶点, 对患者的治疗和预后具有重要意义. NF- $\kappa$ B是一类蛋白质核转录因子, 在多种肿瘤中存在着选择性激活或表达异常. 有学者认为, NF- $\kappa$ B持续活化是活化B淋巴细胞型弥漫性大B细胞淋巴瘤(activate B-cell like diffuse large B-cell lymphoma, ABC-

DLBCL)预后不好的原因之一, NF- $\kappa$ B传导通路成为ABC-DLBCL潜在的治疗靶点<sup>[5,6]</sup>. 本研究通过PGI-DLBCL中NF- $\kappa$ B p65的表达与其免疫分型、临床特征及预后的相互关系, 试图为PGI-DLBCL中分子机制及临床治疗提供依据及指导.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集1998-05/2010-06长征医院PGI-DLBCL患者54例, 所有病例均符合2001年WHO淋巴瘤分类DLBCL组织学标准: 肿瘤细胞呈弥漫性增生且细胞核相当于正常吞噬细胞的细胞核或淋巴细胞的细胞核的2倍. 全部病例均符合Dawson等<sup>[7]</sup>提出的PGIL的诊断标准: (1)全身体表淋巴结无肿大; (2)无纵隔淋巴结肿大; (3)外周血白细胞计数及分类正常; (4)病变以胃肠道为主或伴有局部淋巴结受累, 肝脾无原发灶. 对其临床资料、实验室检测结果进行总结, 其中男28例, 女26例, 年龄12-84(中位年龄61)岁. 54例均经胃肠镜或CT提示有占位, 胃DLBCL 30例, 肠DLBCL 24例(回盲部20例, 小肠4例). 45例标本来源于根治性或姑息性手术切除, 9例来源于淋巴结活检术. 有49例患者术后接受化疗, 其中14例行2次以上CHOP化疗方案, 13例行2次以上利妥昔单抗(rituximab)联合CHOP(R-CHOP)化疗方案, 22例术后行一般化疗方案或中药治疗. 临床分期参考Lugano分期评估<sup>[8]</sup>. 按照IPI<sup>[9]</sup>评分将患者分为低度危险组(0-1因素), 低中度危险组(2个因素), 高中度危险组(3个因素), 高度危险组(4-5个因素). 另选同期10例反应增生淋巴结组织作为对照. 随访资料通过患者门诊复查、电话随访结合信函调查获得. 随访中已死亡患者生存期为病理诊断明确当日至死亡日期的间隔月数, 计为完整数据, 随访截止仍存活者生存期为病理诊断明确当日至末次随访的间隔月数, 计为截尾数据. 末次随访时间为2010-12-31. 鼠抗人单克隆抗体CD10、Bcl-6、Mum-1(即用型)均购自福州迈新生物技术公司, 兔抗人单克隆抗体NF- $\kappa$ B p65(浓缩型1:150)购自Santa Cruz公司. EnVision即用型免疫组织化学试剂盒和DAB二氨基联苯胺显色剂试剂盒, 均由福州迈新生物技术公司提供.

1.2 方法 石蜡标本制成4  $\mu$ m的切片, 常规脱蜡, 梯度乙醇水化, 抗原修复, 免疫组织化学EnVision法染色, DAB显色, 苏木精对比染色, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 同时用已知的阳性切片在同条件下染色作为阳性对照, 用PBS缓冲

## ■ 研究前沿

NF- $\kappa$ B是一类蛋白质核转录因子, 在多种肿瘤中存在着选择性激活或表达异常. 有学者认为, NF- $\kappa$ B持续活化是活化B淋巴细胞型弥漫性大B细胞淋巴瘤(ABC-DLBCL)预后不好的原因之一, NF- $\kappa$ B传导通路成为ABC-DLBCL潜在的治疗靶点. 从不同角度研究NF- $\kappa$ B通路上的信号分子, 找到抑制NF- $\kappa$ B活性的靶点, 则能诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤的生长, 这也一直是国内外学者研究的热点领域.

### ■ 相关报道

Espinosa等通过免疫组织化学发现NF- $\kappa$ B p65在DLBCL和正常淋巴结滤泡生发中心中是胞质表达,在正常淋巴结副皮质区是胞核表达。

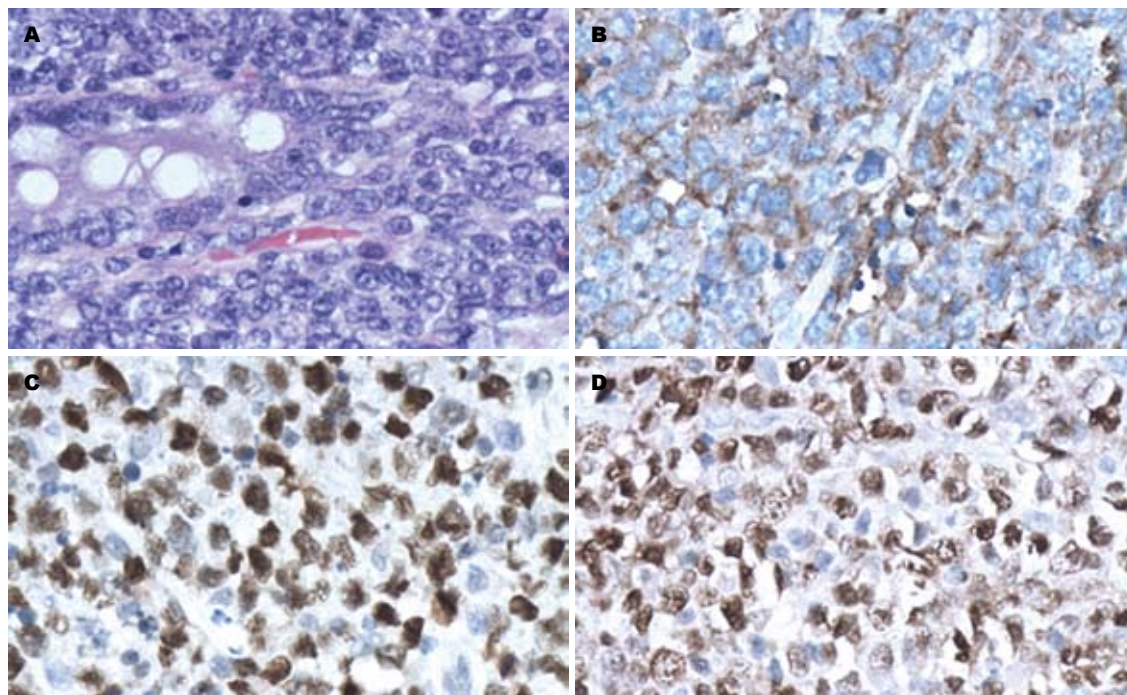


图1 PGI-DLBCL组织病理学观察结果( $\times 400$ )。A: HE染色; B: CD10阳性表达(IHC); C: Bcl-6阳性表达(IHC); D: Mum-1阳性表达(IHC)。

液代替一抗作为阴性对照。结果判定标准: 阳性反应为细胞膜、浆内或胞核内出现黄色或棕黄色颗粒, 且其着色强度高于背景非特异性染色者。CD10定位于细胞质或胞膜, Bcl-6、Mum-1定位于细胞核。每张切片随机选取10个高倍视野, 计算瘤细胞阳性率, 瘤细胞阳性率 $\leq 30\%$ 视为阴性<sup>[10]</sup>。NF- $\kappa$ B p65呈胞核着色, 每例切片随机选取10个高倍视野进行结果判定。按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染色强度: 无色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。阳性细胞数: 小于总数的5%为0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, 大于50%为3分。染色强度得分与阳性细胞数得分相加, 0分为阴性(-), 1-3分为弱阳性(+), 4-5分为中度阳性(++),  $\geq 6$ 分为强阳性(+++)<sup>[11]</sup>。

**统计学处理** 采用SPSS18.0统计软件。数据百分率比较采用 $R \times 2$ 列联表卡方检验及Fisher精确概率检验, 等级资料采用 $\chi^2$ 检验; 生存分析采用Kaplan-Meier分析技术, 生存期差别的比较用Log-Rank时序检验。检验效能为0.05。

## 2 结果

**2.1 PGI-DLBCL中NF- $\kappa$ B p65的表达与免疫分型的关系** 根据2004年Hans等<sup>[10]</sup>标准对采用对DLBCL进行免疫学分GCB和ABC两种亚型。CD10、Bcl-6作为生发中心细胞来源的标

志物, CD10(+)或CD10(-)/Bcl-6(+), 为GCB型; CD10(-)/Bcl-6(-)为ABC型。Mum-1作为非生发中心细胞来源的标志物, 若CD10(-)/Bcl-6(+), 则用Mum-1分类: Mum-1(+)为ABC型, Mum-1(-)为GCB型。结果显示: 15例(28%)CD10(+), 37例(69%)Bcl-6(+), 44例(81%)Mum-1(+). GCB型19例(35%), ABC型35例(65%)。NF- $\kappa$ B p65蛋白阳性表达主要定位于DLBCL细胞核, 呈淡黄、棕黄或棕褐色颗粒, 在PGI-DLBCL中的表达较弥漫, 程度增强, 阳性表达率为72%(39/54), 其中“+”为33%(18/54), “++”为30%(16/54), “+++”为9%(5/54)。NF- $\kappa$ B p65在反应增生淋巴结组织中的阳性表达主要定位于淋巴滤泡生发中心成熟淋巴细胞胞核。GCB亚型中NF- $\kappa$ B p65的表达率为25.6%, ABC亚型中NF- $\kappa$ B p65的表达率明显高于GCB亚型( $P < 0.05$ , 图1, 2, 表1)。

**2.2 PGI-DLBCL中NF- $\kappa$ B p65的表达与临床病理参数的关系** PGI-DLBCL中NF- $\kappa$ B p65的表达程度与结外侵犯部位有显著差异( $P < 0.05$ ), 其阳性表达率在结外侵犯部位中“ $\geq 2$ ”组的77%(10/13)表达强度大于“0-1”组的71%(29/41)。而NF- $\kappa$ B p65阳性表达与患者性别、年龄、临床分期、浸润深度、淋巴结受累、肿块大小、LDH、活动状态、IPI、B症状(临床分期中每一期还应根据有无特定的全身症状而分为A或B症

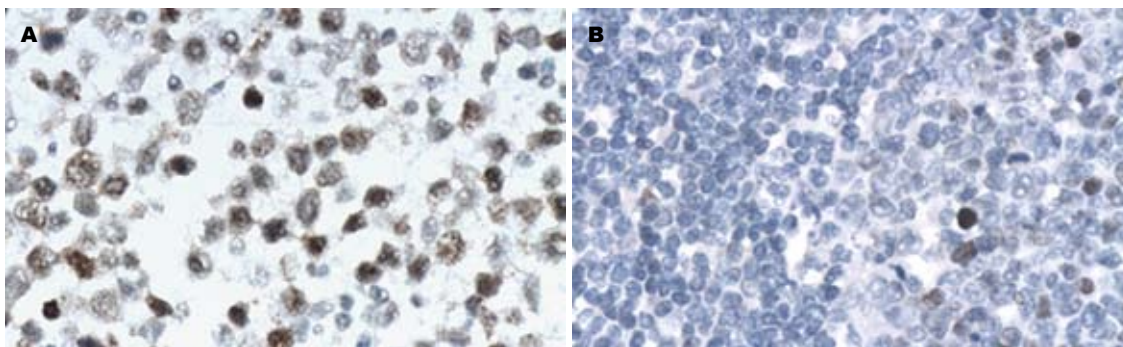


图 2 NF-κB p65免疫组织化学观察结果(IHC × 400). A: NF-κB p65在PGI-DLBCL组织中的阳性表达; B: NF-κB p65在反应增生淋巴组织中的阳性表达.

**■创新盘点**  
国内外尚未有文献对NF-κB在胃肠道DLBCL中的表达与免疫分型、各个临床特征及预后相关性作过系统研究. 本研究首次利用Lugano分期对PGI-DLBCL患者进行临床分期, 通过NF-κB p65在54例均为PGI-DLBCL外科术后石蜡组织中的表达, 全面系统地研究其在胃肠道DLBCL的临床意义, 为寻找PGI-DLBCL发病的分子机制及临床治疗提供理论依据.

表 1 NF-κB p65与免疫分型的关系

NF-κB p65	GCB n(%)	ABC n(%)	<i>t</i> 值	$\chi^2$ 值
-	9(60.0)	6(40.0)	0.018	5.608
+	10(25.6)	29(74.4)		

状: A: 无全身症状; B: 1: 发热: 无法解释的发热, 体温超过38 ℃; 2: 盗汗: 需要更换床单或被罩的大汗; 3: 体质量减轻: 诊断前6 mo内无法解释的体质量减轻超过平时体质量的10%)均无显著关系( $P>0.05$ , 表2).

2.3 PGI-DLBCL中NF-κB p65与患者预后的关系  
患者整体生存时间(overall survival, OS)为从诊断明确开始计算直到死亡或最后1次随访所经历的时间. 本组患者随访时间为1-144 mo, 6例失访. 其间死亡19例, 占随访者的35%. 最短存活时间仅为1 mo, 平均生存时间为26.6 mo ± 32.6 mo, 中位存活时间为12.5 mo. 通过Kaplan-Meier方法分析PGI-DLBCL中NF-κB p65的表达与患者预后的关系, 结果显示: NF-κB p65阴性表达患者平均生存期为45.8 mo ± 35.9 mo, 阳性表达患者平均为20.3 mo ± 29.3 mo, Log-Rank时序检验提示两组间生存期差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图3).

3 讨论

核转录因子NF-κB最初是Sen和Baltimore<sup>[12]</sup>从B细胞的核抽提物中发现的一种能与免疫球蛋白κ链基因的增强子κB序列(GGGACTTCC)特异性结合的核蛋白因子, 参与众多与免疫和炎症反应有关的基因转录调控<sup>[13]</sup>. 已知哺乳动物细胞中NF-κB成员有5个: NF-κB1(p50/p105)、NF-κB2(p52/p100)、c-Rel、RelA(p65)、RelB<sup>[14]</sup>. 其中p65:p50是最早被发现也是存在最广泛的二聚

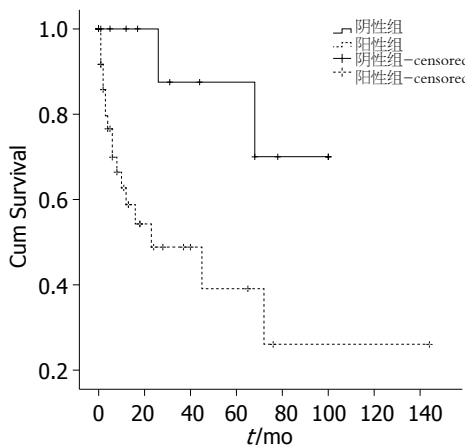


图 3 NF-κB p65阳性和阴性表达患者生存期.

体形式, 因此通常所说的NF-κB指的是p65:p50复合体. NF-κB广泛存在于各种类型细胞中, 正常情况下, NF-κB与阻遏蛋白(inhibitor of kappa B, IκB)相结合以无活性的状态存在于细胞质中, 当机体面临生存危机时, 在各种因素的作用下, NF-κB进入核内开始转录, 从而调控多种细胞因子、黏附分子、转录因子等, 不仅能促进细胞增殖及肿瘤转移, 增加肿瘤的血管生成及耐药等, 更重要的是他可以上调抗凋亡基因Bcl-2或凋亡蛋白抑制因子家族成员Survivin的表达, 使肿瘤细胞逃避凋亡, 成为肿瘤细胞生存的关键因素, 从而促进肿瘤的发生、发展. NF-κB不仅在实体瘤细胞增殖、转化和肿瘤的发展中起着非常重要的作用<sup>[15-18]</sup>, 而且与血液系统肿瘤密切相关. 近年, 大量研究表明, 在淋巴瘤细胞株以及淋巴瘤患者细胞都存在持续活化的NF-κB, 其种类为p50/p65和p50/p50<sup>[19]</sup>.

本研究通过检测NF-κB的主要组成因子NF-κB p65, 发现其阳性表达主要定位于PGI-DLBCL细胞核, 在反应增生淋巴组织中主要定位于滤泡生发中心的核, 这可能与淋巴滤泡的生发

## ■应用要点

NF- $\kappa$ B p65蛋白在PGI-DLBCL的ABC亚型中高表达,提示NF- $\kappa$ B可以作为PGI-DLBCL中一个很有前途的治疗靶点.今后PGI-DLBCL的治疗方向将趋向于个体化,根据患者的临床特征、免疫分型及免疫组化指标等因素制定恰当的治疗方案将会有助于提高临床疗效.由于NF- $\kappa$ B活化失调能引起很多疾病,因此NF- $\kappa$ B活化途径中的关键因子均可作为药物设计筛选的靶标.

表 2 NF- $\kappa$ B p65与各临床病理参数之间的关系 ( $n = 54$ )

临床病理特征	NF- $\kappa$ B/p65				P值
	-	+	++	+++	
性别	15	18	16	5	0.781
男	7	11	8	2	
女	8	7	8	3	
年龄(岁)	15	18	16	5	0.821
<60	6	7	7	1	
$\geq 60$	9	11	9	4	
临床分期	15	18	16	5	0.408
I、II	8	13	8	4	
III、IV	7	5	8	1	
浸润深度	15	18	16	5	0.649
黏膜、黏膜下层	1	0	0	0	
固有肌层	1	3	1	1	
浆膜层	13	15	15	4	
淋巴结受累	15	18	16	5	0.108
无	3	4	7	2	
局部淋巴结	2	8	1	1	
更远部位淋巴结	10	6	8	2	
结外侵犯部位	15	18	16	5	0.024
0-1	12	17	8	4	
$\geq 2$	3	1	8	1	
肿块大小(cm)	15	18	16	5	0.431
<5	2	4	1	0	
$\geq 5$	13	14	15	5	
LDH	15	18	16	5	0.215
正常	9	16	10	3	
>正常	6	2	6	2	
体能状况	15	18	16	5	0.713
0-1	12	15	13	3	
2-4	3	3	3	2	
IPI	15	18	16	5	0.536
低危(0-1因素)	9	13	8	3	
低中危(2因素)	1	3	1	1	
高中危(3因素)	2	2	2	0	
高危(4因素)	3	0	5	1	
B症状	15	18	16	5	0.390
无	10	15	13	5	
有	5	3	3	0	

中心是增生最活跃的部分有关.而Espinosa等<sup>[20]</sup>通过免疫组织化学发现NF- $\kappa$ B p65在DLBCL和正常淋巴结滤泡生发中心中是胞质表达,在正常淋巴结副皮质区是胞核表达.我们认为,NF- $\kappa$ B p65表达部位的不同可能是由于NF- $\kappa$ B在细胞中以两种状态存在,即细胞质内的非活化状态和细胞核内的活化状态,NF- $\kappa$ B p65表达在细胞核上是NF- $\kappa$ B活化的标志,因此观察NF- $\kappa$ B的病理意义,应以出现细胞核内的表达更合适,同李百周等<sup>[21]</sup>观点一致.

Davis等<sup>[5]</sup>发现,ABC-DLBCL细胞株中NF- $\kappa$ B持续活化,I $\kappa$ B激酶(I $\kappa$ B kinase, IKK)活性增强,I $\kappa$ B $\alpha$ 降解加速,而在GCB-DLBCL中未能见到这种情况.同样Lam等<sup>[6]</sup>通过基因表达谱进一步研究发现,高特异性的小分子I $\kappa$ B激酶抑制剂PS-1145和MLX105可以选择性地发挥毒性作用于ABC-DLBCL细胞株,但对GCB-DLBCL却没有影响.本研究通过免疫组织化学在PGI-DLBCL石蜡组织中同样发现NF- $\kappa$ B p65高表达,ABC亚型中NF- $\kappa$ B p65的表达率明显高于GCB亚型

( $P < 0.05$ ), 与王艳君等<sup>[22]</sup>在DLBCL中的研究结果一致. 2008年新的WHO分类也提到NF- $\kappa$ B在ABC亚型中有异常活化, 而GCB亚型中无此现象<sup>[23]</sup>. 在随后的NF- $\kappa$ B p65和临床特征之间的关系研究中我们发现NF- $\kappa$ B p65的表达程度与结外侵犯部位有相关性( $P < 0.05$ ), 据此推测NF- $\kappa$ B p65和PGI-DLBCL的发展和侵袭呈正相关. 而且已有研究表明多部位累及发病可能是部分患者预后差、疾病进展迅速的重要因素<sup>[24]</sup>, 结外浸润病灶愈多预后愈差, 临床分期是影响胃肠道淋巴瘤预后的重要因素, 肿瘤浸润至黏膜、黏膜下层或肌层对患者的长期生存影响不大, 而一旦累及浆膜外组织、邻近淋巴结和组织器官则预后较差. 原发肿瘤直径 $< 5$  cm者预后较好<sup>[25]</sup>. 但本研究并未发现其与临床III/IV期、IPI、出现B症状等有明确的相关性, 与黄忠连等<sup>[26]</sup>、昌红等<sup>[27]</sup>的研究结果不一致. 其原因可能是与PGI-DLBCL的异质性有关, 也与本研究对象住院治疗患者中分布不均有关, 这有待于进一步扩大样本量, 进行进一步判定研究.

本研究经Kaplan-Meier生存分析显示NF- $\kappa$ B p65阳性表达组患者生存期明显低于阴性组( $P < 0.05$ ), 提示NF- $\kappa$ B p65蛋白表达显示预后不良, 可以作为一个很有前途的针对ABC-DLBCL的治疗靶点. 新的免疫化学疗法R-CHOP已成为侵袭性B细胞淋巴瘤新的标准治疗方案, Nakaniishi等<sup>[28]</sup>发现单纯CHOP治疗主要是通过抑制拓扑酶II的活性, 随之导致DNA的断裂而抑制肿瘤细胞增殖和死亡, 而不良反应是增强NF- $\kappa$ B活性, 从而使肿瘤细胞逃避凋亡. Pavan等<sup>[29]</sup>推测利妥昔单抗可能是通过抑制IKK复合物的活性来抑制NF- $\kappa$ B激活, 从而恢复肿瘤化疗药的敏感性. R-CHOP方案在DLBCL治疗上的成功经验正在进一步增长了减少胃肠道DLBCL手术治疗的趋势. 2003年美国FDA首先批准蛋白酶抑制剂硼替佐米用于复发难治性多发性骨髓瘤, 主要通过阻止I $\kappa$ B水解达到抑制NF- $\kappa$ B活化目的. Dunleavy等<sup>[30]</sup>对复发难治性DLBCL采用硼替佐米联合单纯化疗方法, 发现ABC-DLBCL患者可从使用硼替佐米中受益, 可以进一步大样本的临床试验.

NF- $\kappa$ B活性的失调能引起包括肿瘤和炎症在内的很多人类病症, 随着NF- $\kappa$ B抑制细胞凋亡作用机制的研究深入, 并应用于各种疾病的治疗, 人们发现NF- $\kappa$ B在不同的刺激因素及特定的细胞类型中还有促进细胞凋亡的作用<sup>[31]</sup>, 且有学

者发现NF- $\kappa$ B的表达在T淋巴细胞淋巴瘤有好的预后<sup>[32]</sup>, 这可能跟激活的NF- $\kappa$ B亚单位的种类及数量有关<sup>[33]</sup>. NF- $\kappa$ B在PGI-DLBCL发病过程中的信号传导途径和调控的分子基础需要做进一步的研究, 相信以NF- $\kappa$ B为靶点的肿瘤基因治疗及新药开发将为肿瘤治疗的研究开辟一个新领域.

#### 4 参考文献

- van Krieken JH, Otter R, Hermans J, van Groningen K, Spaander PJ, van de Sandt MM, Keuning JF, Kluin PM. Malignant lymphoma of the gastrointestinal tract and mesentery. A clinico-pathologic study of the significance of histologic classification. NHL Study Group of the Comprehensive Cancer Center West. *Am J Pathol* 1989; 135: 281-289
- 王焱, 周晓军, 石群立, 黄文斌, 周航波, 马捷, 陈洁宇, 马恒辉. 原发性胃肠道淋巴瘤的临床病理研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 491-492
- Raderer M, Chott A, Drach J, Montalban C, Dragosics B, Jäger U, Püspök A, Osterreicher C, Zielinski CC. Chemotherapy for management of localised high-grade gastric B-cell lymphoma: how much is necessary? *Ann Oncol* 2002; 13: 1094-1098
- Ferreri AJ, Cordio S, Ponzoni M, Villa E. Non-surgical treatment with primary chemotherapy, with or without radiation therapy, of stage I-II high-grade gastric lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999; 33: 531-541
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1861-1874
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottel M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 28-40
- Dawson IM, Cornes JS, Morson BC. Primary malignant lymphoid tumours of the intestinal tract. Report of 37 cases with a study of factors influencing prognosis. *Br J Surg* 1961; 49: 80-89
- 沈志祥, 石元凯, 朱雄增. 淋巴瘤特殊问题诊治对策. 第1版. 上海: 科学技术出版社, 2009: 227-228
- A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275-282
- Mattern J, Koomägi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 931-934
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw

#### ■同行评价

本文新颖性较好, 对原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤生物靶向治疗和临床有一定指导价值, 有利于提高消化科医师对该病的认识.

- N, Chatsuwan T. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4039-4046
- 14 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132: 344-362
- 15 Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 46-52
- 16 Sclabas GM, Uwagawa T, Schmidt C, Hess KR, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin. *Cancer* 2005; 103: 2485-2490
- 17 Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301-310
- 18 王以浪, 姚登福, 吴玮, 于洪波, 赛文莉, 钱静, 李姗姗, 卞银珠. 肝癌组织核转录因子- $\kappa$ B表达与HBV复制及其临床病理学特征. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 265-269
- 19 Mathas S, Jöhrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F, Janz M, Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Lichter P, Stein H, Scheiderei C, Dörken B. Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 2005; 106: 4287-4293
- 20 Espinosa I, Briones J, Bordes R, Brunet S, Martino R, Sureda A, Sierra J, Prat J. Activation of the NF-kappaB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications. *Histopathology* 2008; 53: 441-449
- 21 李百周, 周晓燕, 陆洪芬, 范月珍, 施达仁. MALT淋巴瘤中bcl-10与NF- $\kappa$ B的表达及其意义探讨. *临床与实验病理学杂志* 2007; 23: 650-652
- 22 王艳君, 孟丹. bcl-2与NF- $\kappa$ B/p65在弥漫性大B细胞淋巴瘤不同亚型中表达的意义. *白血病·淋巴瘤* 2009; 18: 592-595
- 23 WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. The International Agency for Research on Cancer. Lyon: IARC press, 2008: 236
- 24 杨艳丽, 王晶, 赵灵芝, 高子芬, 景洪梅, 克晓燕. 40例原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤临床特征、细胞来源与预后分析. *癌症* 2008; 27: 636-641
- 25 金哈斯, 高春记, 纪小龙. 淋巴瘤诊断与治疗. 第1版. 上海: 科技文献出版社, 2009: 343
- 26 黄志连, 顾康生, 孟刚. Bcl-2与NF- $\kappa$ B p65在弥漫性大B细胞淋巴瘤中的表达及意义. *山东医药* 2007; 47: 3-4
- 27 昌红, 高颖, 王莉, 沈兵, 张建英. 弥漫性大B细胞淋巴瘤组织中核转录因子、血管内皮生长因子的表达及意义. *北京医学* 2008; 30: 536-539
- 28 Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 297-309
- 29 Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 2048-2058
- 30 Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009; 113: 6069-6076
- 31 苏剑东, 吴云飞. NF- $\kappa$ B与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1411-1416
- 32 Martínez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, Ruiz de la Parte A, Roncador G, Alves J, Castrillo JM, Rivas C, Benítez J. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2005; 19: 2254-2263
- 33 Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res* 2003; 63: 1059-1066

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

## EGFR在结直肠癌组织中的表达及其意义

王丽, 余英豪, 刘伟, 王烈, 欧阳学农, 熊喜生

王丽, 余英豪, 刘伟, 熊喜生, 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

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

王丽, 医师, 主要从事肿瘤病理方面的研究。

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: 此课题由余英豪与王丽设计; 技术操作由王丽、刘伟、王烈、欧阳学农及熊喜生完成; 本论文写作由王丽与余英豪完成。

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: 2011-02-20 修回日期: 2011-04-25

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

### Significance of expression of epidermal growth factor receptor in colorectal cancer

Li Wang, Ying-Hao Yu, Wei Liu, Lie Wang, Xue-Nong Ouyang, Xi-Sheng Xiong

Li Wang, Ying-Hao Yu, Wei Liu, Xi-Sheng Xiong, Department of Pathology, 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

Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Research Foundation of the 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 Xihuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2011-02-20 Revised: 2011-04-25

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal cancer and to evaluate its relationship with clinicopathological parameters and prognosis in patients with colorectal cancer.

**METHODS:** A total of 1 228 specimens were collected from patients with colorectal cancer who were treated at Fuzhou General Hospital

of Nanjing Military Command of Chinese PLA from January 2004 to April 2010. Immunohistochemistry was used to detect the expression of EGFR in 1 100 specimens taken from patients who had complete clinical data. Univariate and multivariate analyses were used to study the relationship of EGFR expression with clinicopathological parameters and prognosis in patients with colorectal cancer.

**RESULTS:** The positive rate of EGFR expression was 24.55% (270/1 100). Males had a significantly higher positive rate of EGFR expression than females (27.04% vs 19.01%,  $P = 0.015$ ). Patients with stages III and IV colorectal cancer had a significantly higher positive rate of EGFR expression than other patients (40.74% vs 30.58%,  $P < 0.001$ ). The positive rate of EGFR expression was significantly higher in patients with lymph node or distant metastasis than in those without metastasis (32.10% vs 19.09%,  $P < 0.0001$ ). EGFR expression was not significantly correlated with age, tumor location, invasion depth, differentiation, or overall survival.

**CONCLUSION:** Detection of EGFR protein expression can be used to evaluate the malignant behavior and prognosis of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal cancer; Epidermal growth factor receptor; Immunohistochemistry; Pathology; TNM staging; Prognosis

Wang L, Yu YH, Liu W, Wang L, Ouyang XN, Xiong XS. Significance of expression of epidermal growth factor receptor in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1483-1488

### 摘要

**目的:** 探讨结直肠癌患者肿瘤组织中表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR)过表达与临床病理特征及其预后的关系和意义。

**方法:** 收集2004-01/2010-04在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的结直肠癌组织标本1 228例, 选择其中资料完整的病例1 100例, 采用EliVision™ plus免疫组织化学方

### ■背景资料

我国结直肠癌的发病率呈逐年上升趋势, 近年来, 应用靶向药物治疗结直肠癌取得了重要进展, 在目前抗肿瘤分子靶向治疗中, 表皮生长因子受体(EGFR)是最受关注的治疗靶点之一。

### ■同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学

## ■相关报道

余英豪课题组前期对大宗中国胃癌人群进行了EGFR表达研究,发现该指标对评估胃癌的恶性生物学行为有一定意义。

法检测癌组织EGFR的表达.通过Ridit分析和生存分析判断EGFR表达与各临床病理参数及其预后的关系。

**结果:** 1 100例结直肠癌组织中EGFR阳性表达270例,表达率为24.55%。男性患者阳性表达率明显高于女性(27.04% vs 19.01%,  $P = 0.015$ ), IV期、III期肿瘤患者阳性表达率明显高于其他各期病例(40.74% vs 30.58%,  $P < 0.001$ ),有淋巴结转移者EGFR阳性表达率明显高于无淋巴结转移者(32.10% vs 19.09%,  $P < 0.0001$ ),有远处转移者EGFR阳性表达率明显高于无远处转移者(75.31% vs 20.51%,  $P < 0.0001$ ); EGFR表达与患者年龄、肿瘤部位、肿瘤浸润深度、肿瘤分化程度等均无明显相关性,EGFR表达水平与患者总生存期无明显相关。

**结论:** EGFR检测可以作为评估结直肠癌恶性生物学行为及其预后的参考指标。

**关键词:** 结直肠癌; 表皮生长因子受体; 免疫组织化学; 病理学; TNM分期; 预后

王丽, 余英豪, 刘伟, 王烈, 欧阳学农, 熊喜生. EGFR在结直肠癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1483-1488

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1483.asp>

## 0 引言

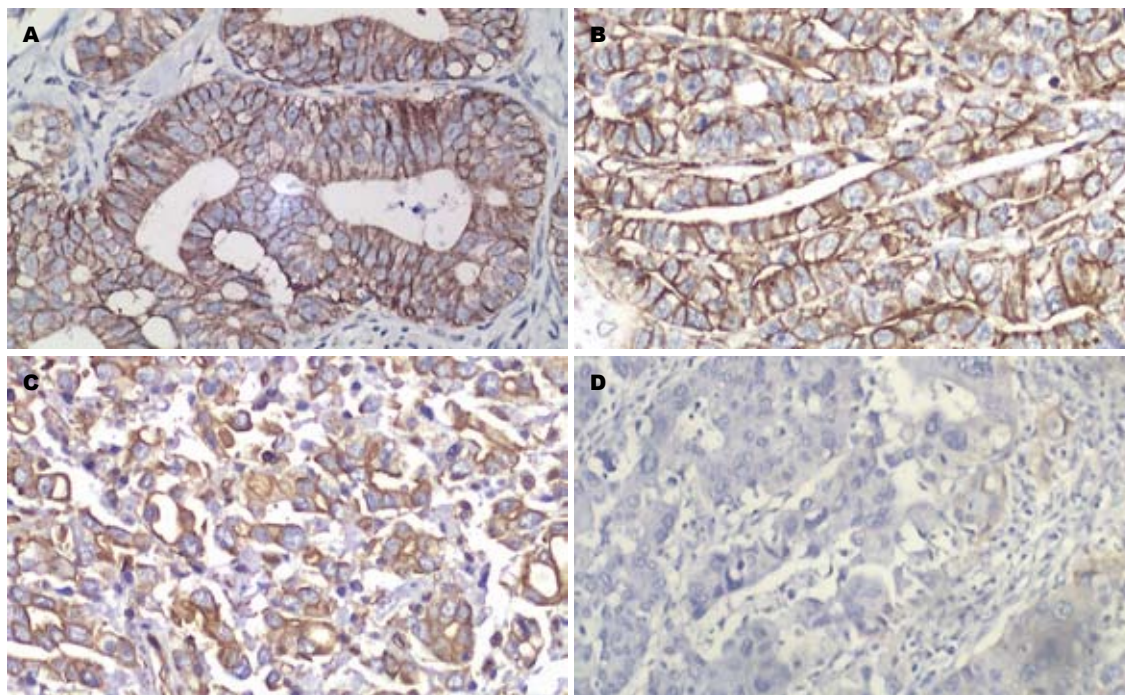
结直肠癌是全球范围内第3位常见的恶性肿瘤,其相关死亡占第4位<sup>[1]</sup>。我国结直肠癌的发病率亦呈逐年上升趋势.手术仍是治疗结直肠癌的主要手段<sup>[2]</sup>,但效果并不理想,近年来,应用靶向药物治疗结直肠癌取得了重要进展,在目前抗肿瘤分子靶向治疗中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是最受关注的治疗靶点之一<sup>[3]</sup>。EGFR是ErbB家族成员,在多种人类肿瘤中高表达,其具有酪氨酸激酶活性,当其与配体结合时,通过激活酪氨酸蛋白激酶途径,可促进肿瘤细胞生长和迁移、肿瘤血管形成及抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[4]</sup>。至今已有许多关于结直肠癌中EGFR蛋白表达的报道,但总体例数均较少,阳性表达率在8%-83%之间<sup>[5,6]</sup>,存在较大的差异,其表达意义也一直有争议<sup>[7,8]</sup>。为此,本研究拟采用EliVision™ plus免疫组化方法对1 100例结直肠癌患者肿瘤标本进行EGFR检测,以期了解EGFR在结直肠癌组织中的表达情况,并分析其与各临床病理参数及其预后的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2004-01/2010-04在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的结直肠癌组织标本1 228例,选择其中资料完整的病例1 100例进行研究,所有病例术前均未经放疗或化疗.1 100例患者中男758例,女342例,年龄17-85(中位年龄51)岁.结肠癌536例,直肠癌564例.按照肿瘤分化程度进行病理学分类:高、中分化者961例,低分化、未分化者139例. TNM分期参照2006版WHO结直肠肿瘤分类及诊断标准: 0期4例, I期190例, II期462例, III期363例, IV期81例.有淋巴结转移者461例.总生存期(overall survival, OS)为患者手术病理确诊直至由于任何原因死亡的时间.在数据截止时尚生存的患者,以其最后1次随访的日期作为截尾数据进行分析.所有组织标本经40 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,3 μm厚连续切片,分别进行HE和免疫组织化学染色.免疫组织化学试剂均购自福州迈新生物技术开发公司,EGFR一抗为鼠抗人单克隆抗体.试剂盒选用EliVision™ plus试剂盒.其他仪器设备:石蜡切片机(LEICA RM2245);全自动免疫组织化学染色仪(德国LEICA公司);显微镜(OLYMPUS BX51);电热恒温干燥箱(上海-恒科技有限公司).所有标记均设阳性对照并用PBS缓冲液代替一抗做阴性对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色方法:** 采用EliVision™ plus法.步骤如下(1)结直肠癌石蜡组织3 μm厚连续切片3张,置于防脱玻片上,将切片放入70 °C烤箱过夜;(2)二甲苯脱蜡2缸10 min; 1 L/L酒精5 min、1 L/L酒精2 min、850 mL/L酒精2 min、700 mL/L酒精2 min水化,过蒸馏水;(3)PBS冲洗3×3 min;(4)采用胃酶进行酶消化抗原修复,在切片上滴加胃酶,置入37 °C水浴箱中15 min;(5)PBS冲洗3×3 min;(6)加3%过氧化氢溶液,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶;(7)PBS冲洗3×3 min;(8)加第一抗体,室温下孵育60 min;阴性对照切片以蒸馏水代替一抗;(9)PBS冲洗3×5 min;(10)加聚合物增强剂(试剂A),室温下孵育20 min;(11)PBS冲洗3×3 min;(12)加酶标抗鼠聚合物(试剂B),室温下孵育30 min;(13)PBS冲洗3×3 min;(14)加新配制的DAB显色液,显微镜下观察3-10 min,阳性显色为棕色;(15)蒸馏水冲洗,苏木素复染,0.1%盐酸分化,蒸馏水冲洗, PBS冲洗返蓝;(16)梯度酒精脱水干燥,中性树脂封片,显微镜下观察。



■创新盘点  
迄今为止本研究属于国内最大宗关于EGFR在结直肠癌患者中表达的病例研究。

图1 EGFR在结直肠癌组织中的表达(Elivision × 400)。A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌; D: 腺癌组织中的阴性表达。

1.2.2 EGFR过表达的判读: 阳性染色呈棕黄色颗粒, 位于细胞膜。根据肿瘤阳性细胞数所占比例分为: 肿瘤细胞不着色<10%的肿瘤细胞着色为(-), 10%-25%(+), 26%-50%(++), 50%-75%(+++), >75%(++++)<sup>[9,10]</sup>。

**统计学处理** 数据采用EXCEL2003进行录入整理, 统计学分析采用SAS9.1软件, 结直肠癌患者EGFR表达与患者临床病理学特征之间的关系统计学方法采用Ridit分析。不同分组之间的生存分析比较采用Log-Rank检验, 双侧检验 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 EGFR蛋白在结直肠癌中的表达 EGFR在不同分化程度的结直肠癌组织中通常为不同程度的棕色膜染色(图1)。所有患者肿瘤组织中EGFR的阳性表达率为24.55%(270/1100), 其中(+)者118例, (++)者77例, (+++)者51例, (++++者)24例。

2.2 EGFR表达与各临床病理参数之间的关系 EGFR表达与患者的性别相关, 男性患者EGFR阳性率为27.04%, 女性患者阳性率为19.01%, 有统计学意义( $H_c = 5.9091, P = 0.0151$ )。EGFR表达与患者的TNM分期亦有显著相关性( $H_c = 32.6849, P < 0.001$ ), IV期、III期患者EGFR阳性率明显高于其他各期, 0期、I期、II期之间差异无统计学意义; 有淋巴结转移者与无淋巴

结转移者EGFR阳性表达差异亦有统计学意义( $H_c = 28.2867, P < 0.001$ ); 手术时有远处转移者EGFR阳性表达明显多于无远处转移者(75.31% vs 20.51%,  $H_c = 152.36, P < 0.001$ )。EGFR表达与年龄, 肿瘤部位, 肿瘤浸润深度, 分化程度等均无明显相关性(表1)。

2.3 EGFR表达与结直肠癌患者生存的关系 本研究最终实际随访人数222例(2005-2009年, 采用随机表随机抽取), 中位随访时间42(12-72) mo。至数据截止时间, 152例患者存活, 70例患者死亡。EGFR阴性组5年生存率57.80%, 中位生存期26 mo; EGFR阳性组5年生存率54.60%, 中位生存期40 mo。EGFR表达水平与患者的总生存期无明显相关( $\chi^2 = 2.918, P = 0.088$ , 图2)。

## 3 讨论

TNM分期至今仍是结直肠癌最重要的临床病理学预后因子, 也是目前临床进行辅助放化疗的主要依据。然而, 结直肠癌又是一类个体化差异明显的疾病,  $T_3, T_4N_0M_0$ 结直肠癌患者术后局部复发和远处转移者占20%-30%, 而其余大部分患者可以达到临床治愈;  $T_3, T_4N_1M_0$ 结直肠癌患者术后局部复发和远处转移者高达50%-80%, 但也有少部分患者可以通过手术和术后化疗达到临床治愈<sup>[11]</sup>。因此, 进一步了解结直肠癌患者肿瘤细胞的分子生物学行为, 可能有助于判断

## ■应用要点

本研究采用EliVision™ plus免疫组织化学方法对1 100例结直肠癌患者肿瘤标本进行EGFR检测,以期了解EGFR在结直肠癌组织中的表达情况,并分析其与各临床病理参数及其预后的关系。

表 1 EGFR表达与结直肠癌患者临床病理参数的关系

临床病理参数	n	-	+	++	+++	++++	EGFR阳性率(%)	Hc值	P值
性别							24.55		
男	758	553	97	61	32	15	27.04	5.9091	0.0151
女	342	277	21	16	19	9	19.01		
年龄(岁)									
<60	559	432	33	37	45	12	22.72	0.0307	0.8609
≥60	541	398	85	40	6	12	26.43		
肿瘤部位									
结肠	536	414	35	40	31	16	22.76	0.3779	0.5387
直肠	564	416	83	37	20	8	26.24		
浸润深度									
Tis+T <sub>1</sub>	14	10	2	0	1	1	28.57	3.3394	0.3422
T <sub>2</sub>	227	165	28	13	15	6	27.31		
T <sub>3</sub>	795	611	77	62	29	16	23.14		
T <sub>4</sub>	64	44	11	2	6	1	31.25		
分化程度									
高、中分化	961	730	107	56	49	19	24.04	1.3667	0.2424
低、未分化	139	100	11	21	2	5	28.06		
TNM分期									
0	4	3	0	0	0	1	25.00	32.6849	<0.0001
I	190	153	23	5	6	3	19.47		
II	462	374	32	37	13	6	19.05		
III	363	252	55	31	17	8	30.58		
IV	81	48	8	4	15	6	40.74		
淋巴转移									
N <sub>0</sub>	639	517	57	37	19	9	19.09	28.2867	<0.0001
N <sub>1</sub>	298	209	40	16	25	8	29.87		
N <sub>2</sub>	163	104	21	24	7	7	36.20		
远处转移									
M <sub>0</sub>	1 019	810	105	67	27	10	20.51	152.3555	<0.0001
M <sub>1</sub>	81	20	13	10	24	14	75.31		
预后	222								
存活	152	110	14	18	6	4	27.63	0.2461	0.6198
死亡	70	48	8	10	2	2	31.43		

患者的预后. 有研究揭示, EGFR的过度表达或异常激活常引起细胞恶性转化, 与结直肠癌的发生、发展、恶性程度及预后等密切相关<sup>[12,13]</sup>.

余英豪课题组前期对大宗中国胃癌人群进行了EGFR表达研究, 发现该指标对评估胃癌的恶性生物学行为有一定意义<sup>[14]</sup>. 本研究主要目的是通过免疫组织化学方法检测结直肠癌患者EGFR表达情况, 希望籍大宗病例研究以更准确揭示EGFR表达水平与中国结直肠癌患者临床病理参数间的关系, 为临床判断预后和指导治疗提供依据. 研究发现在所有1 100例中国结直肠癌人群中, EGFR的阳性表达率为24.55%, 与以往所报道的EGFR阳性表达率8%-83%<sup>[5,6]</sup>之间有一定的差异. 国内外的多项研究表明, EGFR

表达水平与患者年龄、性别、肿瘤生长部位、浸润深度、大体形态、组织学类型、分化程度无明显相关性<sup>[15-17]</sup>, 而与结直肠癌TNM分期和淋巴转移相关<sup>[18,19]</sup>, 揭示EGFR阳性的肿瘤可能具有更强的分裂增生及浸润性, 其高表达与肿瘤的高侵袭转移性有关, 可作为判断结直肠癌进展和预后的指标<sup>[20]</sup>. 本研究结论与其亦略有差异, EGFR表达与性别相关, 男性明显高于女性, 其差别有统计学意义, 这是否与结直肠癌男性发病率本身高于女性相关尚有待研究; 而EGFR的表达与年龄、肿瘤发生部位、肿瘤浸润深度、肿瘤分化程度无显著相关性, 与TNM分期、淋巴结转移及远处转移有显著相关性, EGFR表达水平与患者的总生存期亦无明显相

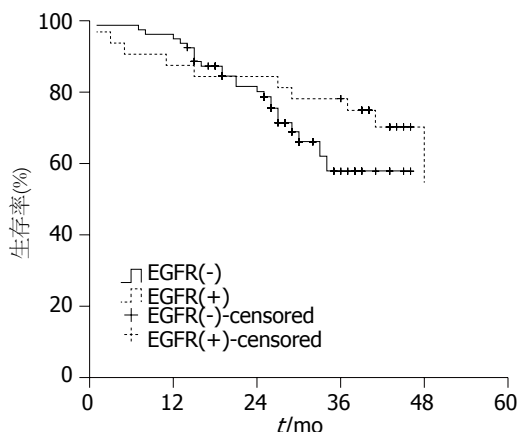


图 2 结直肠癌EGFR表达与患者生存的关系。

关, 这与以往研究相同。

结直肠癌作为一种消化系常见肿瘤, 对其预后的判断是一个复杂的问题, 尽管EGFR蛋白表达的高低不能有效预测患者的预后, 甚至有研究表明亦不能指导临床抗EGFR分子靶向药物的应用<sup>[21]</sup>, 但是EGFR在肿瘤的增殖和进展方面的作用仍十分重要。近年来, EGFR已经成为结直肠癌靶向治疗的重要靶点, 尤其西妥昔单抗和帕尼单抗的临床应用更证实了EGFR在结直肠癌发生和发展中的重要作用。EGFR可以在蛋白和基因水平进行检测, 迄今为止, 绝大多数研究在蛋白水平检测EGFR表达与靶向药物的疗效缺乏一致性, 因此引发了许多学者进一步在基因水平上检测肿瘤组织中EGFR的变化以及EGFR下游信号转导途径的改变等, 揭示了诸如 *k-ras* 等基因突变与靶向药物疗效、患者临床病理参数及预后之间的关系。本课题组已展开对结直肠癌组织EGFR蛋白高表达与EGFR基因突变、*k-ras* 基因突变间关系的深入研究<sup>[22]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165
- 2 Goodwin RA, Asmis TR. Overview of systemic therapy for colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22: 251-256
- 3 Barozzi C, Ravaioli M, D'Errico A, Grazi GL, Poggioli G, Cavrini G, Mazzotti A, Grigioni WF. Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma: a comparative study of a broad panel. *Cancer* 2002; 94: 647-657
- 4 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664

- 5 Mehra R, Cohen RB, Burtness BA. The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6: 742-750
- 6 Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004; 17: 895-904
- 7 Kopp R, Rothbauer E, Mueller E, Schildberg FW, Jauch KW, Pfeiffer A. Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor receptor levels. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1391-1399
- 8 Li S, Kim JS, Kim JM, Cho MJ, Yoon WH, Song KS, Yeo SG, Kim JS. Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 705-712
- 9 Bhargava R, Chen B, Klimstra DS, Saltz LB, Hedvat C, Tang LH, Gerald W, Teruya-Feldstein J, Paty PB, Qin J, Shia J. Comparison of two antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in colorectal carcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Cancer* 2006; 106: 1857-1862
- 10 Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grøvdal L, Willumsen BM, van Deurs B. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic* 2009; 10: 1115-1127
- 11 李月敏, 徐建明, 廖国清, 李晓兵, 王岩, 李明颖, 曹阳, 李志强, 葛飞娇. EGFR在结直肠癌组织中的表达及其临床意义. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2007; 14: 377-380
- 12 Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 25-79
- 13 Casanova ML, Larcher F, Casanova B, Murillas R, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Martínez-Palacio J, Ullrich A, Conti CJ, Jorcano JL. A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 3402-3407
- 14 刘伟, 余英豪, 陈娟, 熊喜生, 欧阳学农, 王烈, 武一曼. EGFR在中国胃癌患者中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2648-2653
- 15 杨树钢, 叶建新. DCR3和EGFR在结直肠癌中的表达及临床意义. *中国医药导报* 2009; 6: 30-32
- 16 Deng Y, Kurland BF, Wang J, Bi J, Li W, Rao S, Lan P, Lin T, Lin E. High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor. *Am J Clin Oncol* 2009; 32: 245-252
- 17 梁君林, 万德森, 潘志忠, 周志伟. Dukes'A、B期结直肠癌c-erbB-2, EGFR和TGF- $\alpha$ 表达与复发转移的关系. *癌症* 2007; 26: 647-651
- 18 侍立志, 王兆春. EGF, EGFR和PCNA表达与大肠癌临床病理学特征及关系. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 253-256
- 19 李峰, 严家芹, 陈壬寅, 赵国强, 李晟磊, 曹娟娟. EGFR基因单核苷酸多态性与结直肠癌的相关性. *山东医药* 2009; 49: 4-6
- 20 王丽霞, 肖彦增, 殷卫东. C-erbB-2和EGFR在大肠癌中过表达及意义. *肿瘤研究与临床* 2003; 15: 314-316
- 21 Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer

■同行评价  
本文具有较高的实用性和可读性, 有较好的学术价值。

RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma

refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-4921  
22 王丽, 余英豪. 结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19: 62-67

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 •

### 《世界华人消化杂志》出版流程

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

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

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

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

# μ型阿片受体与炎症性肠病

王建发, 付守鹏, 刘英, 王茂鹏, 王清敬, 柳巨雄, 王玮

王建发, 付守鹏, 刘英, 王茂鹏, 王清敬, 柳巨雄, 王玮, 吉林大学畜牧兽医学院 吉林省长春市 130062  
国家自然科学基金青年基金资助项目, No. 30901057  
作者贡献分布: 本文综述由王建发、付守鹏、刘英及王茂鹏共同撰写; 柳巨雄与王玮审校。  
通讯作者: 王玮, 讲师, 130062, 吉林省长春市西安大路5333号, 吉林大学畜牧兽医学院. wangwei@jlup.edu.cn  
电话: 0431-87836163  
收稿日期: 2010-11-23 修回日期: 2011-04-27  
接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Mu opioid receptor and inflammatory bowel disease

Jian-Fa Wang, Shou-Peng Fu, Ying Liu, Mao-Peng Wang, Qing-Jing Wang, Ju-Xiong Liu, Wei Wang

Jian-Fa Wang, Shou-Peng Fu, Ying Liu, Mao-Peng Wang, Qing-Jing Wang, Ju-Xiong Liu, Wei Wang, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901057

Correspondence to: Wei Wang, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, 5333 Xi'an Road, Changchun 130062, Jilin Province, China. wangwei@jlup.edu.cn

Received: 2010-11-23 Revised: 2011-04-27

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

The mu opioid receptor (MOR), a member of G protein-coupled receptors, plays a pleiotropic role in various physiological and pathological processes, such as pain, inflammation, and immune modulation. MOR is expressed abundantly in both central and peripheral tissues and plays a significant role in peristalsis and secretion. It has been documented that MOR agonists are potentially valuable agents for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). This paper will explore the link between MOR and IBD, aiming at providing a theoretical basis for future development of new treatments for IBD.

Key Words: Mu opioid receptor; Inflammatory bowel disease; Neuroendocrine-immune regulation

Wang JF, Fu SP, Liu Y, Wang MP, Wang QJ, Liu JX, Wang W. Mu opioid receptor and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1489-1493

## 摘要

μ型阿片受体(mu opioid receptor, MOR)作为G蛋白偶联受体的成员之一,在疼痛传递、炎症过程、免疫调节等多种生理及病理反应中发挥重要作用。MOR在中枢和外周都有大量表达,在胃肠道中主要分布于肠道淋巴细胞、肠肌层及黏膜下神经元中,对肠道蠕动、分泌功能都有重要作用。一些动物实验和体外实验结果表明MOR的激动剂在治疗炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)方面具有重要的潜在价值,已经成为治疗IBD的一种新靶点。本文对MOR的功能及其与IBD的潜在联系进行了综述,为深入研究治疗IBD的新途径提供理论依据。

关键词: μ型阿片受体; 炎症性肠病; 神经-内分泌-免疫调节

王建发, 付守鹏, 刘英, 王茂鹏, 王清敬, 柳巨雄, 王玮. μ型阿片受体与炎症性肠病. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1489-1493

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1489.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是近年来在我国及欧美诸多国家极为普遍的一种自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),以肠道炎症和肠黏膜损伤为主要特征。临床上以腹痛、腹泻、便血、多次排便等为主要症状,其病因由遗传、免疫、环境及黏膜屏障等多种因素协同构成。其中肠道局部神经内分泌免疫调控网络的稳态对于IBD发生发展中起着重要作用。阿片肽是一类具有吗啡样活性的内源性活性物质,在化学结构上属于肽类,因此,称他们为内源性阿片肽。主要分为3大家族:脑啡肽、内啡肽和强啡肽。目前所知的内源性阿片肽绝大部分可归入下列3个前体系统,即前脑啡肽系统、新内啡肽-强啡肽系统和前阿黑皮素系统。脑啡肽来自前脑啡肽系统,β-内啡肽来自前阿黑皮素系统,强啡肽来自新内

## ■背景资料

炎症性肠病是一种以腹痛、便血为特征的多因素引起的肠道疾患,在中国近十年的患病率成快速增长的趋势,严重影响人们的正常生活。作为一种危害严重的胃肠道疾病,其发病机制已成为研究热点,具有潜在性治疗价值的新靶点不断被发现,μ型阿片肽受体就是其中很重要的一种。

## ■同行评议者

夏冰, 教授, 武汉大学中南医院消化内科

## ■研发前沿

利用吗啡等阿片肽类药物治疗炎症性肠病的案例国内外都有报道,但对药物的依赖性使这种治疗方法不能广泛应用。因此,究竟 $\mu$ 型阿片肽受体在炎症性肠病中发挥怎样作用成为科研工作者的研究热点。

啡肽-强啡肽系统<sup>[2,3]</sup>。阿片受体属G蛋白偶联受体,包括 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 和OFQ 4类,其中 $\mu$ 型阿片肽受体(mu opioid receptor, MOR)在体内的广泛分布,并在疼痛传递、炎症过程、免疫调节等多种生理反应中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>,而这3种生理过程,都直接与IBD的发生发展有关,并且已经有利用阿片肽类药物缓解IBD患者病痛和治疗疾病的先例,所以MOR与IBD存在必然联系。本文拟对二者的关系做简要阐述,希望对深入研究治疗IBD的新策略提供帮助。

## 1 阿片肽功能及调控

**1.1 镇静止痛作用** 阿片类物质的主要作用是缓解疼痛。内啡肽对不同损伤大鼠痛觉反应模型具有类似的抑制痛觉作用,脑室注射(i.c.v.)或鞘内注射(i.t.)均可产生强效的镇痛作用。他们的镇痛作用与吗啡相当, MOR阻断剂 $\beta$ -富马纳曲酮( $\beta$ -funaltrexamine,  $\beta$ -FNA)和纳洛酮能够阻断内啡肽的这种作用<sup>[6]</sup>。阿片肽对 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 和OFQ 4类阿片肽受体亲和力和具有一定的选择性,通过啮齿类动物脑膜及重组受体提取物的结合实验研究发现,吗啡在体外优先选择MOR, Ki值在nmol/L数量级,对 $\delta$ 、 $\kappa$ 受体亲和性则接近 $\mu$ mol/L数量级<sup>[7]</sup>。在MOR基因敲除小鼠中,内啡肽丧失了镇痛作用<sup>[8-10]</sup>,说明内啡肽的镇痛作用是由MOR介导的。内啡肽作为突触前或突触后MOR内源性配基起着调节痛觉的作用。在体内(主要在脑中),阿片肽通过与中枢上分布的MOR高效特异结合实现其介导麻醉、呼吸抑制、成瘾等作用。实验证明,无论是吗啡镇痛、脑刺激镇痛或针刺镇痛都激活了以阿片肽系统为主要中介的内源性痛觉调制系统<sup>[11]</sup>。但是从近年来发现的孤啡肽系统来看,阿片肽在痛觉调制中也存在着双重的作用<sup>[12]</sup>。

**1.2 免疫调节作用** 证明免疫细胞表面存在MOR的方法主要包括功能性研究、受体-配体结合实验、分子生物学研究、组织化学研究等。吗啡能增加感染大鼠的死亡率,并能抑制自然杀伤细胞的溶细胞活动和丝裂原诱导的增殖反应。有证据表明吗啡通过调节IL-1 $\beta$ -依赖性通路来影响脑-免疫系统轴。在体实验长期慢性给予吗啡可减弱淋巴细胞的增殖反应,自然杀伤细胞的细胞毒性以及抗体和血清溶血素的形成。而吗啡的受体主要是MOR,说明MOR存在于自然杀伤细胞、淋巴细胞等免疫细胞表面。Sedqi等首先于1995年报道了小鼠腹膜巨噬细胞存在有

MOR mRNA<sup>[13]</sup>, Chuang等<sup>[14]</sup>报道了在T、B淋巴细胞, CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞, 单核细胞中存在有MOR mRNA。李雪等应用免疫组织化学技术检测了80例淋巴组织冰冻切片中MOR、脑啡肽受体,和强啡肽受体的表达情况,证实在人类免疫系统的细胞上表达有阿片肽受体,其中MOR在脾脏、淋巴结、肠黏膜腺体及肠黏膜下淋巴组织均有表达,阿片肽类神经肽通过受体与配体结合的直接作用方式对免疫功能起调节作用<sup>[15]</sup>。

通过体外研究已经证实外源性阿片肽(如鸦片)和MOR抑制剂(例如纳洛酮)可以调控促细胞分裂原诱导的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)和脾细胞增殖,还可以调控NK细胞活性,产生炎症性和免疫调节类细胞因子。在自身免疫性疾病和炎症性疾病的动物模型中MOR也具有调控免疫功能的作用<sup>[2,16]</sup>。除此以外,研究表明阿片肽类物质作为一种神经递质,可以诱发巨噬细胞表面表达大量的MOR,分泌更多白介素-6,通过破坏TLR-9-NF- $\kappa$ B信号通路,抑制巨噬细胞的吞噬能力,下调机体抵御外源性物质的能力,增加了细菌扩布的可能性<sup>[17-19]</sup>。由此可见,阿片类物质与MOR结合后可引起免疫调节作用和信号传导通路的激活,在免疫调节过程中具有重要作用。

**1.3 植物性神经作用** 阿片类药物具有呼吸抑制、便秘和嗜睡等不良反应。机体的内源性阿片肽参与机体的一系列植物性神经功能的调节,包括心血管活动、消化活动和体温调节等。应该指出,许多经典递质(包括交感神经及副交感神经的主要递质去甲肾上腺素、乙酰胆碱等)都是调节植物性神经功能的主要活性物质。但是阿片系统也是参与调节的一种因素。这种调节功能在正常生理状态时,作用一般不很明显,但在异常状态下(如因创伤、缺氧和疼痛引起应激时)可能具有重要的病理生理意义<sup>[20-22]</sup>。

**1.4 影响阿片肽功能的主要因素** 采纳洛酮是 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 型阿片受体竞争性拮抗剂而无激动活性,与阿片受体的亲和力大于吗啡和脑啡肽,能竞争性地阻断阿片样物质和内源性阿片肽介导的各种效应<sup>[23]</sup>。其主要机制为通过药理伴随作用(pharmacological chaperones act)以稳定阿片受体前体,调控其生物功能。Leskela等<sup>[24]</sup>通过对HEK293细胞用四环素和布雷非得菌素A(brefeldin A)共同处理,阻止其内质网运输,分离位于内质网上的 $\delta$ 型阿片受体前体,发现该前体可以与3H-二丙诺啡[(3H)diprenorphine]高度

## ■相关报道

E. Sienkiewicz-Szapka等通过 $\mu$ 型阿片肽受体介导的类阿片肽在caco-2单层细胞的转移实验,证明了阿片肽类药物治疗炎症性肠病的口服应用前景,并为后续的机制研究奠定基础。

亲和, 与纳曲酮结合位点数量增加两倍。

## 2 MOR与IBD的联系

IBD是一种在我国及欧美等诸多国家极为普遍的慢性胃肠道疾病。目前认为IBD的发病机制涉及遗传、环境、微生物、黏膜屏障、内环境和神经-内分泌-免疫调控网络等多个方面。发病过程主要是刺激因子作用于遗传易感者导致其体内肠道菌群种类和数量发生变化, 从而引起肠道微环境的改变, 诱发肠道免疫系统和非免疫系统启动免疫反应和炎症反应, 最终表现出腹痛、腹泻、便血等临床症状。可见IBD与免疫系统的激活及免疫细胞产物之间的关系非常密切<sup>[25,26]</sup>。

在高等动物及人类机体中, 神经系统、内分泌系统及免疫系统是控制机体生理功能的3大调节系统。而阿片肽则是全面参与这3大系统调节功能的重要因素。阿片肽除了作为神经递质或调质参与中枢神经功能的调节之外, 阿片肽还对下丘脑-垂体-内分泌腺体的多条途径具有一定的影响, 其中 $\beta$ -内啡肽的影响最为明显。阿片肽作为神经系统与免疫系统相联系的一种中介物质, 其在调节神经-内分泌-免疫网络与机体免疫稳态方面的作用受到越来越多的研究人员的重视, 已经成为许多疾病研究的新靶点。鉴于鸦片酊能通过位于中枢神经系统中的MOR配体调节肠道蠕动功能, 对急慢性肠炎具有镇痛和治疗作用, 并且随着研究的不断深入, 在肠道周围组织(如肠道隐窝上皮细胞)中也发现有MOR存在, MOR在治疗IBD中的潜在作用受到了很多学者的关注<sup>[27-29]</sup>。

2003年Philippe采用在三硝基苯磺酸(TNBS)或外周扩增CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞诱导的结肠炎模型小鼠皮下注射MOR激动剂和抑制剂的方式研究了MOR在调控肠炎方面的作用。结果证实, 注射阿片肽抑制剂纳洛酮后能极大程度上降低结肠炎的药物治疗效果; MOR基因敲除鼠对TNBS诱导的结肠炎的易感性明显提高, 在造模后第3天的死亡率可达50%; 注射MOR的激动剂DALDA, 可以显著下调结肠黏膜内炎症前细胞因子TNF- $\alpha$  mRNA的表达, 从而减轻肠道内的炎症损伤<sup>[30]</sup>。该课题组还利用Real time RT-PCR的方法对IBD患者的小肠和结肠病理样本进行MOR mRNA的检测, 发现无论CD或是UC样品中, 炎性结肠MOR mRNA含量相对正常组织和非炎结肠组织均有明显提高, 并且发现MOR主

要在回肠和结肠神经元以及免疫细胞和骨髓细胞表达; MOR过表达主要通过调控TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 来影响IBD的发病机制; 细胞因子可以促进MOR在肠道调控功能, 淋巴细胞和骨髓细胞的NF- $\kappa$ B能抑制MOR在肠道的调控功能<sup>[31]</sup>。Monica等研究证实, 在IBD转为慢性时期, 结肠部位T淋巴细胞浸润, MOR表达升高,  $\beta$ -内啡肽表达增多, 从而提高痛觉传入神经纤维痛阈, 使炎症部位产生痛觉缺失。证明MOR是炎症过程中炎症部位与中枢神经系统进行信号传递的通路之一<sup>[32]</sup>。

调节性T淋巴细胞是一类具有免疫调节功能的T细胞亚群, 在转录因子Foxp3、Janus激酶-信号转导和转录激活子(JAK-STAT)等细胞内信号机制介导下, 可通过直接接触和细胞因子依赖等方式下调机体免疫反应, 维持自身免疫耐受, 在IBD的发生发展中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。IBD患者肠黏膜固有层下肠相关淋巴组织(gut associated lymphoid tissue, GALT)内的淋巴细胞、单核细胞及NK细胞数量明显降低, 由其产生的细胞因子种类和数量也发生变化, 导致致炎因子和抗炎因子之间的平衡被打破, 加重了疾病危害<sup>[34]</sup>。MOR激动剂也能调控GALT中调节性细胞的增殖, 影响NK细胞的活性, 对缓解IBD症状具有一定的作用<sup>[31]</sup>。

根据本研究室最近的研究结果来看, 在TNBS诱导的炎症性肠病大鼠模型中, 动物模型建造后第3-7天为临床症状显著期, 表现为稀便、血便, 里急后重, 被毛粗乱, 剖检常见肠管瘀血、坏死和粘连。利用Real-time PCR的方法, 对结肠组织、外周血淋巴细胞和胸腺等进行MOR mRNA含量检测, 发现后两者在7 d变明显的MOR表达量增加, 而结肠组织表现出MOR mRNA的减少, 可见MOR与IBD具有显著的相关性。

## 3 结论

IBD是一种由多因素引起的自身免疫病, MOR在机体内广泛分布, 在神经内分泌和免疫方面调节着这一疾病的发生发展过程。MOR激动剂在治疗IBD方面的潜在作用也已经得到证实<sup>[24]</sup>。但MOR在调控细胞因子和免疫细胞增殖方面的精确信号通路, 不同部位的MOR在IBD发生发展不同阶段中扮演的角色, 不同类型MOR激动剂在缓解IBD病情方面的效果等问题仍然需要进行深入探讨。相信随着研究的进一步深入, MOR与IBD的关系将会进一步被揭示, 从而为

### ■创新盘点

本文详细阐述了 $\mu$ 型阿片受体与炎症性肠病的相关性, 简要解读了二者关系的机制性问题, 并为后续研究提供良好素材。

### ■应用要点

本文包含了μ型阿片肽受体与炎症性肠病的相关研究,为潜在治疗性靶点的广泛应用提供理论支持。

在IBD发展的哪个阶段,选择什么类型、使用多大剂量的MOR激动剂进行IBD治疗提供更科学的决策。

### 4 参考文献

- Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 5S-11S
- 张建辉, 庞广昌. 阿片肽的研究进展与展望. *食品科学* 2006; 27: 823-829
- 王玉秀, 童昭岗, 胡海青. 内源性阿片肽系统免疫调节功能的研究进展. *中国临床康复* 2003; 7: 1558-1559
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghuram R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 567-592
- Chapman CR, Tuckett RP, Song CW. Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain* 2008; 9: 122-145
- 毋维敏. 内源性阿片肽内啡肽与天然多酚类化合物咖啡酸苯乙酯的药理学活性研究. 兰州大学 2007: 1-106
- 孟爱民, 刘景生. 阿片受体功能研究进展. *中国神经免疫学和神经病学杂志* 2002; 9: 180-182
- Goldberg IE, Rossi GC, Letchworth SR, Mathis JP, Ryan-Moro J, Leventhal L, Su W, Emmel D, Bolan EA, Pasternak GW. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1007-1013
- Mizoguchi H, Narita M, Oji DE, Suganuma C, Nagase H, Sora I, Uhl GR, Cheng EY, Tseng LF. The mu-opioid receptor gene-dose dependent reductions in G-protein activation in the pons/medulla and antinociception induced by endomorphins in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 1999; 94: 203-207
- Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN. mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 54: 321-326
- Iwan M, Jarmołowska B, Bielikowicz K, Kostyra E, Kostyra H, Kaczmarek M. Transport of micro-opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 2008; 29: 1042-1047
- Guan JS, Xu ZZ, Gao H, He SQ, Ma GQ, Sun T, Wang LH, Zhang ZN, Lena I, Kitchen I, Elde R, Zimmer A, He C, Pei G, Bao L, Zhang X. Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 2005; 122: 619-631
- Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH. Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 563-574
- Chuang TK, Killam KF Jr, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 922-930
- 李雪. 免疫系统来源的细胞中阿片肽受体的检测. 青岛大学 2002: 1-52
- De Carolis C, De Sanctis G, Perricone R, Moretti C, Fabbri A, Gnassi L, Fraioli F, Fontana L. Evidence for an inhibitory role of beta-endorphin and other opioids on human total T rosette formation. *Experientia* 1984; 40: 738-739
- Tomassini N, Renaud FL, Roy S, Loh HH. Mu and delta receptors mediate morphine effects on phagocytosis by murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 9-16
- Wang J, Barke RA, Charboneau R, Schwendener R, Roy S. Morphine induces defects in early response of alveolar macrophages to Streptococcus pneumoniae by modulating TLR9-NF-kappa B signaling. *J Immunol* 2008; 180: 3594-3600
- Wang J, Barke RA, Ma J, Charboneau R, Roy S. Opiate abuse, innate immunity, and bacterial infectious diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; 56: 299-309
- Sakaguchi M, Murayama K, Jinsmaa Y, Yoshikawa M, Matsumura E. Neurite outgrowth-stimulating activities of beta-casomorphins in Neuro-2a mouse neuroblastoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 2541-2547
- Pérez-Castrillón JL, Olmos JM, Gómez JJ, Barrallo A, Riancho JA, Perera L, Valero C, Amado JA, González-Macías J. Expression of opioid receptors in osteoblast-like MG-63 cells, and effects of different opioid agonists on alkaline phosphatase and osteocalcin secretion by these cells. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 187-194
- Wollemann M, Benyhe S. Non-opioid actions of opioid peptides. *Life Sci* 2004; 75: 257-270
- Sacerdote P, Gaspari L, Panerai AE. The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in normal and skin-grafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 755-763
- Leskelä TT, Markkanen PM, Pietilä EM, Tuusa JT, Petäjä-Repo UE. Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007; 282: 23171-23183
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- Turnberg LA. Antisecretory activity of opiates in vitro and in vivo in man. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1983; 84: 79-83
- Valle L, Puig MM, Pol O. Effects of mu-opioid receptor agonists on intestinal secretion and permeability during acute intestinal inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 389: 235-242
- Sun WM, Read NW, Verlinden M. Effects of loperamide oxide on gastrointestinal transit time and anorectal function in patients with chronic diarrhoea and faecal incontinence. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 34-38
- Philippe D, Dubuquoy L, Groux H, Brun V, Chuoï-Mariot MT, Gaveriaux-Ruff C, Colombel JF, Kieffer BL, Desreumaux P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest* 2003; 111: 1329-1338
- Philippe D, Chakass D, Thuru X, Zerbib P, Tsicopoulos A, Geboes K, Bulois P, Breisse M, Vorng H, Gay J, Colombel JF, Desreumaux P, Chamaillard M. Mu opioid receptor expression is increased in inflammatory bowel diseases: implications for homeostatic intestinal inflammation. *Gut* 2006; 55: 815-823

32 Verma-Gandhu M, Verdu EF, Bercik P, Blennerhassett PA, Al-Mutawaly N, Ghia JE, Collins SM. Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut* 2007; 56: 358-364

33 何相宜, 陈维雄. 调节性T细胞在炎症性肠病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3015-3019

34 任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3178-3180

■同行评价  
本文有助于读者了解 $\mu$ 型阿片受体激动剂在治疗炎症性肠病方面的重要的潜在价值, 但内容较简单.

编辑 曹丽鸥 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 •

### 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.

# 青藤碱对炎症性肠病中肠道免疫炎症影响的研究进展

田亮, 傅颖珺, 谢勇

## ■背景资料

炎症性肠病是一种原因不明的非特异性肠道免疫炎症性疾病, 包括克罗恩病和溃疡性结肠炎, 其发病多与遗传、环境及免疫反应异常有关。目前免疫因素已经成为炎症性肠病的发病机制与治疗研究中的关键点。但在药物治疗上仍采取传统的氨基水杨酸类、激素及免疫抑制剂为主, 由于药物的不敏感以及不良反应使治疗受到了一定的限制。

田亮, 谢勇, 南昌大学第一附属医院消化研究所 江西省南昌市 330006

田亮, 傅颖珺, 南昌大学医学院药理学系 江西省南昌市 330006  
作者贡献分布: 本文综述由田亮完成; 傅颖珺与谢勇审校。

通讯作者: 谢勇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化研究所。

xieyong\_med@163.com

电话: 0791-8692507

收稿日期: 2011-02-16 修回日期: 2011-04-21

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Advances in understanding the effect of sinomenine on intestinal immune inflammation in inflammatory bowel disease

Liang Tian, Ying-Jun Fu, Yong Xie

Liang Tian, Yong Xie, Institute of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Liang Tian, Ying-Jun Fu, Department of Pharmacy, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Xie Yong, Institute of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. xieyong\_med@163.com

Received: 2011-02-16 Revised: 2011-04-21

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

Intestinal immune inflammatory response is abnormal in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Control of intestinal immune inflammatory response represents one of the methods for treatment of IBD. It has been proved that sinomenine (SN) can inhibit lymphocyte proliferation, regulate immune cell function, reduce inflammation mediator production, modulate cytokine secretion, and thereby suppress the immune inflammatory response. This article gives an overview of the role of the immune response in the pathogenesis of IBD and summarizes the recent advances in understanding the effect of SN on intestinal immune inflammation in IBD, seeking to provide a new reference for the treatment of IBD.

Key Words: Sinomenine; Inflammatory bowel disease; Intestinal immunity

Tian L, Fu YJ, Xie Y. Advances in understanding the effect of sinomenine on intestinal immune inflammation in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1494-1499

## 摘要

炎症性肠病(IBD)患者肠道免疫炎症反应异常, 影响和调控肠道免疫炎症反应是其治疗方法之一。现已证明青藤碱(SN)可以通过抑制淋巴细胞增殖, 影响免疫细胞功能, 减少炎症介质生成, 平衡细胞因子的分泌等多个环节来抑制机体免疫炎症反应。本文从IBD免疫发病机制入手, 总结了目前SN对机体免疫功能影响方面的研究进展, 为寻求SN调控肠道免疫炎症来治疗IBD提供参考。

关键词: 青藤碱; 炎症性肠病; 肠道免疫

田亮, 傅颖珺, 谢勇. 青藤碱对炎症性肠病中肠道免疫炎症影响的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1494-1499

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1494.asp>

## 0 引言

青藤碱(sinomenine, SN)为防己科防己属植物青风藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的生物碱单体。它具有抗炎、抑制细胞和体液免疫、清除活性自由基等药理作用。临床上利用SN在治疗肾病、类风湿性关节炎、红斑狼疮等机体免疫相关性疾病取得了较好的疗效<sup>[1]</sup>。因此关于SN免疫药理学研究也是当前的研究热点。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的累及胃肠道的慢性炎症疾病, 他包括溃疡性结肠炎(ulcer colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。其发病机制可能为感染、饮食等环境因素作用于遗传易感人群, 使之肠免疫反应过度亢进导致肠黏膜受损。SN作为一种免疫抑制药能通过抑制淋巴细胞增殖、分化和影响淋巴细胞的功能来抑制机体免疫反应, 在平衡机体免疫功能方面有西药不可比拟的作用。本文就近年来关于SN调节机体免疫功能和IBD的肠道免疫发病机制作一综述。

## ■同行评议者

李晓波, 教授, 上海交通大学药学院

## 1 IBD患者肠道免疫炎症的异常

1.1 免疫异常 肠道的免疫系统是一个复杂的网络体系, 由多种细胞组成. 其包括肠黏膜上皮细胞和固有层免疫细胞, 是构成肠相关淋巴组织(gut associated lymphoid tissue, GALT)细胞免疫的基础. 正常肠黏膜上皮细胞通过紧密连接形成黏膜屏障既能抵御致病因子的入侵又可耐受肠道非致病菌群, 所以健康人的肠黏膜存在着可调控的、轻微的慢性炎症. 完整的黏膜屏障依赖于细胞间的连接, 该连接可以闭合相邻上皮细胞之间的间隙<sup>[2]</sup>. 同时杯状细胞分泌的黏液与部分因子可以修复上皮组织和调节炎症反应, Paneth细胞释放 $\alpha$ 防御素抵御病原体及其毒素与上皮皮的接触. 但在IBD时由于肠道上皮屏障破坏, 黏膜通透性增加, 肠组织长期暴露于大量抗原中导致肠道免疫系统过度反应和错误识别, 引起固有层巨噬细胞和淋巴细胞的激活, 释放一系列细胞因子和炎症介质, 激活机体的免疫应答, 炎症逐级放大最终导致组织损伤. 持续损伤的肠上皮组织引起糜烂、溃疡和防御素的生成减少, 导致肠上皮暴露于肠道微生物丛增加引起过度的炎症反应<sup>[3]</sup>. 肠固有层的免疫细胞, 平衡着机体对肠道正常菌群免疫耐受与防止病原体的进入. 在正常的肠道黏膜固有层中分布有大量的淋巴组织样细胞, 包括淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、肥大细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs)和粒细胞, 这些细胞通过模式识别受体如Toll样受体(toll like receptors, TLRs)和核苷酸寡聚化结构域(nucleotide oligomerization domain 2, NOD2)蛋白感知微生物的入侵. 其后DCs将抗原呈递给次级淋巴器官(Peyer's结和肠系淋巴结)中的Naive CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞, 在通过一些细胞因子的微环境分化成特殊表型的T淋巴细胞(如Th1、Th2、Th17、Treg)发挥其免疫功能. 近年来认为肠黏膜免疫紊乱在IBD发病机制中占有重要地位, 而其中就有CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞Th1和Th2亚型分泌的细胞因子失衡所致.

1.2 炎症介质异常 在IBD致病过程中有多种炎症介质参与. 其中肠黏膜固有层中中性粒细胞产生的大量一氧化氮(nitric oxide, NO)引起膜脂质过氧化, 破坏生物膜的结构与功能, 形成脂质自由基及其降解产物, 同时降低超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 相对增加氧自由基的产生, 致使肠黏膜通透性增加并产生过氧化物造成的损伤<sup>[4]</sup>. 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的高表

达促使炎性细胞迁移和浸润, 使肠黏膜损伤程度加深. 还有基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)通过降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)促进细胞凋亡, 影响新生血管生成, 促进细胞因子释放等多种途径参与IBD的发病. 促炎细胞因子和抗炎细胞因子二者之间的相互抗衡决定着病变的发展. 研究表明CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群分泌的细胞因子调节失衡破坏了肠道免疫环境的稳定<sup>[5]</sup>. 天然免疫细胞产生促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-23和趋化因子的水平升高, 致使肠道炎症反应并损伤黏膜组织. 固有层内CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞增多, 尤其是促炎T淋巴细胞亚群, 该细胞亚群分泌的细胞因子和趋化因子水平也相应升高. 现在研究认为CD与IFN- $\gamma$ 诱导的Th1细胞增加及持续有关, 而UC中IL-17和Th2细胞因子通常增加<sup>[6]</sup>. 肠道B细胞分泌生成IgA抗体, 有免疫保护作用不激发炎症. 近年来研究发现部分B淋巴细胞具有调节功能并可以分泌IL-10、TGF- $\beta$ 等细胞因子, 中和病理性T淋巴细胞或直接与其他免疫细胞结合抑制免疫应答, 在肠病模型中有一定的抗炎作用<sup>[7]</sup>.

## 2 SN对机体免疫系统的作用

IBD中的肠道免疫功能受遗传、环境、宿主-微生物及自身免疫等因素的影响. 如家族史、吸烟、抗生素使用和肠道微生物的定殖变化都能在一定的程度上影响肠道免疫功能. 在对IBD传统的免疫治疗药中, 主要以类固醇类激素和免疫抑制剂为主, 近年来也发展了特异性抗体及生物蛋白制剂的治疗; 但由于耐受性差、不良反应大、价格昂贵等限制了这些药物的应用. 一些免疫调节的中药, 对机体免疫反应有双向调节作用, 且不良反应小, 患者耐受性好, SN就是其中之一.

SN具有免疫抑制作用, 他可减轻小鼠胸腺及脾脏重量; 他主要通过抑制T淋巴细胞的增殖及促炎细胞因子分泌来发挥其免疫抑制作用. SN可抑制CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞增殖, 使细胞周期停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 阻止T淋巴细胞的活化<sup>[8]</sup>. 在调节Th1和Th2免疫应答时, SN可能主要通过影响Ca<sup>2+</sup>依赖的T淋巴细胞活化信号传导途径降低T淋巴细胞内IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 分子表达<sup>[9,10]</sup>. 此外体外实验证明SN能阻止活化补体引起的嗜中性粒细胞聚集, 且有良好的量效关系; SN能抑制小鼠脾淋巴细胞增殖, 使升高的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值下

## ■ 研发前沿

临床上利用SN在治疗肾病、类风湿性关节炎、红斑狼疮等机体免疫相关性疾病取得了较好的疗效. 因此关于SN免疫药理学研究也是当前的研究热点.

### ■相关报道

Cheng等采用青藤碱治疗TNBS诱导的小鼠结肠炎模型,发现治疗后小鼠的体质量减轻、组织学评分都有了明显的改善,并显著降低结肠组织中促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 的mRNA和蛋白表达。

降,并促进淋巴细胞的凋亡<sup>[11,12]</sup>。SN还可以通过阻止DCs成熟,抑制DCs抗原提呈活性和其分泌细胞因子等途径调节机体免疫反应。SN的免疫抑制作用是多靶点的,药理作用广泛;从而达到治疗免疫失衡所造成的疾病。

## 3 SN对IBD肠道免疫炎症的影响

### 3.1 对炎症介质的影响

3.1.1 对NO的调节作用: NO是一重要的炎症介质。在IBD患者与动物模型中有诱生型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)高表达及过量的NO生成或NO产物(硝酸盐和亚硝酸盐)增多。研究表明iNOS主要分布于巨噬细胞、中性粒细胞、胃肠黏膜细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞等免疫细胞和上皮细胞中,主要存在于黏膜固有层及黏膜下层。NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8、IFN- $\gamma$ 等能诱导炎性细胞iNOS表达上调产生大量NO,参与炎症反应。NO介导IL-2诱导微血管壁通透性增高,导致结肠组织水肿和功能障碍,促进血管发生,导致结肠组织充血,调节环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)依赖性的前列腺素(prostaglandin E, PGE)产生,促进炎症发生。在IBD中其破坏作用可能与影响能量代谢、氧化作用、破坏肠黏膜屏障及抑制结肠运动有关。研究发现SN治疗风湿性关节炎大鼠,可通过下调iNOS,减少NO的生成来抑制促炎因子的激活和降低炎症介质的水平,同时可抑制COX-2的mRNA的表达来减少了PGE2的生成<sup>[13,14]</sup>。在对吗啡依赖戒断小鼠的脑组织神经型一氧化氮合成酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的研究中,发现SN可将异常nNOS的mRNA水平下降到接近对照组,使NO含量恢复接近正常水平<sup>[15]</sup>。在葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的结肠炎模型中nNOS大量表达在炎症部位的神经元中<sup>[16]</sup>。据此推断SN能通过降低肠道免疫细胞内NOS的表达来抑制NO生成,从而抑制炎症反应。

3.1.2 对氧自由基的影响: 早期IBD肠黏膜屏障损伤由以下因素所致: (1)肠道有效血循环量不足,处于缺血状态,激活黄嘌呤氧化酶,产生过量氧自由基,损伤肠黏膜; (2)降低肠摄取、利用氧的能力,减少上皮细胞能量供给; (3)肠腔细菌过度繁殖,黏附到肠壁的细菌增多,定植机会增大,产生大量代谢产物和毒素,破坏肠黏膜结构,大量的自由基聚集在GALT中免疫细胞周围,破坏其细胞膜结构,影响正常免疫功能的发挥。因

此肠道黏膜抗氧化能力对肠道免疫功能也具有重要的影响。SN在体外可清除超氧阴离子自由基O<sub>2</sub><sup>-</sup>和羟自由基OH<sup>·</sup>;并具有清除自由基和抗脂质过氧化作用,降解细胞脂质体过氧化物的生成,阻断氧自由基的链式反应,防止细胞损伤和致突变<sup>[17]</sup>。其抗氧化作用可能与其分子结构中的酚羟基有关。SN还可明显抑制过氧化氢导致的细胞凋亡,降低丙二醛含量,增加SOD<sup>[18]</sup>。因此,SN可以通过抗氧化作用来减轻IBD肠黏膜的损害。

3.1.3 对ICAM-1的影响: ICAM-1在炎性细胞浸润和组织炎症形成中起着重要作用。研究证实,ICAM-1参与了IBD的致病<sup>[19]</sup>。在活动性IBD患者的肠黏膜,血管内皮细胞表达ICAM-1明显增加,同时伴有吞噬细胞表达淋巴细胞功能相关性抗原-1(lymphocyte function-associated molecule-1, LFA-1)、淋巴细胞表达选择素(selectins)、整合素(integrins)及免疫球蛋白超家族受体增加,而选择素又能诱导内皮细胞上黏附分子CD31, CD44等的表达,这些黏附分子促使炎性细胞移出血管、穿过内皮细胞向炎症部位移行,从而引起和增强黏膜局部炎症。有研究发现SN可抑制IL-1 $\beta$ 刺激后肾上皮细胞内ICAM-1的mRNA表达<sup>[20,21]</sup>。还有研究表明,SN可抑制糖尿病小鼠脑缺血再灌注损伤后P-选择素和ICAM-1表达的上调,同时减轻炎症反应,并呈剂量依赖性<sup>[22]</sup>。提示SN可能通过干预炎症损伤条件下的上皮细胞趋化因子和黏附因子的表达,抑制单核细胞的迁移和黏附,减少炎症浸润,抑制炎症反应。这些都有利于控制IBD的肠道炎症反应。

3.1.4 对MMPs的影响: MMPs一组能降解ECM的蛋白水解酶类,参与组织的损伤与修复,其过度激活可能参与肠黏膜炎症的上皮损伤。研究发现在三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的穿透性结肠炎大鼠模型中,结肠炎症区域周围及中性粒细胞表面MMP-9的高表达与结肠的炎症损伤相关。而在DSS诱导的急性大鼠实验性结肠炎中, MMP-3和MMP-13表达明显增高<sup>[23]</sup>。以上均提示MMPs参与实验性结肠炎动物局部炎症过程及组织破坏。临床上研究也显示, MMPs水平的升高常常与IBD的活动性炎症反应密切相关。大量的实验亦表明,许多因子参与了IBD的发病和愈合过程,而MMPs在结肠黏膜降解的最后阶段发挥重要作用,是结肠黏膜损害的最后环节<sup>[24,25]</sup>。结肠炎发病可能是TNF- $\alpha$ 引起MMP-2和MMP-9大量生成,形成炎

症级联反应链, 导致ECM过度降解, 破坏肠黏膜. TNF- $\alpha$ 促进MMP-2和MMP-9的表达很可能是通过p42/p44MAPK、JNK、NF- $\kappa$ B和p38MAPK等途径实现的<sup>[26,27]</sup>. 研究表明, SN治疗RA大鼠, 可降低血清中IL-1 $\beta$ 和IL-6, 并通过抑制MMP-2和MMP-9的mRNA和蛋白的表达来减少淋巴细胞的浸润与迁移<sup>[28,29]</sup>. 在TNBS诱导的大鼠结肠炎模型中, SN可能通过抑制TNF- $\alpha$ 的合成阻止MMP-2和MMP-9的产生, 减少炎症细胞趋化和浸润结肠组织, 抑制ECM的过度降解, 维护肠黏膜屏障作用<sup>[30]</sup>.

### 3.2 对免疫反应的影响

3.2.1 对DCs的影响: 肠黏膜免疫系统中先天性免疫识别提供对病原体的最初快速反应. 而在这一过程中DCs发挥着重要作用. 依靠其表面的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)与病原相关识别分子(pathogen associated microbial pattern, PAMPs)相互作用, 活化信号转导途径, 导致一系列炎症细胞因子和病原体基因的转录, 从而发挥免疫调节作用. 由于肠道正常菌群中缺乏PAMPs, 所以DCs无法通过PRRs识别共生菌抗原, 故不能激起炎症反应. DCs上表达的TLRs能识别病原体产物, 通过下游的信号分子激活多种促炎因子、趋化因子及其受体的迅速表达, 从而启动炎症反应, 使DCs从外周迁移至淋巴器官, 调节特异性免疫反应. TLRs信号能使DCs成熟, 捕获抗原并提呈至MHC-II分子和协同刺激因子, 进一步刺激naive T淋巴细胞. IBD中的DCs较相同部位的正常组织内DCs表达更多的CD40、CD80、CD83、CD86, 表现为成熟状态, 这些被激活的DCs产生迁移, 将抗原呈递或者也可能直接作为效应细胞, 产生促炎症细胞因子或打破T淋巴细胞对共生菌的免疫耐受<sup>[31]</sup>. 而TLRs介导的免疫途径的过度激活, 对肠腔内共生菌失去耐受这在IBD的发病和发展中起重要作用. 实验证明SN通过抑制DC的分化成熟及功能从而调节机体的免疫应答能力<sup>[32,33]</sup>, 他有效抑制DCs表达MHC-II类分子, 减少协同刺激因子和IL-12的产生, 阻断了DCs对活化后自身反应性T淋巴细胞的诱导和分化能力. SN还可有效抑制DCs趋化因子及其受体的表达, 阻止DCs迁移到次级淋巴器官与T淋巴细胞结合, 从而达到免疫治疗的作用. 进一步研究发现, SN可抑制DCs的TLR2、TLR4的mRNA和蛋白表达, 阻断了TLRs信号通路介导的DCs成熟和细胞因子的分泌, 进而阻止了T淋

巴细胞的异常活化<sup>[34,35]</sup>. 因此, 推测他可能通过抑制肠黏膜TLRs信号通路的过度活化来抑制DCs的成熟和抗原提呈反应来对IBD起治疗作用.

3.2.2 对CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的影响: CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的亚群包括辅助T淋巴细胞(Th1、Th2和Th17)和调节性T淋巴细胞(Treg), 他们分泌特性细胞因子来调节肠道免疫. 小鼠和人类的炎症肠病研究显示, 肠道CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群失调与其发病有关. 传统观念认为, UC患者肠道黏膜炎症主要是由IL-4和IL-13促进分化的Th2细胞占优势; 而CD患者主要是IL-12促进分化的Th1细胞占优势. 还有研究发现Th17细胞因子IL-17通过细胞外信号调节(extracellular signal-regulated kinase, ERK)-丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路参与调节肠上皮屏障功能, IL-17可能是引起肠道炎症的潜在因素<sup>[36]</sup>. SN可抑制T淋巴细胞的活化及Th1细胞分泌的细胞因子, 并且抑制小鼠肠系膜淋巴结CD3<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ . 其抑制作用很大程度上是PKC、NF- $\kappa$ B非依赖途径核转录因子介导<sup>[37]</sup>. SN呈浓度依赖性地降低人外周血CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞ERK1/2活性, 从而抑制CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的增殖减少IL-17产生, 减轻炎症反应<sup>[38]</sup>. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg细胞数量减少、功能异常或抑制功能受损, 均可导致肠黏膜损伤, 从而诱发IBD. Treg细胞可通过分泌转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )和IL-10抑制天然或获得性免疫反应诱发的肠道炎症, 阻断其细胞因子可抑制其免疫负调节作用<sup>[39]</sup>. SN可上调中枢神经系统内TGF- $\beta$ 和IL-10的表达水平<sup>[40]</sup>, 发挥抗炎和免疫调节作用. IL-10可促进肠道黏膜中Treg细胞的活化, 增强Treg的抑制作用. TGF- $\beta$ 可调控Treg中Foxp3的表达, 维持细胞在外周的稳态, 并且诱导并维持正常Th3细胞功能, 调节IBD内激活的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞表型失衡. SN可改善细胞因子平衡状态, 调节肠道免疫, 减轻局部炎症反应, 并对机体整体免疫功能产生影响, 调节机体免疫状态, 从而达到治的目的.

3.2.3 对细胞因子的影响: 细胞因子在肠道免疫中起重要作用. 根据其在炎症反应中所起的作用, 可分为: (1)促炎细胞因子, 包括白细胞介素家族中的IL-1、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18及TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ , 他们在肠道发挥促炎作用并充当黏膜损伤的介质; (2)抗炎细胞因子, 包括IL-4、IL-10、IL-11、IL-13、TGF- $\beta$ , 他们主

### ■应用要点

中药单体青藤碱具有抗炎及免疫抑制的作用. 临床上利用青藤碱的各种剂型在治疗肾病、类风湿性关节炎、红斑狼疮等机体免疫相关性疾病方面取得了较好的疗效. 深入了解青藤碱免疫治疗机制, 进而为调控炎症性肠病的肠道免疫炎症提供理论基础.

### ■同行评价

本文总结了目前IBD的肠道免疫发病机制研究进展、探讨青藤碱调节机体免疫及对IBD肠道免疫炎症的作用,具有一定的理论价值和应用前景,为寻求SN调控肠道免疫炎症来治疗IBD提供一定参考。

要以抗炎的方式起作用. 这些细胞因子在IBD中起致炎及抗炎作用, 其主要通过与受体结合完成信号转导或特定地作用于靶细胞产生生物学效应. IL-1 $\beta$ 是一重要的致炎因子, 人类基因多态性研究显示IL-1 $\beta$ 基因多态性与IBD病程和严重程度有关, IL-1 $\beta$ 在IBD患者肠黏膜中高水平表达. IL-8是由IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 刺激产生的炎症因子, IL-8对T淋巴细胞具有趋化作用, 可促进中性粒细胞和嗜碱性粒细胞的活化与黏附<sup>[41]</sup>. 研究表明, 在IBD患者肠黏膜组织中IL-8浓度显著增加, 且与IBD分型与疾病病程无关, 提示针对IL-8的特异性治疗可以全面地改善IBD患者的炎症活动. IL-8还可诱导人肠道微血管内皮细胞的移行, 促使血管生成, 参与IBD发病<sup>[42]</sup>. 而抗炎因子IL-10可以使IBD患者单核细胞分泌IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 减少, 以此抑制炎症对组织浸润. 有研究表明SN可能通过下调单核/巨噬细胞系统炎症递质和细胞因子合成而发挥抗炎作用. 此外, SN可调节人淋巴细胞产生细胞因子, 抑制IL-2膜受体的表达, 并能通过下调人外周血单个核细胞IL-1 $\beta$ 、IL-8 mRNA的表达, 发挥对免疫性炎症的治疗作用<sup>[43]</sup>, SN还可抑制系统性红斑狼疮患者T淋巴细胞产生的IFN- $\gamma$ 、IL-2等炎症因子<sup>[44]</sup>. SN能通过下调单核/巨噬细胞NF- $\kappa$ B的活性, 干预NF- $\kappa$ B信号通路的某些环节, 抑制细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的表达及分泌, 减少局部炎症细胞的浸润程度和炎症损伤, 并能抑制淋巴细胞增生, 促进组织修复和伤口愈合. 总之, SN可以调节肠道黏膜细胞因子的表达, 促进组织修复, 从而调节黏膜免疫状态, 达到治疗和缓解黏膜免疫紊乱的作用.

### 4 结论

SN可以通过加强黏膜保护, 平衡相关免疫细胞的免疫反应, 维持肠黏膜微循环正常功能, 提高抗氧化能力, 调节细胞因子和炎症介质的分泌和表达等多因素广泛影响而作用于肠黏膜免疫系统, 从而达到改善肠道免疫状态来治疗IBD. 因此, 他有望成为治疗IBD的新途径.

### 5 参考文献

- 1 黄小鲁, 王勇, 郝飞. 青藤碱对机体免疫系统的影响及临床应用进展. *医药导报* 2007; 26: 397-399
- 2 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909
- 3 Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption.

- 4 Novartis Found Symp 2004; 263: 115-124; discussion 124-132, 211-218
- 5 Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Johansson C, Schmidt PT, Herulf M, Lundberg JO, Hellstrom PM. Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus nonresponders. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3386-3392
- 6 Brown EM, Fuleihan G el-H CJ, Kifor O. A comparison of the effects of divalent and trivalent cations on parathyroid hormone release, 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate accumulation, and the levels of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1990; 127: 1064-1071
- 7 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isoe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689
- 8 Velázquez P, Wei B, Braun J, Surveillance B lymphocytes and mucosal immunoregulation. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 453-462
- 9 Shu L, Yin W, Zhang J, Tang B, Kang YX, Ding F, Hua ZC. Sinomenine inhibits primary CD4+ T-cell proliferation via apoptosis. *Cell Biol Int* 2007; 31: 784-789
- 10 Feng H, Yamaki K, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino S. Suppression of Th1 and Th2 immune responses in mice by Sinomenine, an alkaloid extracted from the chinese medicinal plant *Sinomenium acutum*. *Planta Med* 2006; 72: 1383-1388
- 11 Feng H, Yamaki K, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino S. Effect of sinomenine on collagen-induced arthritis in mice. *Autoimmunity* 2007; 40: 532-539
- 12 岳燕林, 刘剑平. 青藤碱治疗类风湿关节炎作用机制的研究进展. *医学综述* 2010; 16: 2198-2200
- 13 Liu JH, Li WD, Teng HL, Lin ZB. [Immunopharmacological action of sinomenine, an alkaloid isolated from *Sinomenium acutum*, and its mechanism of action in treating rheumatoid arthritis]. *Yaoxue Xuebao* 2005; 40: 127-131
- 14 Yang DS, Liu F, Zeng FD, Chen H. [Effect of sinomenine on adjuvant arthritis and its mechanisms]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2005; 30: 1361-1363
- 15 Chen W, Shen YD, Zhao GS, Yao HP. [Inhibitory effect of sinomenine on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced PC-12 cells]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2004; 29: 900-903
- 16 Liu Z, Zheng JF, Yang LQ, Yi L, Hu B. [Effects of sinomenine on NO/nNOS system in cerebellum and spinal cord of morphine-dependent and withdrawal mice]. *Shengli Xuebao* 2007; 59: 285-292
- 17 Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G137-G147
- 18 刘刚, 王辉, 张先洲, 罗顺德. 青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用. *中草药* 2006; 37: 84-87
- 19 李乐, 高小利, 丁宝兴. 青藤碱抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导乳鼠心肌细胞凋亡. *中国中药杂志* 2008; 33: 939-941, 961
- 20 Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Piqué JM, Panés J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002; 82: 597-607
- 21 杨汝春, 王永钧, 林京莲, 朱晓玲, 鲁盈. 青藤碱对肾小管上皮细胞MCP-1和ICAM-1基因表达的影响. *中国*

- 中医药科技 2005; 12: 372-374
- 21 Yang F, Ji G, Chen YB, Wang WZ. [The effects of sinomenine on the expression of ICAM-1 and IL-2 during the rejection of rat cardiac allograft]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2007; 23: 240-241
  - 22 周素娴, 苏珂, 于健, 彭鹰, 周燕, 林枫, 李浩. 青藤碱对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤P-选择素和细胞间黏附分子-1表达的影响. *时珍国医国药* 2009; 20: 1593-1595
  - 23 Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Corte MG, Bongera M, Martínez A, Martín A, Andicoechea A, Gava RR. Collagenase-3 (MMP-13) expression by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1050-1055
  - 24 Piriälä E, Ramamurthy NS, Sorsa T, Salo T, Hietanen J, Maisi P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci* 2003; 48: 93-98
  - 25 Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 933-938
  - 26 Lin CC, Tseng HW, Hsieh HL, Lee CW, Wu CY, Cheng CY, Yang CM. Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229: 386-398
  - 27 Wiehler S, Cuvelier SL, Chakrabarti S, Patel KD. p38 MAP kinase regulates rapid matrix metalloproteinase-9 release from eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 463-470
  - 28 Zhou H, Wong YF, Wang J, Cai X, Liu L. Sinomenine ameliorates arthritis via MMPs, TIMPs, and cytokines in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 352-357
  - 29 Ou Y, Li W, Li X, Lin Z, Li M. Sinomenine reduces invasion and migration ability in fibroblast-like synoviocytes cells co-cultured with activated human monocytic THP-1 cells by inhibiting the expression of MMP-2, MMP-9, CD147. *Rheumatol Int* 2010 May 16. [Epub ahead of print]
  - 30 周国胜, 吴正祥, 杨九华, 吴强, 杨枫, 周进. 青藤碱对结肠炎大鼠基质金属蛋白激酶的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3387-3393
  - 31 Shiomi H, Shimizu T, Endo Y, Murata S, Kurumi Y, Uji Y, Tani T. Relations among circulating monocytes, dendritic cells, and bacterial translocation in patients with intestinal obstruction. *World J Surg* 2007; 31: 1806-1812
  - 32 Zhao Y, Li J, Yu K, Liu Y, Chen X. Sinomenine inhibits maturation of monocyte-derived dendritic cells through blocking activation of NF-kappa B. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 637-645
  - 33 杨承英, 陈永文, 傅晓岚, 费蕾, 靳斯, 谢淳怡, 汤玉渝, 吴玉章. 青藤碱促进树突状细胞分化抑制其成熟. *免疫学杂志* 2007; 23: 265-269
  - 34 余克强, 罗仁. 青藤碱对类风湿关节炎患者外周血单核源性树突状细胞趋化因子分泌和受体表达的影响. *南方医科大学学报* 2009; 29: 635-637, 641
  - 35 余克强, 罗仁. 青藤碱对类风湿关节炎患者外周血树突状细胞TLR2和TLR4表达的影响. *中华中医药杂志* 2009; 24: 316-319
  - 36 Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S43-S46
  - 37 李晓娟, 刘良, 肇静娴, 陈纪藩. 青藤碱对T淋巴细胞活化及TH1类细胞内细胞因子表达的影响. *中国免疫学杂志* 2004; 20: 249-252, 258
  - 38 He X, Wang J, Guo Z, Liu Q, Chen T, Wang X, Cao X. Requirement for ERK activation in sinomenine-induced apoptosis of macrophages. *Immunol Lett* 2005; 98: 91-96
  - 39 Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 677-686
  - 40 文娟. 青藤碱对大鼠EAE的防治作用及IL-10、TGF-β1表达的影响. 湖南: 中南大学, 2008: 1-52
  - 41 Yamamoto T, Maruyama Y, Umegae S, Matsumoto K, Saniabadi AR. Mucosal inflammation in the terminal ileum of ulcerative colitis patients: endoscopic findings and cytokine profiles. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 253-259
  - 42 Reddy KP, Markowitz JE, Ruchelli ED, Baldassano RN, Brown KA. Lamina propria and circulating interleukin-8 in newly and previously diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 365-372
  - 43 刘良, 王培训, 周联, 曹柳英. 青藤碱对大鼠外周血单个核细胞IL-1β和IL-8细胞因子基因表达的影响. *中国免疫学杂志* 2002: 241-244
  - 44 石韞珍, 孟锐, 李丽, 吴长有. 青藤碱对红斑狼疮患者外周血T细胞的抑制作用及机制探讨. *中国免疫学杂志* 2008: 800-803, 807

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)

# 外排泵ABC转运蛋白基因 $msbA$ 和 $spab$ 在幽门螺杆菌多重耐药中的重要作用

米阳, 郑鹏远, 张炳勇, 刘志强, 宋春花, 杨平常

## ■背景资料

在临床上, 常应用抗生素清除 *H. pylori* 以治疗胃炎和消化性溃疡。随着 *H. pylori* 菌株对抗生素的耐药率上升和多重耐药株的出现, *H. pylori* 多重耐药的机制成为研究的热点问题。目前研究认为, 外排泵在细菌多重耐药的机制中起重要作用。

米阳, 郑鹏远, 刘志强, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014  
张炳勇, 郑州大学附属人民医院消化内科 河南省郑州市 450014  
宋春花, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室 河南省郑州市 450001  
杨平常, 麦克马斯特大学病理和分子医学系 加拿大汉密尔顿安大略省 L8S4L8  
河南省杰出青年基金资助项目, No. 074100510017(2006)  
河南省卫生科技创新领军人才基金资助项目, No. 2010  
作者贡献分布: 米阳、郑鹏远及张炳勇对此文贡献均等; 此课题由郑鹏远、张炳勇、宋春花、刘志强及杨平常设计; 研究过程由米阳与张炳勇完成; 研究仪器和试剂由郑鹏远提供; 数据分析由米阳完成; 论文书写由米阳与刘志强完成。  
通讯作者: 郑鹏远, 教授, 450014, 河南省郑州市, 郑州大学第二附属医院消化内科。medp7123@126.com  
电话: 0371-65261035 传真: 0371-63934118  
收稿日期: 2011-03-13 修回日期: 2011-05-06  
接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Role of ABC transporter genes $msbA$ and $spab$ in multidrug resistance of *Helicobacter pylori*

Yang Mi, Peng-Yuan Zheng, Bing-Yong Zhang, Zhi-Qiang Liu, Chun-Hua Song, Ping-Chang Yang

Yang Mi, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Bing-Yong Zhang, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Chun-Hua Song, Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Ping-Chang Yang, Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario L8S4L8, Canada

Supported by: the Excellent Youth Foundation of Henan Province, No: 074100510017(2006); and the Health Science Innovative Leader Foundation of Henan Province, No. 2010

Correspondence to: Professor Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com

Received: 2011-03-13 Revised: 2010-05-06

Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-05-18

## ■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

## Abstract

**AIM:** To evaluate the potential role of ATP-binding cassette (ABC) transporter genes  $msbA$  and  $spab$  in multidrug resistance (MDR) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

*cobacter pylori* (*H. pylori*).

**METHODS:** *H. pylori* strains were isolated from patients with peptic ulcer or gastritis. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of ampicillin, ceftriaxone, tetracycline, clarithromycin, ofloxacin and furazolidone for *H. pylori* strains were determined by agar dilution test. Five sensitive *H. pylori* strains (four isolates and one standard strain NCTC11637) were used to induce multidrug resistance with chloramphenicol. The mRNA expression of  $msbA$  and  $spab$  in these multidrug-resistant strains was determined by RT-PCR. Two *H. pylori* gene knockout mutants (MZ1006 $\Delta$  $msbA$  and MZ1006 $\Delta$  $spab$ ) were constructed by inserting the kanamycin resistance cassette from the pEGFP-N2 vector into the  $msbA$  and  $spab$  genes, and their susceptibility profiles to nine antibiotics were estimated.

**RESULTS:** The expression levels of ABC transporter genes  $msbA$  and  $spab$  in multidrug-resistant *H. pylori* strains were higher than those in sensitive strains ( $1.8200 \pm 0.5310$  vs  $0.8420 \pm 0.0789$ ,  $P = 0.018$ , for  $msbA$ ;  $1.8340 \pm 0.2726$  vs  $1.2180 \pm 0.0743$ ,  $P = 0.015$ , for  $spab$ ). MZ1006 $\Delta$  $msbA$  and *H. pylori* MZ1006 $\Delta$  $spab$  mutants were constructed successfully, and their sensitivity to four of nine antibiotics was significantly enhanced compared to their parental wild-type strains. Both the  $msbA$  and  $spab$  genes were detected in all isolated strains.

**CONCLUSION:** ABC transporter genes  $msbA$  and  $spab$  play an important role in multidrug resistance of *H. pylori*.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Efflux pump; ABC transporter; Multidrug resistance;  $msbA$ ;  $spab$

Mi Y, Zheng PY, Zhang BY, Liu ZQ, Song CH, Yang PC. Role of ABC transporter genes  $msbA$  and  $spab$  in multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1500-1505

## 摘要

**目的:** 探讨外排泵ABC转运蛋白基因 $msbA$

和 $spab$ 在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)多重耐药中的作用。

**方法:**从临床上胃炎和消化性溃疡患者的胃黏膜标本分离*H.pylori*。采用琼脂二倍稀释法测定氨苄西林、头孢曲松、四环素、克拉霉素、氧氟沙星和呋喃唑酮对*H.pylori*的最小抑菌浓度(MIC)。应用氯霉素对敏感株和标准菌株进行体外诱导多重耐药。采用RT-PCR的方法分别测定敏感株和多重耐药株中 $msbA$ 和 $spab$ 基因的相对表达量。分别构建 $msbA$ 和 $spab$ 的基因敲除株,分别测定敲除前后菌株对9种抗生素的敏感性。

**结果:**诱导出包括标准菌株NCTC11637在内的5株多重耐药株。多重耐药株中 $msbA$ 和 $spab$ 基因的相对表达量明显高于敏感株( $1.8200 \pm 0.5310$ ,  $1.8340 \pm 0.2726$  vs  $0.8420 \pm 0.0789$ ,  $P = 0.018$ ,  $0.015$ )。成功构建了 $msbA$ 和 $spab$ 基因敲除株(*H.pylori* MZ1006 $\Delta$  $msbA$ 和*H.pylori* MZ1006 $\Delta$  $spab$ )。两株基因敲除株对4种抗生素的敏感性相对于野生株分别有明显的增加。在临床分离的20株*H.pylori*中均检测出 $msbA$ 和 $spab$ 基因,未发现基因缺失株。

**结论:**ABC转运蛋白 $msbA$ 和 $spab$ 基因在*H.pylori*多重耐药机制中起重要作用。

**关键词:**幽门螺杆菌; 外排泵; ABC转运蛋白; 多重耐药;  $msbA$ ;  $spab$

米阳, 郑鹏远, 张炳勇, 刘志强, 宋春花, 杨平常. 外排泵ABC转运蛋白基因 $msbA$ 和 $spab$ 在幽门螺杆菌多重耐药中的重要作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1500-1505  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1500.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)在人群中感染率为40%-90%,是慢性胃炎、消化性溃疡和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的主要病因,并与胃癌的发生密切相关,临床中常联合应用抗生素对*H.pylori*进行根除治疗<sup>[1]</sup>。随着抗生素的广泛应用,*H.pylori*的耐药率逐年上升,并且已经出现同时对阿莫西林、克拉霉素和甲硝唑耐药的多重耐药(multidrug resistance)株<sup>[2,3]</sup>。目前针对细菌多重耐药的机制已成为研究的热点。其中,外排泵(efflux pump)被认为在细菌多重耐药机制中起重要作用<sup>[4,5]</sup>,它是细菌中可将不同结构底物泵出菌体外的一类膜转运蛋白,可分为5个家族<sup>[6-9]</sup>。(1)ATP结合盒转运体类(ATP-binding cassettes transporters, ABC); (2)主要易化因子家

族(major facilitator super-family, MFS); (3)小多重耐药家族(small multidrug resistance, SMR); (4)多重药物与毒物外排家族(multidrug and toxic compound extrusion, MATE); (5)耐受-生节-分裂家族(resistance nodulation division family, RND)。ABC转运蛋白家族为其中之一。Reyes等<sup>[10]</sup>发现ABC转运蛋白 $msbA$ 基因在革兰阴性菌多重耐药中起作用,其外排底物包括柔红霉素、阿霉素、长春碱、琥乙红霉素、溴化乙锭、四苯磷等。Woebking等<sup>[11]</sup>发现ABC转运蛋白 $msbA$ 基因在乳酸球菌中表达使其对红霉素的耐药程度提高了86倍。国内外和我们前期<sup>[12,13]</sup>对RND类外排泵在*H.pylori*多重耐药中机制研究已有报道,但对于ABC转运蛋白基因在*H.pylori*多重耐药株中的作用研究较少。Chiu<sup>[14]</sup>等发现 $msbA$ 基因可能参与*H.pylori*对疏水性药物的耐药,但是研究对象仅限于3种临床上不常用的疏水性抗生素(红霉素、利福平和新生霉素)。本研究在我们前期研究的基础上,从GenBank筛选出ABC转运蛋白家族基因中的两个典型的多重耐药蛋白基因 $msbA$ 和 $spab$ ,测定其在*H.pylori*多重耐药株中的表达,并构建对应的基因敲除株,测定敲除前后对应菌株对各种抗生素的敏感性,研究两种基因在*H.pylori*多重耐药中的作用。进一步阐明在*H.pylori*多重耐药中起作用的外排泵的种类和意义,为临床上*H.pylori*多重耐药的研究打下理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 于郑州大学第二附属医院胃镜室随机取胃炎或消化性溃疡患者胃黏膜标本(2009-10/2010-06),研磨之后涂布于含10%无菌脱纤维羊血的布氏琼脂培养基,置于CO<sub>2</sub>培养箱内37℃微需氧培养3-7 d,刮取菌落经HE染色和尿素酶鉴定为*H.pylori*临床分离株。氨苄西林、头孢曲松、四环素、克拉霉素、卡那霉素、氯霉素、氧氟沙星、呋喃唑酮、利福平等购自中国药品生物制品检验所。DNA提取试剂盒购自北京天根生物科技公司。TRIzol、cDNA第一链合成试剂盒和Taq酶购自北京全式金生物公司。内参选 $gyrB$ 基因(DNA旋转酶B亚单位基因),引物由上海Invitrogen生物技术公司合成,引物序列如表1。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、T4连接酶购自北京天根生物科技公司。*Xho* I、*Xba* I、*Bam* H I、*Bgl* II限制性内切酶购自北京Promega生物技术公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱导并鉴定*H.pylori*多重耐药株:**培养并传

■**研发前沿**  
细菌对抗生素的耐药问题,特别是细菌多重耐药机制,已成为当前研究的热点。

## ■ 相关报道

Christopher等发现ABC转运蛋白*msbA*基因在革兰阴性菌多重耐药中起作用, 其外排底物包括柔红霉素、阿霉素、长春碱、琥珀乙红霉素、溴化乙锭、四苯磷等. Barbara等发现ABC转运蛋白*msbA*基因在乳酸杆菌中表达, 使其对红霉素的耐药程度提高了86倍.

表 1 PCR引物列表

引物名称	序列	扩增长度(bp)
msbA	F: 5'-ATGTGGCGTATGGTTTAG-3'	303
	R: 5'-GGTTGTGCGAGATGAGAA-3'	
spab	F: 5'-TACTGCTTGGCTCATCT-3'	424
	R: 5'-GCATTAGTCGGTAGGAA-3'	
gyrB	F: 5'-TTACTACGACTTATCTGGGGCTAGCGCTG-3'	500
	R: 5'-CCCATCAATTTCCACATTCTCCGC-3'	
msbAM	F: 5'-GATCTCTAGAAGCGTATTTGGGTAAGAGTGG-3'	1 398
	R: 5'-CCGCTCGAGGGTGTGCGAGATGAGAAT-3'	
kmM	F: 5'-CGGGATCCAATGATTGAACAAGATGGATTG-3'	800
	R: 5'-CGGGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'	
spabS	F: 5'-GATCTCTAGAAACAATTCGTAATAAGCC-3'	860
	R: 5'-CCGCTCGAGTCTACTGAGCAGCACTACA-3'	
kmS	F: 5'-GCAGATCTAATGATTGAACAAGATGGATTG-3'	800
	R: 5'-GCAGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'	

代临床分离株, 测定其对诱导剂氯霉素的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 刮取对数生长期的菌落, 涂布于含1/2 MIC氯霉素的布氏琼脂培养基上, 于37 °C微需氧培养2-3 d, 重复传代培养, 逐渐成倍增加诱导剂浓度至128倍MIC, 然后接种菌落于含4倍MIC诱导剂培养基上, 传代培养后分别接种于含4倍MIC氨基苄西林、头孢曲松、四环素、克拉霉素、卡那霉素、氧氟沙星、呋喃唑酮的布氏琼脂培养基上. 37 °C微需氧培养2-3 d, 能在大于等于3种抗生素平板上生长的菌株即为多重耐药株<sup>[15]</sup>.

1.2.2 采用琼脂二倍稀释法测定菌株对抗生素的MIC: 选取培养2-3 d处于对数生长期的菌株, 刮取菌落溶于无菌生理盐水, 用分光光度计调浓度至0.5麦氏浓度, 分别接种于不同梯度浓度的抗生素平板, 测定临床分离株和诱导多重耐药株对各种抗生素的MIC.

1.2.3 *H.pylori msbA*和*spab*基因的检测: 应用DNA提取试剂盒提取*H.pylori*的全基因组DNA为模板. PCR扩增体系: 上下游引物各1 μL, DNA模板2 μL, 2×Taq PCR mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O补总体系至50 μL. 反应条件: 94 °C预变性5 min, PCR循环参数 94 °C 30 s, *spab*、*msbA*基因退火温度分别为50 °C和53 °C, 30 s, 72 °C 60 s共35个循环, 最后72 °C延伸6 min.

1.2.4 RT-PCR分别测定*msbA*和*spab*的表达: 于培养基上刮取处于对数生长期的*H.pylori*溶于生理盐水中, 用可见分光光度计测定, 当 $A_{660} = 0.1$ 时, 取1 mL用TRIzol法提取*H.pylori*的RNA, 溶于10 μL DEPC水中. 紫外分光光度计测定

RNA含量. 反转录体系如下: Total RNA 8 μL, oligo(dT)18(0.5 g/L)1 μL, Easy Script RT 1 μL, 2×ES Reaction Mix 10 μL, 反应总体系20 μL. 反应条件: 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 5 min. PCR反应体系: cDNA 2 μL, 上下游引物各1 μL, 10×Easy Taq Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, Easy Taq DNA Polymerase 1 μL, ddH<sub>2</sub>O补总体系至50 μL. 反应条件: 94 °C预变性5 min, PCR循环参数 94 °C 30 s, *spab*、*msbA*和*gyrB*基因退火温度分别为50 °C、53 °C和62 °C, 退火30 s, 72 °C 60 s共28个循环, 最后72 °C延伸6 min. 取6 μL PCR产物在含0.5 mg/L EB的2%琼脂糖凝胶中85 V电泳30 min, 并拍照. 得到图像用Gel-pro4.5 Analyzer分析软件做灰度分析, 得出基因表达相对值.

1.2.5 *msbA*基因敲除株和*spab*基因敲除株的构建: 参考相关文献[16,17], 以临床分离株*H.pylori* MZ1006(分离于浅表性胃炎患者)为模板, PCR分别扩增*msbA*和*spab*基因编码区195-1 592 bp, 长度1 398 bp(*msbAM*)和20-879 bp, 长度860 bp(*spabS*)的大片段(参照GenBank上*H.pylori* P12 *msbA*和*spab*的序列设计引物). 以pEGFP-N2质粒为模板, 分别PCR扩增卡那霉素抗性基因*kmM*和*kmS*引物设计及扩增长度见表1. DNA测序由上海英俊生物技术公司完成. *msbAM*, *spabS*和pBluescript II SK(-)分别经*Xba* I和*Xho* I双酶切后, *msbAM*和pBluescript II SK(-), *spabS*和pBluescript II SK(-)酶切产物分别连接鉴定并测序. 分别在*msbAM*基因737 bp处选择酶切位点*Bam* H I和*spabS*基因359 bp处选择酶

表 2 氯霉素诱导的多重耐药性的比较 (mg/L)

菌株	处理	氨苄西林	头孢曲松	四环素	克拉霉素	氧氟沙星	呋喃唑酮
1002	诱导前MIC	0.500	0.250	0.125	0.500	0.063	0.125
	诱导后MIC提高倍数	4 ×	8 ×	8 ×	16 ×	16 ×	1 ×
1006	诱导前MIC	0.250	0.125	0.250	1.000	0.125	0.0625
	诱导后MIC提高倍数	8 ×	4 ×	4 ×	8 ×	8 ×	8 ×
1008	诱导前MIC	0.250	0.250	0.125	0.500	0.125	0.125
	诱导后MIC提高倍数	16 ×	8 ×	8 ×	16 ×	8 ×	4 ×
1009	诱导前MIC	0.500	0.125	0.250	1.000	0.063	0.250
	诱导后MIC提高倍数	2 ×	8 ×	4 ×	4 ×	8 ×	8 ×
11637	诱导前MIC	0.250	0.125	0.125	1.000	0.250	0.125
	诱导后MIC提高倍数	16 ×	16 ×	8 ×	8 ×	16 ×	4 ×

■ 创新亮点

本文以中国临床分离株为研究对象, 采用氯霉素诱导多重耐药的 *H. pylori* 菌株, RT-PCR检测 $msbA$ 和 $spab$ 基因在敏感株和多重耐药株中的表达, 并构建对应的基因敲除株, 测定敲除前后菌株对9种抗生素的敏感性的变化。

切位点 $Bgl$ II, 分别插入卡那霉素抗性基因 $kmM$ 和 $kmS$ , 转化入DH-5 $\alpha$ 大肠杆菌, 用试剂盒提取重组质粒以备电击转化所用. 将在琼脂培养基上培养72 h的 $H. pylori$ 刮取溶于1 mL 15%甘油溶液中, 在5 000 r/min 4 °C离心10 min, 重复3次, 然后将沉淀重悬于50  $\mu$ L 15%甘油溶液中, 用紫外分光可见光度计(U-2001)测定 $A_{660}$ ( $A_{660} = 1$ , 对应细菌浓度为 $1 \times 10^{11}$  CFU/L), 把细菌浓度调整为 $1 \times 10^{13}$  CFU/L. 于4 °C放置10 min, 然后分别加打靶载体pBSK- $msbA$ -mutant或pBSK- $spab$ -mutant 500 ng, 放置冰上5 min, 放入-20 °C预冷的0.2 cm电击池冰浴5 min. 将电击池放置电穿孔架上, 设定电击条件为: 2.5 kv, 25 F, 200  $\Omega$ , 9.62 ms, 于电击之后加SOC缓冲液100  $\mu$ L混入电击池的细菌中, 放置5 min后, 把电转液均匀的涂在布氏琼脂平板上, 在37 °C培养48 h后, 将平板上所有菌落刮取溶于无菌生理盐水, 涂抹于含25 mg/L卡那霉素的布氏琼脂平板上继续培养3-5 d, 挑取单个菌落鉴定. 采用琼脂二倍稀释法分别测定9种抗生素对 $msbA$ 和 $spab$ 基因敲除前后的菌株的最小抑菌浓度.

**统计学处理** 采用配对 $t$ 检验的方法分别分析敏感株和诱导多重耐药株两种基因的mRNA相对表达量的差异. 应用SPSS10.0统计软件包进行统计分析.

2 结果

**2.1 氯霉素诱导 $H. pylori$ 多重耐药株药敏结果** 将临床分离敏感株和标准株经氯霉素诱导, 成功诱导出多重耐药株5株, 经琼脂二倍稀释法鉴定对各种抗生素的MIC, 5株多重耐药株对氨苄西林、头孢菌素、四环素、克拉霉素、氧氟沙星和呋喃唑酮的MIC相对于敏感株均有不同程度

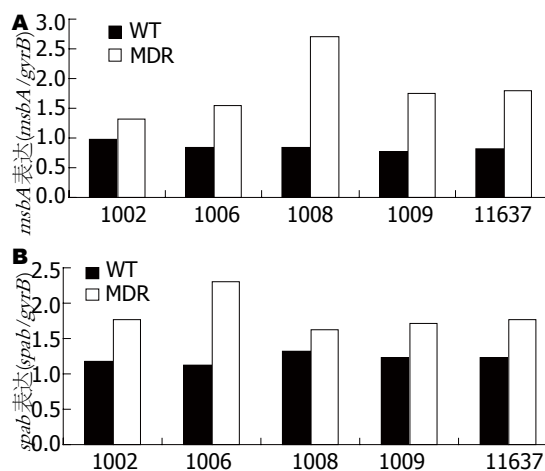


图 1  $msbA$ 和 $spab$ 分别在敏感株和多重耐药株中的表达. A:  $msbA$ ; B:  $spab$ . WT: 野生株; MDR: 诱导多重耐药株. 1002-1006为野生敏感株; 11637为国际标准株

的提高(表2).

**2.2  $H. pylori$   $msbA$ 和 $spab$ 基因检测结果** 随机选择20株临床分离株, 均检测出 $msbA$ 和 $spab$ 基因, 大小分别为303 bp和424 bp, 未发现两种基因的缺失株.

**2.3  $H. pylori$ 敏感株和多重耐药株 $msbA$ 和 $spab$  mRNA的表达水平** 5株敏感株和诱导耐药株中均可检测出不同程度 $msbA$ 和 $spab$ 基因的表达.  $msbA$ 基因在敏感株中相对表达量为 $0.8420 \pm 0.0789$ , 而在多重耐药株中相对表达量为 $1.8200 \pm 0.5310$ , MDR组 $msbA$ 表达明显高敏感组( $P = 0.018$ ).  $spab$ 基因在敏感株中相对表达量为 $1.2180 \pm 0.0743$ , 而在多重耐药株中相对表达量为 $1.8340 \pm 0.2726$ , MDR组 $spab$ 表达明显高敏感组( $P = 0.015$ , 图1).

**2.4  $msbA$ 和 $spab$ 基因敲除株的药敏实验** 成功构建了 $msbA$ 基因敲除株( $H. pylori$  MZ1006 $\Delta$  $msbA$ )和 $spab$ 基因敲除株( $H. pylori$  MZ1006 $\Delta$  $spab$ ).

### ■应用要点

本研究显示ABC转运蛋白基因在*H. pylori*多重耐药中起重要作用. 本文更加全面地阐述了外排泵在*H. pylori*多重耐药机制中的作用, 并为外排泵抑制剂的研究提供了新的理论依据.

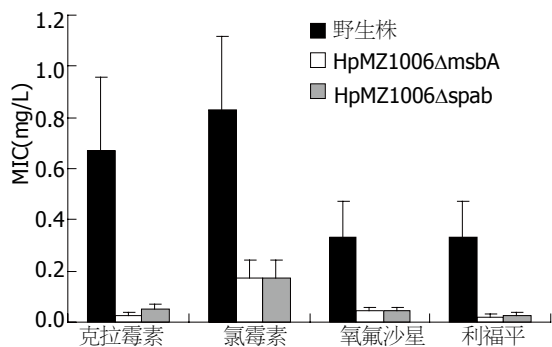


图2 野生株*H. pylori* MZ1006和基因敲除株*H. pylori* MZ1006ΔmsbA和*H. pylori* MZ1006Δspab对4种抗生素的MIC.

*msbA* 基因编码区内1390 bp和*spab* 基因编码区内860 bp大小片段分别被测序并提交GenBank数据库(登录号分别为JF427566和JF427567). 采用琼脂二倍稀释法分别测定9种抗生素(氨苄西林、头孢曲松、四环素、克拉霉素、卡那霉素、氯霉素、氧氟沙星、呋喃唑酮、利福平)对两株基因敲除株的MIC, 与基因敲除前野生株*H. pylori* MZ1006相比, 发现对于*H. pylori* MZ1006ΔmsbA, 克拉霉素的MIC降低了24倍, 氯霉素的MIC降低了5倍, 氧氟沙星的MIC降低了8倍, 利福平的MIC降低了16倍; 对于*H. pylori* MZ1006Δspab, 克拉霉素的MIC降低了12倍, 氯霉素的MIC降低了5倍, 氧氟沙星的MIC降低了8倍, 利福平的MIC降低了12倍(图2).

### 3 讨论

细菌对抗生素的耐药问题, 特别是细菌多重耐药机制, 已成为当前研究的热点. 外排泵(efflux pump)是细菌产生多重耐药的主要原因, 其转运底物非常广泛, 导致细菌对各种结构完全不同的抗菌药物产生耐药. 在外排泵5个家族中, 国内外前期对RND类外排泵做了相关研究, 发现其在革兰阴性菌多重耐药中起重要作用, 我们前期也发现RND类外排泵*hefA*基因在*H. pylori*多重耐药中起重要作用<sup>[12]</sup>. 外排泵抑制剂CCCP和质子泵抑制剂雷贝拉唑、泮托拉唑可以提高多重耐药*H. pylori*对药物的敏感性<sup>[13]</sup>. 但是在革兰阴性菌中, 同一株细菌中可存在不同种类的外排泵<sup>[18]</sup>. 如大肠杆菌中就存在5种家族的外排泵<sup>[19]</sup>. 除了RND家族, 其他家族外排泵在*H. pylori*多重耐药中的作用研究甚少. ABC转运蛋白广泛存在于哺乳动物、细菌、真菌、原虫等细胞中, 是ABC驱动泵的一种, 每个成员都有高度保守的ATP结合盒结构, 以主动转运方式完

成多种分子(包括蛋白质、小肽、氨基酸、环状糖、离子和抗生素)的跨膜转运, 主动转运的能量来自于ATP的水解<sup>[20]</sup>. 宋春花等<sup>[21]</sup>发现在志贺菌基因转移多重耐药株中, 98号ABC转运蛋白表达量相对于敏感株明显上升, 表明其在志贺菌多重耐药中起重要作用.

本研究以ABC转运蛋白中两个典型基因*msbA*和*spab*为研究对象, 在临床胃炎和消化性溃疡患者胃黏膜标本中培养筛选出*H. pylori*敏感株. 采用氯霉素梯度诱导*H. pylori*多重耐药株的方法, 建立了5株*H. pylori*多重耐药模型. 采用琼脂二倍稀释法测定了氨苄西林、头孢曲松、四环素、克拉霉素、氧氟沙星、呋喃唑酮对诱导多重耐药株MIC, 发现相对于敏感株都有不同程度的提高, 提示了外排泵可能在多重耐药株中发挥作用. 也证明了在临床上长期低剂量抗生素的滥用, 会导致细菌耐药. 通过RT-PCR半定量的方法, 发现在诱导多重耐药株中*msbA*和*spab*的表达相对于敏感株有明显的提高( $P = 0.018, 0.015$ ), 说明两种基因可能与*H. pylori*多重耐药密切相关. 对中国*H. pylori*临床分离株MZ1006分别敲除其*msbA*和*spab*基因, 分别使对应的ABC转运蛋白系统失活, 并检测基因敲除前后菌株对9种抗生素的敏感性, 发现对其中4种抗生素敏感性明显上升, 进一步证明了*msbA*和*spab*基因在*H. pylori*的多重耐药中起重要作用. 而且也证明了除了RND家族的外排泵外, ABC转运蛋白家族外排泵也可能在*H. pylori*的多重耐药中起作用.

与细菌多重耐药相关的外排泵可分5个家族. 关于外排泵对药物转运的机制, 还存在有许多争论, 但是目前有两种模型认同度比较高. 一种为“疏水性的真空吸尘器”(vacuum cleaner), 这种模型认为药物能自由移动到膜的脂层, 接触到转运蛋白的中央通道, 药物从中央通道被排除<sup>[22]</sup>, RND家族的外排泵可以使用该模型解释. 另一种是“翻转酶模式”(flippases)模型: 认为药物自由移动到脂层并与转运蛋白接触, 通过酶的翻转将底物送到外膜<sup>[23]</sup>, 酶所需要的能量一般由ATP水解提供, 这种模型被用来描述多种ABC型的外排泵, 如人类MDR3和MRP基因所编码的外排泵<sup>[24]</sup>. 在各类外排泵中, 除ABC转运蛋白类以ATP作为能源外排药物外, 其余各类均以质子驱动力为能量并形成质子与药物的反转运体(antiporters). 随着各种外排泵在细菌耐药中越来越多地被发现, 外排泵抑制剂逐渐成为当前研究的热点. 国内外前期针对*H. pylori*多重耐

药外排泵的研究集中在RND类外排泵, 并对可以逆转 $H.pylori$ 多重耐药的外排泵抑制剂进行了进一步研究. 本研究发现ABC转运蛋白基因与 $H.pylori$ 多重耐药密切相关, 为 $H.pylori$ 外排泵抑制剂的研究提供了新的思路, 为今后临床上研究 $H.pylori$ 多重耐药打下理论基础.

#### 4 参考文献

- Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, Chen X, Li X, Yan Z, Zhang G. Prevalence and risk factors for Helicobacter pylori infection in Chinese populations. *Helicobacter* 2008; 13: 157-165
- Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Davidkov L, Kamburov V, Jeleu C, Mitov I. Prevalence and evolution of Helicobacter pylori resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 409-415
- Wueppenhorst N, Stueger HP, Kist M, Glocker E. Identification and molecular characterization of triple- and quadruple-resistant Helicobacter pylori clinical isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 648-653
- Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol* 2001; 9: 71-79
- Pagès JM, Sandrine AF, Mahamoud A, Bolla JM, Davin-Regli A, Chevalier J, Garnotel E. Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules. *Curr Top Med Chem* 2010; 10: 1848-1857
- Cattoir V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52: 607-616
- Andersen C, Hughes C, Koronakis V. Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* 2002; 185: 83-92
- Hasdemir U. [The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria]. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 309-327
- Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Tikhonova EB, Lau SY, Stratton KL. Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 2003; 8: s862-s873
- Reyes CL, Ward A, Yu J, Chang G. The structures of MsbA: Insight into ABC transporter-mediated multidrug efflux. *FEBS Lett* 2006; 580: 1042-1048
- Woecking B, Reuter G, Shilling RA, Velamakanni S, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW. Drug-lipid A interactions on the Escherichia coli ABC transporter MsbA. *J Bacteriol* 2005; 187: 6363-6369
- Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. Efflux pump gene hefA of Helicobacter pylori plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5217-5222
- Zhang Z, Liu ZQ, Zheng PY, Tang FA, Yang PC. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1279-1284
- Chiu HC, Lin TL, Yang JC, Wang JT. Synergistic effect of imp/ostA and msbA in hydrophobic drug resistance of Helicobacter pylori. *BMC Microbiol* 2009; 9: 136
- 梁晓, 刘文忠, 路红, 徐蔚文, 萧树东. 幽门螺杆菌体外诱导耐药试验和耐药率监测. *中华消化杂志* 2003; 23: 146-148
- Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- Burns BP, Hazell SL, Mendz GL, Kolesnikow T, Tillet D, Neilan BA. The Helicobacter pylori pyrB gene encoding aspartate carbamoyltransferase is essential for bacterial survival. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380: 78-84
- Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 12-26
- Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, Saier MH. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3: 145-150
- Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 682-699
- 宋春花, 黄志刚, 郝园林, 张梅喜, 段广才. 志贺菌基因转移耐药相关蛋白初步分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 838-843
- Raviv Y, Pollard HB, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 3975-3980
- van Veen HW, Higgins CF, Konings WN. Multidrug transport by ATP binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine mechanism. *Res Microbiol* 2001; 152: 365-374
- Ades S, Maxfield LF, Gould CJ, Jones GK, Levy SB. Selection of non-P-glycoprotein mediated high-level etoposide resistant cell lines by adriamycin with P-gp inhibitors. *Int J Oncol* 2006; 28: 747-753

#### 同行评价

本文选题新颖, 设计合理、科学, 具有一定的临床参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

# Tim-3基因多态性与乙型肝炎病毒感染转归的相关性

崔明芳, 郜玉峰, 吕峰, 李娜, 张振华, 李旭, 苏菲

## ■背景资料

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的转归和多种临床表现形式与宿主的免疫功能和遗传因素有关。HBV感染人体后能否被机体清除与免疫功能的强弱密切相关。而在遗传因素中, 已有多个基因的单核苷酸多态性 (SNP) 被证实与 HBV 感染后不同临床转归有关。

崔明芳, 李娜, 张振华, 李旭, 苏菲, 安徽医科大学第一附属医院感染病科 安徽省合肥市 230032  
郜玉峰, 安徽医科大学第二附属医院肝病科 安徽省合肥市 230601  
吕峰, 六安市第一人民医院感染科 安徽省六安市 237000  
国家自然科学基金资助项目, No. 81072342  
973前期专项课题基金资助项目, No. 2009CB526411  
作者贡献分布: 此课题由郜玉峰与崔明芳设计; 标本收集由崔明芳、郜玉峰、张振华、吕峰及李娜完成; 研究过程由崔明芳与郜玉峰完成; 论文撰写由崔明芳完成; 苏菲与李旭对论文校正。  
通讯作者: 苏菲, 教授, 230032, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院感染病科。sufei7782@yahoo.com.cn  
电话: 0551-2922912  
收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-05-04  
接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Association between polymorphisms of the T cell immunoglobulin musin-3 gene and outcome of hepatitis B virus infection

Ming-Fang Cui, Yu-Feng Gao, Feng Lv, Na Li, Zhen-Hua Zhang, Xu Li, Fei Su

Ming-Fang Cui, Zhen-Hua Zhang, Na Li, Xu Li, Fei Su, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Yu-Feng Gao, Department of Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China

Feng Lv, Department of Infectious Diseases, the First People's Hospital of Liu'an, Liu'an 237000, Anhui Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072342; and the Foundation of Pre-973 Program Projects, No. 2009CB526411

Correspondence to: Professor Fei Su, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. sufei7782@yahoo.com.cn

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

Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the T cell immunoglobulin musin-3 (Tim-3) gene and outcome of hepatitis B virus (HBV) infection in a Chinese Han population.

**METHODS:** Two tagSNPs of the Tim-3 gene (rs11741184 and rs13170556) were genotyped

using the SNaPshot method in 996 patients with chronic HBV infection group and 301 patients with acute self-limiting HBV infection. The genotypes, allele frequencies and haplotypes of the two Tim-3 tagSNPs were compared between the two groups of patients.

**RESULTS:** The frequencies of CC, CG and GG genotypes at the rs11741184 locus were 84.39% (254/301), 15.28% (46/301) and 0.33% (1/301) in patients with acute self-limiting HBV infection, and 86.04% (857/996), 13.65% (136/996) and 0.3% (3/996) in patients with chronic HBV infection, respectively. There were no statistical differences in the genotype frequencies at the rs11741184 locus between the two groups of patients (all  $P > 0.05$ ). The frequencies of AA, GA and GG genotypes at the rs13170556 locus were 68.77% (207/301), 28.57% (6/301) and 2.66% (8/301) in patients with acute self-limiting HBV infection, and 68.07% (678/996), 28.41% (283/996) and 3.51% (35/996) in patients with chronic HBV infection, respectively. There were also no statistical differences in the genotype frequencies at the rs13170556 locus between the two groups of patients (all  $P > 0.05$ ). Three haplotypes for Tim-3 tagSNPs (C-A, C-G, G-A) were found in the Chinese Han population, and their haplotype frequencies were similar between patients with acute self-limiting HBV infection (75.08%, 16.94%, 7.97%) and those with chronic HBV infection (75.08% vs 75.15%, 16.94% vs 17.72%, 7.97% vs 7.13%, all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The two Tim-3 tagSNPs may not be associated with outcome of HBV infection in Chinese Han population.

**Key Words:** Tim-3 gene; Hepatitis B virus; Single nucleotide polymorphism; Haplotype

Cui MF, Gao YF, Lv F, Li N, Zhang ZH, Li X, Su F. Association between polymorphisms of T cell immunoglobulin musin-3 gene and outcome of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1506-1510

## 摘要

**目的:** 研究中国汉族人群T淋巴细胞免疫球蛋白

## ■同行评议者

胡国信, 副教授, 南昌大学第一附属医院感染内科

白黏蛋白-3(Tim-3)基因标签单核苷酸多态性(tagSNP)rs11741184C/G和rs13170556A/G位点多态性与乙型肝炎病毒(HBV)感染转归的关系。

**方法:**采用SNaPshot技术检测996例慢性乙型肝炎患者及301例急性HBV感染自限性恢复患者Tim-3基因rs11741184和rs13170556 tagSNP位点的多态性, 计算其基因型和等位基因分布频率及单体型分布频率。

**结果:**Tim-3基因tagSNP rs11741184位点基因型CC、CG、GG在急性乙型肝炎患者中的分布频率分别为84.39%(254/301)、15.28%(46/301)、0.33%(1/301), 在慢性乙型肝炎组中分布频率分别为86.04%(857/996)、13.65%(136/996)、0.3%(3/996), 两组比较无统计学差异; Tim-3基因tagSNP rs13170556基因型AA、GA、GG在急性乙型肝炎患者中的分布频率分别为68.77%(207/301)、28.57%(86/301)、2.66%(8/301), 慢性乙型肝炎组患者中的分布频率分别为68.07%(678/996)、28.41%(283/996)、3.51%(35/996), 两组比较无统计学差异。单体型分析显示, 中国汉族人群中存在3种单体型(C-A、C-G、G-A), 这3种单体型在急性乙型肝炎组分别为75.08%、16.94%、7.97%, 慢性乙型肝炎组分别为75.15%、17.72%、7.13%, 3种单体型与HBV感染的转归均无相关性。

**结论:**中国汉族人群中Tim-3基因tagSNP rs11741184和rs13170556位点多态性可能与HBV感染的转归不具相关性。

**关键词:** Tim-3基因; 乙型肝炎病毒; 单核苷酸多态性; 单体型

崔明芳, 郝玉峰, 吕峰, 李娜, 张振华, 李旭, 苏菲. Tim-3基因多态性与乙型肝炎病毒感染转归的相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1506-1510  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1506.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的转归和多种临床表现形式与宿主的免疫功能和遗传因素有关<sup>[1,2]</sup>. HBV感染人体后能否被机体清除与免疫功能的强弱密切相关<sup>[2,3]</sup>. 而在遗传因素中, 已有多个基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)被证实与HBV感染后不同临床转归有关<sup>[4,5]</sup>.

Tim-3基因定位于人类第5号染色体, 是Tim基因家族的一个重要成员, 其编码表达的膜蛋

白不表达于初始T淋巴细胞, 而特异性地表达于活化的Th1细胞的表面, 并且可以作为抑制分子下调Th1型细胞反应, 从而导致机体的免疫监视能力的削弱<sup>[6]</sup>. 研究表明Tim-3基因的表达与许多免疫相关性疾病的发生密切相关. Ju等<sup>[7]</sup>研究发现慢性乙型肝炎肝患者外周血单个核细胞(尤其是NK细胞和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞)和肝脏内单个核细胞上Tim-3表达显著增高, 首次证实了HBV感染可上调Tim-3的表达, 提示Tim-3很可能在HBV感染的过程中同样发挥着重要的作用. 另有研究表明, Tim-3基因存在多个SNPs多态性位点, 目前已鉴定人类的Tim-3启动子区-574G>T及编码区4259G>T多态性位点主要与哮喘、遗传性过敏症、过敏性鼻炎、类风湿关节炎等疾病的易感性有关<sup>[8]</sup>. Tim-3基因多态性是否与HBV感染的转归密切相关, 目前尚见报道. 在SNP的研究设计中, Zhang等<sup>[9]</sup>提出了决定关联研究效能的3个因素: 标签SNP(tagSNP)的选择, 不同的疾病模型和检验统计学方法的应用. 因此, 我们将已收集的急慢性HBV感染标本采用SNaPshot技术对筛选出的Tim-3基因tagSNP rs11741184和rs13170556位点进行了检测, 以探讨其tagSNP位点基因型和单体型与HBV感染转归之间的相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2009-01/2010-06在安徽医科大学第一附属医院及第二附属医院感染病科诊治的HBV感染恢复期患者(病例组)301例, 男166例, 女135例, 年龄14-60(平均年龄44.31)岁; 同时选取慢性乙型肝炎患者(对照组)996例, 男693例, 女303例, 年龄12-65(平均年龄44.86)岁. HBV感染恢复期患者定义为HBsAg阴性, HBsAb/HBeAb/HBcAb阳性, ALT正常, HBV DNA阴性, 排除既往有乙肝疫苗接种史者. 慢性乙型肝炎患者的诊断均符合2005年慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准<sup>[10]</sup>. 两组患者均排除甲、丙、戊型肝炎病毒和HIV合并感染. 以上两组年龄、性别均无统计学差异( $P>0.05$ ).

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组DNA提取:** 采集慢性HBV感染患者及急性自限性HBV感染恢复期患者外周血5 mL, 使用EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝, 常规酚-氯仿抽提法提取基因组DNA, 紫外分光光度计和0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和纯度后于-80℃保存备用。

**1.2.2 多态性位点的选择及引物设计:** Tim-3基因tagSNP的选择: 以LD的标准及SNP在功能上

## ■ 研发前沿

大量研究表明, 宿主遗传因素在乙型肝炎病毒感染的转归中起着重要作用, 尤其是与抗病毒免疫相关的基因是近年来的研究热点。

## ■ 相关报道

Chae等研究发现韩国人群中Tim-3基因的-574T/G多态性与哮喘、变应性鼻炎和类风湿关节炎相关; 4259G/T多态性与哮喘无相关性, 但与变应性鼻炎和类风湿关节炎相关. 张才成等发现湖北汉族人群中Tim-3基因启动子区-574T/G多态性与哮喘相关, 而-1514T/C位点与哮喘无相关性。

### ■创新盘点

本研究采用多重单碱基延伸SNP分型技术(SNaP-shot)首次对Tim-3基因两个tagSNP位点多态性与HBV感染转归的关系进行研究,具有创新性。

的重要性,或与免疫疾病相关的文献报道作为选择tagSNP依据。tagSNP的选择和基因分型数据来自人类基因库(<http://www.hapmap.org>)中的汉族人群。所有的tagSNP以LD相关系数 $r^2 = 0.8$ ,等位基因频率(MAF) $>10\%$ 为选择标准,根据hapmap数据库中汉族人Tim-3基因信息作为tagSNP的标准,选择出Tim-3基因rs11741184和rs13170556两个tagSNP位点。引物设计与合成:检索美国国立生物技术信息中心(NCBI)公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中SNP位点序列。用Primer3软件设计引物及延伸引物。Tim-3基因多态性PCR扩增引物,rs13170556的引物序列:F: CCCACAACACAGAAGGGCACAT; R: TGGACCATCCCTTTTACAACATCA; SnaPshot延伸引物序列为TTTTTTTTTTTTTTTTCACAGGATGGCTGAGTCCT; rs11741184的引物序列:F: TGTAACAGCCCAGGCATTTTCA; R: CAGGAACGAAGGTCAAGACAGGAG; SnaPshot延伸引物序列为TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGTTCTCAGCCCTGACTGTT。

1.2.3 PCR反应体系及反应条件程序: (1)PCR扩增反应和产物的纯化: PCR反应体系为15  $\mu\text{L}$ ,包括10 $\times$ 缓冲液1.5  $\mu\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{L}$  dNTP混合物(10 mmol/L), 0.9  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L), 0.1  $\mu\text{L}$  HotstarR Taq DNA聚合酶, PCR引物(10 pmol/L)各0.5  $\mu\text{L}$ 和1  $\mu\text{L}$  DNA模板(20 mg/L)。多重PCR反应采用Touch-down PCR反应程序: 95  $^\circ\text{C}$ 变性15 min, 94  $^\circ\text{C}$ 变性40 s, 63  $^\circ\text{C}$ 退火1 min, 每个循环下降0.5  $^\circ\text{C}$ , 72  $^\circ\text{C}$ 延伸1.5 min, 15个循环。然后94  $^\circ\text{C}$ 变性40 s, 56  $^\circ\text{C}$ 退火40 s, 72  $^\circ\text{C}$ 延伸1.5 min, 25个循环。最后72  $^\circ\text{C}$ 延伸8 min。结束后4  $^\circ\text{C}$ 保存。PCR扩增后,取PCR反应产物1.5  $\mu\text{L}$ 做琼脂糖凝胶电泳检测有片段的表明实验成功。PCR产物纯化: 在15  $\mu\text{L}$  PCR产物中加入5 U SAP和2 U *Exo* I,震荡混匀,37  $^\circ\text{C}$ 保温1 h,然后75  $^\circ\text{C}$ 保温15 min以灭活SAP和*Exo* I酶。纯化好的模板可以在4  $^\circ\text{C}$ 保存24 h或-20  $^\circ\text{C}$ 长期保存; (2)SNaPshot反应: 取纯化好的PCR产物、每条浓度为0.2  $\mu\text{mol/L}$ 的SNaPshot引物混合物、SNaPshot荧光混合物(含Ampli Taq DNA多聚酶和不同荧光标记的ddNTP)组成一个PCR反应体系。SNaPshot反应程序: 96  $^\circ\text{C}$ 变性10 s; 然后96  $^\circ\text{C}$ 变性10 s, 53  $^\circ\text{C}$ 退火5 s, 60  $^\circ\text{C}$ 延伸30 s, 25个循环。最后60  $^\circ\text{C}$ 延伸30 s。结束后4  $^\circ\text{C}$ 保存。SNaPshot PCR产物用SAP纯化,在10  $\mu\text{L}$ 上述SNaPshot PCR产

物中加入1 U SAP或者1 U CIP,震荡混匀,37  $^\circ\text{C}$ 保温1 h,保温15 min以灭活酶,4  $^\circ\text{C}$ 可保存24 h或-20  $^\circ\text{C}$ 长期保存; (3)DNA测序仪测序: 首先将SNaPshot产物稀释20倍。每份样品中加入高纯甲酰胺(Hi-Di Formamide)8.6  $\mu\text{L}$ , GeneScan-120 LIZ Size Standard 0.9  $\mu\text{L}$ , SNaPshot纯化产物0.5  $\mu\text{L}$ , 总体积10  $\mu\text{L}$ , 95  $^\circ\text{C}$ 变性5 min,迅速冰冷4 min。在ABI 3730XL型DNA序列检测仪上进行毛细管电泳,运行GeneMapper 4.0软件分析实验结果。为保证结果准确性,随机抽取5%样本进行直接测序验证SNaPshot方法的准确性。

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件进行统计分析,并检测HBV感染恢复期组(病例组)及慢性乙型肝炎患者组(对照组)基因型频率和等位基因频率是否符合Hardy-Weinberg平衡,以检验样本的群体代表性;以 $\chi^2$ 检验比较所测位点各基因型频率在比较组间的差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。以优势率(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence intervals, 95%CI)表示各基因型发生频率在不同比较组间的相对危险度,所有统计检验均为双侧概率检验。

## 2 结果

2.1 Tim-3基因型及等位基因在病例组与对照组中的分布及患病风险估计 采用SNaPshot技术对Tim-3 Tag SNP rs11741184和rs13170556的多态性进行检测,根据碱基峰值的位置和颜色判断基因型。2个位点的基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡( $P > 0.05$ )。rs11741184位点基因型CC、CG、GG在急性HBV感染组和慢性HBV感染组中分布频率分别为84.39%、15.28%、0.3%, 86.04%、13.65%、0.3%,两组之间比较差异无统计学意义( $P = 0.7719$ )。等位基因C、G在病例组与对照组中分布频率分别为92.03%、7.97%, 92.87%、7.13%,两组比较差异无统计学意义( $P = 0.4857$ )。rs13170556位点基因型以AA、GA、GG在病例组和对照组中分布频率分别为68.77%、28.57%、2.66%, 68.07%、28.41%、3.51%,病例组与对照组之间比较差异无统计学意义( $P = 0.7673$ )。等位基因A、G在病例组与对照组中分布频率分别为83.06%、16.94%, 82.28%、17.72%,两组比较差异无统计学意义( $P = 0.4857$ ,表1)。

2.2 Tim-3基因tagSNP单体型分析及患病风险估计 我们依据SHEsis软件计算得到3种单体型(C-A、C-G、G-A),其频率在急性组分别为

表 1 两组患者Tim-3基因SNP位点基因型及等位基因频率比较

多态位点	基因型	病例组n(%)	对照组n(%)	P值	OR(95%CI)
rs11741184	CC	254(0.8439)	857(0.8604)	0.7719	0.8859(0.6301-1.2456)
	CG	46(0.1528)	136(0.1365)		
	GG	1(0.0033)	3(0.0030)		
	C	554(0.9203)	1 850(0.9287)	0.4857	0.8859(0.6301-1.2456)
rs13170556	G	48(0.0797)	142(0.0713)		
	AA	207(0.6877)	678(0.6807)	0.7673	1.0558(0.8288-1.3448)
	GA	86(0.2857)	283(0.2841)		
	GG	8(0.0266)	35(0.0351)		
	A	500(0.8306)	1 639(0.8228)	0.6603	1.0558(0.8288-1.3448)
	G	102(0.1694)	353(0.1772)		

■应用要点

本文通过对 (tagSNP)rs11741184 C/G 和 rs13170556A/G 位点多态性HBV 感染转归的关系进行研究, 表明中国汉族人群中 Tim-3基因tagSNP rs11741184 和 rs13170556位点多态性可能与乙型肝炎病毒感染的转归不相关。

表 2 两组患者Tim-3基因SNP位点单体型分布频率比较

单体型	病例组n(%)	对照组n(%)	P值	OR(95%CI)
CA	452(0.7508)	1497(0.7515)	0.9732	0.9964(0.8070-1.2302)
CG	102(0.1694)	353(0.1772)	0.0603	0.9472(0.7436-1.2065)
GA	48(0.0797)	142(0.0713)	0.4857	0.1288(0.8029-1.5871)
GG	-	-	-	-

75.08%, 16.94%, 7.97%, 对照组分别为75.15%, 17.72%, 7.13%, 3种单体型与HBV感染的转归无相关性( $P>0.05$ , 表2)。

3 讨论

Tim基因家族是在研究Th细胞表面受体时发现的一个新的基因家族, 位于染色体5q33.2, 由3个成员组成(Tim-1, -3, -4)。Tim-3由281个AA组成, 主要表达于分化的Th1细胞表面, 负性调节Th1细胞免疫应答, 对维持体内Th1/Th2细胞间平衡可能起重要作用, 而Th1/Th2细胞的平衡失调在诸多免疫相关致病机制中起着重要的作用<sup>[11,12]</sup>。Ju等<sup>[7]</sup>在HBV感染小鼠流体力学模型Tim-3功能及表达的研究中发现, Tim-3扮演了HBV T细胞应答中的一个有效调节因子的角色, Tim-3可能参与HBV感染后的免疫调控。他们认为Tim-3在NK细胞上高表达, 而NK细胞在抗病毒感染免疫中发挥着重要的作用<sup>[13-15]</sup>, 而且已有研究显示在慢乙肝患者体内NK细胞处于耐受状态<sup>[16,17]</sup>。这提示Tim-3作为一种负性调控分子, 很可能直接或者与其他分子协同向NK细胞内传到负性信号, 抑制NK细胞功能, 影响慢乙肝患者的免疫状态。Jones等<sup>[18]</sup>研究发现HIV感染的患者体内CD8<sup>+</sup> T细胞上Tim-3表达升高。推测Tim-3的表达升高可能是病毒逃避宿主免疫的一种病理机制或者是

宿主为控制免疫损伤而在慢性免疫活化状态基础上产生的一种生理性反应。Ju等<sup>[7]</sup>发现外周血CD8<sup>+</sup> T细胞上Tim-3表达升高, 推测表达上调的Tim-3可能是抑制细胞功能, 从而促进病毒逃逸的发生。

Tim-3分子的启动子和编码区域均发现有SNP存在, 并且这些SNP可能与机体对疾病的易感性或耐受性相关<sup>[19]</sup>。目前研究结果表明人类Tim-3基因多态性主要与哮喘、遗传性过敏症、变应性鼻炎、类风湿关节炎等疾病的易感性有关。Cornillon等<sup>[20]</sup>研究发现韩国人群中Tim-3基因的-574T/G多态性与哮喘、变应性鼻炎和类风湿关节炎相关; 4259G/T多态性与哮喘无相关, 但与变应性鼻炎和类风湿关节炎相关。张才成等<sup>[21]</sup>发现湖北汉族人群中Tim-3基因启动子区-574T/G位点多态性与哮喘相关, 而-1541T/C位点与哮喘无相关性。Tim-3基因多态性是否与HBV的感染和转归有关尚不明确。Tag SNP是人类基因组中多态性中具有代表和特征性的SNP, 是通过连锁不平衡分析捕获的能代表整个设定区域序列变异的SNP, 能大大提高关联分析的效果, 并降低基因分型的工作量及研究费用, 成为目前在多因素疾病研究中最感兴趣和最常使用的方法。因此, 在本研究中, 我们通过Kim等<sup>[22]</sup>开发的Quick SNP筛选出rs11741184和

### 同行评价

本文结果可信, 数据详实, 具有一定的科学性、创新性和可读性。

rs13170556两个tagSNP位点进行了研究。另外, 本研究选取HBV感染后自限性恢复患者作为研究对象, 增加疾病发生与否的信息, 使得研究结果更加准确、可靠。因此, 我们通过对301例HBV感染恢复期患者、996例慢性乙型肝炎患者rs11741184和rs13170556两个位点基因型及等位基因频率的研究, 明确Tim-3基因多态性在中国汉族人群中分布情况及其与HBV持续感染后疾病转归的关系, 结果显示, Tim-3 tag SNP位点基因多态性在HBV感染自限性感染患者、慢性HBV感染者中的分布无统计学差异, 提示这两个SNP位点基因多态性可能不影响HBV感染后疾病的转归, 可能与以下因素有关: (1)SNP在不同的人群中分布频率可能不一样, 杂合程度未必相同; (2)HBV感染后的转归与多种因素有关, 疾病的发生发展机制非常复杂, Tim-3基因多态性在HBV感染的转归中不起着重要的作用。因此, 虽然本研究未发现Tim-3 tagSNP rs11741184和rs13170556两个多态性位点与中国汉族人群HBV感染的转归有相关性, 但我们不能排除这两个位点与其他人群HBV感染的转归有关。也不排除Tim-3基因的其他位点与HBV感染的转归有相关性, Tim-3基因的多态性是否影响是Tim-3蛋白的表达和功能, 并进而影响了Tim-3分子在HBV感染中的调控还有待于进一步研究。

### 4 参考文献

- Frodsham AJ. Host genetics and the outcome of hepatitis B viral infection. *Transpl Immunol* 2005; 14: 183-186
- Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- Deng G, Zhou G, Zhai Y, Li S, Li X, Li Y, Zhang R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Wang Y, He F. Association of estrogen receptor alpha polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 318-326
- He YL, Zhao YR, Zhang SL, Lin SM. Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4788-4793
- Gielen AW, Lobell A, Lidman O, Khademi M, Olsson T, Piehl F. Expression of T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecules-1 and -3 (TIM-1 and -3) in the rat nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* 2005; 164: 93-104
- Ju Y, Hou N, Zhang XN, Zhao D, Liu Y, Wang JJ, Luan F, Shi W, Zhu FL, Sun WS, Zhang LN, Gao CJ, Gao LF, Liang XH, Ma CH. Blockade of Tim-3 pathway ameliorates interferon-gamma production from hepatic CD8+ T cells in a mouse model of hepatitis B virus infection. *Cell Mol Immunol* 2009; 6: 35-43
- Graves PE, Siroux V, Guerra S, Klimecki WT, Martinez FD. Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 650-656
- Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1386-1394
- 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 881-891
- Cao E, Zang X, Ramagopal UA, Mukhopadhyaya A, Fedorov A, Fedorov E, Zencheck WD, Lary JW, Cole JL, Deng H, Xiao H, Dilorenzo TP, Allison JP, Nathenson SG, Almo SC. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 2007; 26: 311-321
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6: 1245-1252
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 503-510
- Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; 306: 1517-1519
- Monsalve-De Castillo F, Romero TA, Estévez J, Costa LL, Atencio R, Porto L, Callejas D. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1372-1375
- Ono K, Yamanaga Y, Yamamoto K, Koga SI, Nishimura J, Nawata H. Natural killing activities in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *J Clin Immunol* 1996; 16: 41-45
- Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schwenker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hyrcza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008; 205: 2763-2779
- Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2004; 95: 91-95
- Cornillon B, Cathiard AM, Eldin P, Anoaï M, Cardinaud R, Liautard JP, Le Cunff M, Mornet D, Pons F, Leger J. Probing myosin light chain 1 structure with monoclonal antibodies. *J Muscle Res Cell Motil* 1992; 13: 329-340
- 张才成, 吴健民, 崔天益, 王平, 潘世秀. 湖北汉族人群TIM-3基因多态性与变应性哮喘的相关性. *中华医学遗传学杂志* 2006; 23: 74-77
- Kim SH, Kim TS. Squash smear findings of eosinophilic granular bodies in pilocytic astrocytoma. *Acta Cytol* 2007; 49: 112-114

# 血清胃蛋白酶原检测在胃癌及其癌前病变筛查中的价值

张志镒, 王贵齐, 吴正奇, 卢林芝, 贺舜, 赵光源, 刘金殿

张志镒, 吴正奇, 卢林芝, 赵光源, 刘金殿, 甘肃省武威肿瘤医院 甘肃省武威市 733000  
王贵齐, 贺舜, 中国医学科学院肿瘤医院 北京市 100021  
作者贡献分布: 张志镒、王贵齐及吴正奇直接参与此课题的酝酿、设计和实施, 文献检索, 数据统计、分析, 获取研究经费, 行政、技术等工作支持; 文章撰写由张志镒完成; 卢林芝、贺舜、赵光源及刘金殿参与此课题的实施、统计分析、技术与材料支持。  
通讯作者: 张志镒, 主任医师, 733000, 甘肃省武威市海藏路卫生巷31号, 甘肃省武威肿瘤医院. zlyzyzy@163.com  
电话: 0935-2268162 传真: 0935-2268166  
收稿日期: 2011-03-11 修回日期: 2011-04-23  
接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Value of serum pepsinogens in the screening of gastric carcinoma and precancerous lesions

Zhi-Yi Zhang, Gui-Qi Wang, Zheng-Qi Wu, Lin-Zhi Lu, Shun He, Guang-Yuan Zhao, Jin-Dian Liu

Zhi-Yi Zhang, Zheng-Qi Wu, Lin-Zhi Lu, Guang-Yuan Zhao, Jin-Dian Liu, Wuwei Tumor Hospital, Wuwei 733000, Gansu Province, China

Gui-Qi Wang, Shun He, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

Correspondence to: Zhi-Yi Zhang, Wuwei Tumor Hospital, 31 Weishengxiang, Haizang Road, Wuwei 733000, Gansu Province, China. zlyzyzy@163.com

Received: 2011-03-11 Revised: 2011-04-23

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the value of serum pepsinogens (PG) in the screening of gastric carcinoma and precancerous lesions.

**METHODS:** We chose asymptomatic people aged over 35 years who had a history of gastric diseases or a family history of gastric carcinoma and came from a high-risk area for gastric carcinoma to measure serum PG levels by immunoturbidimetric assay and to conduct endoscopic biopsy and pathological examination. The relationship of serum levels of PGI, PGII, and PGI/II ratio with the incidence of gastric carcinoma and precancerous lesions was evaluated.

**RESULTS:** Of 918 people detected, 718 (78.21%) were tested negative and 200 (21.79%) positive

for serum PG. The positive rate of serum PG (69.50%) was highest in people in the age group of 40-60 years (69.50%). The total rate of detection of gastric carcinoma was 0.76%. The rate of detection of early gastric carcinoma was 71.43%, while that of advanced gastric carcinoma was 28.57%. In PG-positive people, the rates of detection of gastric carcinoma, high-, and low-grade intraepithelial neoplasia was 1.50%, 1.00% and 11.50%, respectively, while the corresponding percentages in PG-negative people were 0.56%, 0.00% and 7.52%. There were significant differences in the rates of detection of carcinoma and precancerous lesions between PG-positive-negative people (all  $P < 0.01$ ). In PG-positive patients, the rate of detection of early gastric carcinoma was 66.67%, and the sensitivity and specificity were 42.86% and 78.38%, respectively.

**CONCLUSION:** Measurement of serum pepsinogens can improve the rates of detection of gastric carcinoma and precancerous lesions, especially in people aged from 40 to 60 years.

**Key Words:** Pepsinogen; Stomach neoplasms; Precancerous lesions; Pathology

Zhang ZY, Wang GQ, Wu ZQ, Lu LZ, He S, Zhao GY, Liu JD. Value of serum pepsinogens in the screening of gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1511-1514

## 摘要

**目的:** 探讨血清胃蛋白酶原(PG)检测在胃癌及其癌前病变筛查中的价值。

**方法:** 在胃癌高发区对35岁以上无症状、有胃病史及胃癌家族史者进行内镜筛查。同时采用免疫比浊法测定受检者血清PG水平, 结合内镜活检和病理检查结果, 对比分析接受受检者血清PG I、PG II水平和PG I/II值与胃癌及其癌前病变的关系。

**结果:** 内镜筛查共计918例, 其中PG阴性718例(78.21%); 阳性200例(21.79%), 阳性人群中以40-60岁最多139例(69.50%); 总体胃癌检出率7/918(0.76%), 早期胃癌检出率

## 背景资料

血清胃蛋白酶原(PG)的多少是反映胃黏膜病变状况, 其中胃蛋白酶原I型是由胃底腺主细胞分泌的, 胃蛋白酶原II型是由胃窦、幽门腺和十二指肠腺分泌的, 胃黏膜的萎缩可使血清胃蛋白酶原水平PG I/II型比值改变。通过检测血清中胃蛋白酶原的含量就可确定胃癌高危人群, 接着行胃镜检查, 以便发现胃癌癌前疾病、癌前病变及早期胃癌, 并对其病变进行及时治疗, 可以降低胃癌发病率和死亡率。

## 同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

## ■研究前沿

目前早期胃癌或胃癌高危人群筛查方法较多,且不理想;在我国大规模开展胃癌筛查的条件尚不具备,WHO也不推荐大规模地开展胃癌筛查,故开发以血清PG检测为初筛寻找出胃癌高危人群,再以胃镜精查的二步普查法,此方案已成为胃癌筛查的方向。

为5/7(71.43%),进展期为2/7(28.57%);PG阳性癌检出率3/200(1.50%),高级别上皮内瘤变检出率2/200(1.00%),低级别上皮内瘤变检出率23/200(11.50%);PG阴性癌检出率4/718(0.56%),高级别上皮内瘤变检出率0/718(0.00%),低级别上皮内瘤变检出率54/718(7.52%);PG阳性与PG阴性之间胃癌及其癌前病变检出率有显著性差异( $P<0.01$ )。PG阳性中早期胃癌检出率为2/3(66.67%),胃癌诊断的敏感性42.86%,特异性78.38%。

**结论:**以血清PG水平作为初筛,再行内镜及病理检查,可提高胃癌及其癌前病变的筛查率。为尽快开展防治胃癌,该方法仍不失其有效性,特别在40-60岁人群中开展更为有意义。

**关键词:**胃蛋白酶原类;胃肿瘤;癌前病变;病理学

张志镒,王贵齐,吴正奇,卢林芝,贺舜,赵光源,刘金殿.血清胃蛋白酶原检测在胃癌及其癌前病变筛查中的价值.世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1511-1514

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1511.asp>

## 0 引言

20世纪90年代,甘肃省武威市进行了恶性肿瘤发病登记工作,登记资料结果显示该地区胃癌年发病率59.25/10万,男性为87.36/10万,女性为30.06/10万,属胃癌高发区<sup>[1]</sup>。近年来,当地进行了大量的胃癌防治工作,但胃癌的发病率和死亡率并无下降趋势,且中青年胃癌发病率有上升趋势<sup>[2,3]</sup>。同时医院的胃癌早期发现率长期处于5%的左右。因此,急需建立一种适合大范围开展、对人体无害、简便可靠和费用低廉的筛查方法,实施胃癌早诊早治,以期提高胃癌治疗效果,减低死亡率。近10年来,国内外开发以血清胃蛋白酶原(pepsinogen, PG)检测为初筛方法寻找出胃癌高危人群,再辅以胃镜及病理检查进行精筛的序贯筛查法,取得了一定的效果<sup>[4-9]</sup>。为进一步验证此方法的可行性,2008-12-05/2010-01-09,我们对武威市凉州区两个乡镇的部分自然人群同时进行了血清PG的检测和胃镜检查,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌筛查范围涉及武威市凉州区2个乡镇(西营镇、下双乡)中的5个自然村,自然人口约1万,受检者主要为35岁以上无症状、有胃病史及胃癌家族史志愿者。为进一步评价血清PG检测在胃癌筛查中的作用,此次筛查同时采用血清

PG检测和胃镜检查。

### 1.2 方法

**1.2.1 筛查流程:**(1)受检者签署知情同意书;(2)由专人负责对受检者进行流行病学调查,填写调查表、登记表及信息核对;(3)对受检者进行常规体检;(4)按照要求对受检者进行血样采集、血样分离及病毒指标检测,并按照PG检测的要求处理血样,留取500  $\mu$ L以上血清样本送PG检测;(5)受检者接受胃镜检查,操作者按筛查方案要求完成染色、黏膜活检与病理检查,胃镜常规取材包括窦部1块,体部1块,胃角部1块,病灶处2-3块,同时胃内关键部位时行图像采集。

**1.2.2 PG检测及结果判定:**血清样本送至中国医学科学院肿瘤医院检验科,利用日立7600型全自动生化分析仪检测PG水平。按试剂提供及日本三木<sup>[9]</sup>报道的标准并加以分级。阴性:PG I >70  $\mu$ g/L,或PG I/II比值>3;轻度阳性PG I  $\leq$  70  $\mu$ g/L,同时PG I/II比值 $\leq$ 3;中度阳性:PG I  $\leq$  50  $\mu$ g/L,同时PG I/II比值 $\leq$ 2.5;重度阳性:PG I  $\leq$  30  $\mu$ g/L,同时PG I/II比值 $\leq$ 2.0。

**1.2.3 病理诊断:**取材后标本组织放置入40 g/L甲醛脱水固定,常规石蜡制片,行HE与Gimsa染色,由经验丰富的3名病理医师诊断,以2/3医师取得同一诊断为最后诊断。诊断标准:(1)萎缩性胃炎:内镜活检标本中有任何一块组织中出现有胃黏膜固有腺体萎缩即可诊断为萎缩性胃炎;(2)肠上皮化生:内镜活检标本中有任何一块组织中出现有胃黏膜肠上皮化生即可诊断为胃黏膜肠上皮化生<sup>[10]</sup>;(3)低级别上皮内瘤变:胃黏膜上皮轻-中度异型增生;(4)高级别上皮内瘤变:胃黏膜重度异型增生;(5)早期胃癌:癌组织局限以黏膜内及黏膜下层;(6)晚期胃癌:癌组织浸透黏膜下层<sup>[11]</sup>。

**统计学处理** 对所得数据进行统计学处理,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 受检人群状况** 实查918例,其中男445例,占48.47%;女473例,占51.53%。40-60岁之间645例,占受检例数的70.26%(表1)。

**2.2 PG结果** PG检测阴性者718例,占总检查例数的78.21%;PG检测阳性者200例,占总检查例数的21.79%,男99例(49.50%),女101例(50.50%),基本相近。与年龄的关系,阳性人群中以40-60岁最多139例(69.50%),视为重点监测对象。而阳性

## ■相关报道

林三仁等建立了包括概率数字模型计算机筛查、超微量胃液系列分析筛查和癌胚抗原(CEA)单克隆抗体筛查的三级筛查工具,以及胃镜和病理为最终手段的胃癌序贯筛查法。

表 1 受检人群状况 *n*(%)

年龄组	男	女	合计
35-40岁	102(11.11)	123(13.40)	225(24.51)
41-50岁	170(18.52)	192(20.92)	362(39.44)
51-60岁	119(12.96)	122(13.29)	241(26.25)
61-70岁	53(5.77)	35(3.81)	88(9.58)
>71岁	1(0.11)	1(0.11)	2(0.22)
合计	445(48.47)	473(51.53)	918(100.00)

表 2 200份血清阳性分布状况 *n*(%)

年龄组	PG(+)	PG(++)	PG(+++)	合计
35-40岁	14(42.42)	11(33.33)	8(24.25)	33(16.50)
41-50岁	25(35.71)	21(30.00)	24(34.29)	70(35.00)
51-60岁	20(31.75)	18(28.57)	25(39.68)	63(31.50)
61-70岁	12(38.71)	10(32.26)	9(29.03)	31(15.50)
>71岁	0(00.00)	1(33.33)	2(66.67)	3(1.50)
合计	71	61	68	200

■应用要点

该方法简单快捷、准确、稳定, 筛查胃癌的例数较其他方法检出率皆高. 由于PG检测对于病变程度在慢性萎缩性胃炎以上的病变有较高的敏感性, 因此, PG测定是一项检测慢性萎缩性胃炎这一胃癌高危人群较可靠的方法, 从这一角度来看, PG检测更适合于初筛胃癌高危人群, 特别在胃癌高发区开展更有价值.

表 3 PG与胃镜阳性率的关系 (*n*)

PG	浅表性胃炎	萎缩性胃炎	胃息肉	胃溃疡	球溃疡	肉眼可疑癌
PG(+)	49	139	21	3	0	1
PG(-)	210	226	35	33	21	4
合计	259	365	56	36	21	5

表 4 PG与病理结果

PG	浅表性胃炎	萎缩性胃炎	肠上皮化生	低级别上皮内瘤变	高级别上皮内瘤变	早期胃癌	进展期胃癌	合计
PG(-) <i>n</i> (%)	326(45.40)	243(33.85)	91(12.67)	54(7.52)	0(00.00)	3(0.42)	1(0.14)	718(100.00)
PG(+) <i>n</i> (%)	18(9.00)	109(54.50)	45(22.50)	23(11.50)	2(1.00)	2(1.00)	1(0.50)	200(100.00)
合计 <i>n</i>	344	352	136	77	2	5	2	918

程度看不出差异(表2).

2.3 PG与胃镜诊断 本组除检出胃癌及癌前病变患者外, 还筛查出一批不同类型的胃病者(表3).

2.4 胃癌及癌前病变的检出率 总体胃癌检出率7/918(0.76%), 早期胃癌检出率为5/7(71.43%), 进展期为2/7(28.57%). PG阳性癌检出率3/200(1.50%), PG阳性高级别上皮内瘤变、低级别上皮内瘤变、肠上皮化生、萎缩性胃炎检出率分别为2/200(1.00%)、23/200(11.50%)、45/200(22.50%)、109/200(54.50%); PG阴性癌检出率4/718(0.56%), PG阴性高级别上皮内瘤变、低级别上皮内瘤变、肠上皮化生、萎缩性胃炎检出率分别为0/718(00.00%)、54/718(7.52%)、91/718(12.67%)、243/718(33.85%); PG阳性与PG阴性之间胃癌及其癌前病变和萎缩性胃炎检出率有显著性差异( $P < 0.01$ ). PG阳性中早期胃癌检出率为2/3(66.67%)(表4).

2.5 PG检测的评价 PG作为胃癌的诊断方法敏感性为42.86%, 阳性预测值为1.50%; 萎缩性胃炎以上病变的诊断方法敏感性为31.70%, 阳性预测值为91.00%(表5).

2.6 检出胃癌的病理类型 本组检出胃癌7例,

其中高分化腺癌3例(42.86%), 黏膜内腺癌2例(28.57%), 低分化腺癌(进展期)2例(28.57%).

3 讨论

我区在1998年总结的胃液采集器筛查胃癌, 结果在1 433例中246例为阳性(17.17%). 结果发现进展期胃癌2例, 早期为2例, 胃癌的检出率1.6%<sup>[12]</sup>, 组织这一筛查, 胃癌高危人群筛查与本研究相比, 投入大、过程相对复杂. 本法较胃液筛查法简单, 群众易于接受. 2007年首都医科大学附属北京友谊医院消化科、兰州大学第二医院和甘肃省武威肿瘤医院共同合作, 以PG I、I/II比值作为胃癌高危人群筛查, 对自然人群中的35-70岁之间的无症状志愿者2 346例进行了PG水平的检测, 其PG阳性者634例, 占27.02%; 而阳性者再胃镜活检精查, 结果总体胃癌检出率10/2 346(0.43%), PG阳性胃癌检出率10/634(1.58%), 早期胃癌检出率为9/10(90.00%)<sup>[13]</sup>. 日本小松采用此方法筛查, 报道PG阳性率30.00%; 总体胃癌检出率0.50%, PG阳性胃癌检出率1.70%<sup>[14,15]</sup>. 井上报报道PG阳性率29.00%; 总体胃癌检出率0.42%, PG阳性胃癌检出率1.50%<sup>[14,15]</sup>.

### ■同行评价

本文选题恰当, 结果可靠, 具有较好的科学和临床意义.

表 5 PG检测的评价 (%)

统计指标	胃癌的诊断评价	萎缩性胃炎以上病变的诊断评价
敏感性	42.86	31.70
特异性	78.38	94.77
阳性预测值	1.50	91.00
阴性预测值	99.44	45.40

本组统计显示, PG阳性者200例, 占总检查人数的21.79%; 总体胃癌检出率7/918(0.76%), PG阳性癌检出率3/200(1.50%), PG阳性中早期胃癌检出率为2/3(66.67%), 与既往研究报道基本相符, 因此在本地区可采用此方法作为胃癌初筛应用于人群.

该方法简单快捷、准确、稳定. 但是, 本组统计结果显示, PG作为胃癌的诊断方法敏感性仅为42.86%, 阳性预测值为1.5%. 同时有4例胃癌患者, PG为检测结果为阴性, 这一现象可能与本组以PG I、I/II比值阳性值偏低和未分化癌比例较高有关<sup>[13]</sup>. 因此单纯应用此方法进行胃癌初筛可能会漏掉一部分胃癌病例, 在初筛中尚需结合其他方法, 如流行病学调查评价胃癌危险因素, 才能最大限度降低胃癌漏诊.

本组PG检测阳性的病例中慢性萎缩性胃炎以上病变占91%, 其中胃癌、高级别上皮内瘤变、低级别上皮内瘤变、肠上皮化生、慢性萎缩性胃炎检出率分别为3/200(1.5%)、2/200(1.00%)、23/200(11.50%)、45/200(22.50%)、109/200(54.50%); 表明PG检测对于病变程度在慢性萎缩性胃炎以上的病变有较高的敏感性, PG阳性与PG阴性之间胃癌及其癌前病变和慢性萎缩性胃炎检出率有显著性差异. 因此, PG测定是一项检测慢性萎缩性胃炎这一胃癌高危人群较可靠的方法, 从这一角度来看, PG检测更适合于初筛胃癌高危人群. 为尽快开展防治胃癌, 采用本法仍不失其有效性, 特别在40-60岁人群中开展更为有意义.

本研究除了检出7例胃癌患者外, 还筛查出一批不同类型的胃病者, 包括慢性萎缩性胃炎、胃溃疡、胃息肉、肠上皮化生及上皮内瘤变等. 为进一步有针对性地干预治疗, 打下了良好的基础.

### 4 参考文献

- 1 罗好曾, 王晓鹏. 武威市1991年-1997年胃癌发病率分析. 肿瘤研究与临床 1999; 11: 69-70
- 2 刘豫瑞, 陈玉丽, 吴婷, 李良庆, 潘玉凤. 52例青年人胃癌分析. 中华消化内镜杂志 1998; 15: 28-29
- 3 陈威佐, 陈文元, 罗好曾. 武威市2001-2005年胃癌发病率分析. 中国肿瘤 2007; 16: 309-310
- 4 相英花, 杨永耿, 熊元治, 沈有秀, 马丽莉, 兰生梅, 杜鹃, 李英存, 蔡宏澜. 血清胃蛋白酶原筛查高原农牧区成年人胃癌前病变和胃癌标准的初步研究. 高原医学杂志 2009; 19: 19-23
- 5 何宝国, 徐红, 王立强. 乳胶增强免疫比浊法测定血清胃蛋白酶原水平在胃癌筛查中的价值研究. 中国内镜杂志 2009; 15: 135-139
- 6 李月红, 张祥宏, 黄飏, 王俊灵, 米建民, 申海涛, 张志刚, 严霞, 邢凌霄, 王士杰. 胃癌高发区居民血清胃蛋白酶原水平及异常标准的研究. 中华流行病学杂志 2006; 27: 840-844
- 7 孙丽萍, 官月华, 王兰, 董明, 袁媛. 辽宁庄河地区居民血清胃蛋白酶原含量检测分析. 中华消化杂志 2006; 26: 649-652
- 8 陈智周, 范振符. 胃蛋白酶原 I、II 在早期胃癌普查中的意义. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 1-3
- 9 三木一正. ペプシンノゲン法. 东京: 医学书院, 1998: 32-35
- 10 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. 胃肠病学 2006; 11: 674-684
- 11 Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Fléjou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. Gut 2000; 47: 251-255
- 12 米登海, 刘永恒, 郝天军, 李万勋, 张锦华, 程继志. 二步法筛查胃癌的研究. 中国肿瘤 1998; 7: 13-14
- 13 于中麟, 冀明, 杨迅, 张澍田, 黄晓俊, 张志镒, 吴正奇, 徐红, 熊元治, 马颖才. 血清胃蛋白酶原对胃癌普查的价值探讨. 中华消化内镜杂志 2008; 25: 512-515
- 14 三木一正. 胃がん罹患ハイリスク群の検診と診療. 成人病と生活習慣病 2007; 37: 1232-1234
- 15 柳冈公彦, 冈政志, 大烟博, 他. 前癌状态としての慢性胃炎の評価と胃癌検診. 消化器内视镜 2006; 28: 463-468

编辑 李军亮 电编 何基才

# WEE1与肝癌的关系

吕慧, 杨玉秀, 张立达, 白阳秋

吕慧, 郑州大学第一附属医院 河南省郑州市 450003  
吕慧, 杨玉秀, 张立达, 白阳秋, 河南省人民医院消化内科  
河南省郑州市 450003  
河南省医学科技攻关重点基金资助项目, No. 200902002  
作者贡献分布: 此课题有杨玉秀与吕慧设计; 杨玉秀校审; 标本收集由吕慧完成; 研究过程、数据分析由吕慧与张立达完成; 分析工具由白阳秋提供; 本论文写作由吕慧完成。  
通讯作者: 杨玉秀, 教授, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院消化内科. yangyuxiu55@126.com  
电话: 0371-65580767, 65580713  
收稿日期: 2011-02-21 修回日期: 2011-05-04  
接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Relationship between WEE 1 and hepatocellular carcinoma

Hui Lv, Yu-Xiu Yang, Li-Da Zhang, Yang-Qiu Bai

Hui Lv, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China  
Hui Lv, Yu-Xiu Yang, Li-Da Zhang, Yang-Qiu Bai, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China  
Supported by: the Key Medical Technology Research and Development Program of Henan Province, No. 200902002  
Correspondence to: Professor Yu-Xiu Yang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. yangyuxiu55@126.com  
Received: 2011-02-21 Revised: 2011-05-04  
Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-05-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of WEE 1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze its relationship with clinicopathological characteristics of HCC.

**METHODS:** Twenty-three normal human liver tissue specimens, 20 cirrhosis specimens, and 42 HCC specimens were used in this study. Reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the expression of WEE 1 mRNA in the above tissue specimens, while Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of WEE 1 protein. The relationship between WEE 1 expression and clinicopathological characteristics of HCC was analyzed.

**RESULTS:** The positive rates of Wee 1 mRNA expression in normal liver tissue, cirrhosis and

HCC were 21.7%, 55% and 90.5%, respectively, with a significant difference among the three groups ( $P < 0.01$ ). The positive rates of Wee 1 protein expression as revealed by Western blot and immunohistochemistry in the above three groups were 13.04%/17.4%, 40%/60% and 78.6%/83.3%, respectively, with significant differences among the three groups (both  $P < 0.01$ ). Up-regulated expression of WEE 1 was significantly correlated with tumor differentiation and pathological grade in HCC ( $\chi^2 = 17.454, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 14.559, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** WEE 1 expression was significantly up-regulated in HCC. High expression of WEE 1 may be closely related with tumor differentiation and pathological grade in HCC.

**Key Words:** Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot; Immunohistochemistry; Hepatocellular carcinoma; WEE 1

Lv H, Yang YX, Zhang LD, Bai YQ. Relationship between WEE 1 and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1515-1519

### 摘要

**目的:** 探讨WEE1在肝细胞癌(HCC)发生、发展中的异常表达及与肿瘤病理分期的关系。

**方法:** 收集2010-03/2010-05河南省人民医院肝胆外科手术标本正常肝组织23例, 肝硬化20例, HCC 42例。采用RT-PCR检测mRNA水平的表达, Western blot及免疫组织化学检测蛋白的表达, 并分析其与肝癌临床病理学分期的关系。

**结果:** WEE1 mRNA阳性表达率分别为21.7%、55.0%和90.5%, 三组间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Western blot和免疫组织化学方法分别检测蛋白阳性表达率分别为13.04%/17.4%、40%/60%和78.6%/83.3%, 三组间相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。肝癌组织中WEE1强度与肿瘤的分化程度及病理分级相关( $\chi^2 = 17.454, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 14.559, P < 0.01$ )。

**结论:** WEE1基因在肝癌中呈上调表达, 其参

### ■背景资料

人类的WEE1(WEE1A; WEE1hu)是从人类细胞中克隆出来的WEE1同源基因, 可磷酸化cyclinB-P34 CDC2复合物中的CDC2的Tyr15而抑制CDC2的活化, 从而延迟有丝分裂, 是调控细胞周期G2期阻滞的关键元件, 保证细胞在进入有丝分裂前完成DNA复制以及在DNA损伤时进行修复。目前国内尚无WEE1与肝癌发生、发展关系的研究, 通过研究其在肝癌中的表达及其与病理分级的关系, 有可能为肝癌的早期诊断提供新的标志物, 为其靶向治疗提供新的方法。

### ■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

## ■研发前沿

关于WEE1研究主要与细胞周期调控有关,最近研究的热点是WEE1在恶性肿瘤中的表达情况以及通过抑制其表达来降低肿瘤细胞的增殖或诱导凋亡等可能的靶向治疗手段。

与的DNA的修复异常与肝癌的发生密切相关,且与肿瘤的分化程度和病理分级相关。

**关键词:** 逆转录聚合酶链式反应; 免疫蛋白印迹; 免疫组织化学; 肝细胞癌; WEE1

吕慧, 杨玉秀, 张立达, 白阳秋. WEE1与肝癌的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1515-1519  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1515.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的消化系统高度恶性肿瘤,因其发病隐匿、恶性程度高、进展快、预后差、死亡率高而严重威胁人类健康. 本研究通过RT-PCR、Western blot、免疫组织化学的方法检测人正常肝脏、肝硬化和肝癌组织中WEE1基因转录和蛋白表达的差异,探讨WEE1在肝癌发生过程中的作用,并分析其表达强度与肝癌分化程度及核分期的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常肝组织23例,肝硬化20例, HCC 42例,均取自河南省人民医院肝胆外科2010-03/2010-05肝脏手术切除标本. 正常肝组织HBsAg阴性,肝硬化和肝癌组织HBsAg均阳性. 所取组织疾病诊断均经病理证实. 正常肝组织取自肝血管瘤手术切除病变部位的周围组织;肝硬化组织取自门静脉高压行贲门周围血管离断术要求行病理检查的肝脏组织; HCC组织取自HCC手术切除组织,标本新鲜,通过伦理委员会审核,患者知情签字同意. 标本取出后切成小块状迅速置于液氮冷冻待用。

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR检测WEE1基因的表达:** WEE1引物序列,上游引物序列5'-GATGAGCAG AACGCTTTGAGAG-3',下游引物序列5'-CAGAGGCAGCATTGGGATT-3',扩增长度: 319 bp; GAPDH引物序列: 上游引物序列: 5'-CTTAGATTTGGTCGTATTGG-3',下游引物序列5'-GAAGATGGTGATGGGATT-3',扩增长度: 207 bp; 按照RNA提取试剂盒(杭州博日公司)说明书提取总RNA. 按RT-PCR试剂盒(杭州博日公司)步骤进行逆转录聚合酶链式反应;目的基因与内参同管扩增,扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳. 结果用BIO-RAD Gel Doc XR全自动凝胶成像系统进行拍照,以WEE1产物与GAPDH产

物的比值为WEE1 mRNA在各肝脏组织中表达的相对量。

**1.2.2 Western blot检测WEE1蛋白的表达:** WEE1一抗为兔抗人多克隆抗体(美国Bioassay Technology公司);二抗为辣根过氧化物酶标羊抗兔IgG聚合物(北京中杉金桥生物公司). 按照常规方法进行肝脏组织蛋白提取,取50-100 mg肝脏组织加入200-300  $\mu$ L裂解液(含PMSF)快速匀浆,提取总蛋白. 所有蛋白样品调至等浓度后取15  $\mu$ L上样,10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转20 V 30 min将蛋白转移到PVDF膜上,5%奶粉的封闭缓冲液室温封闭1 h,一抗稀释液(1:500)封闭,4  $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜3次,二抗稀释液(1:900)室温孵育1-1.5 h, TBST洗膜3次,行ECL化学发光X片曝光显影,以WEE1蛋白与内参 $\beta$ -actin的比值作为WEE1蛋白在各肝脏组织中表达的相对量。

**1.2.3 免疫组织化学检测WEE1蛋白的表达:** 将肝脏组织标本经多聚甲醛固定、石蜡包埋,制成4  $\mu$ m厚的石蜡切片,HE染色. 采用免疫组织化学S-P法,切片经脱蜡水化、抗原修复、一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、苏木素复染、脱水透明、中性树胶封片后于显微镜下观察. WEE1抗体稀释为1:600,以0.01 mol/L、pH值为7.5的磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照. 以细胞中出现棕黄色颗粒为WEE1表达阳性细胞,以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 作为阳性判断标准. 根据阳性细胞百分率分为阴性(-): 阳性细胞不可见或阳性细胞不足5%;弱阳性(+): 阳性细胞散在或为组织细胞的1/3以下;中度阳性(++): 阳性细胞呈局灶分布,占全组织细胞1/3-2/3;强阳性(+++): 阳性细胞呈弥漫分布,占全组织细胞2/3以上。

**统计学处理** 应用SPSS17.0统计软件,相对表达量用mean $\pm$ SD表示,定性资料进行 $\chi^2$ 检验和Fisher's精确检验,独立多组定量资料应用单因素方差分析后进行LSD-*t*检验两两比较,等级定性资料进行Kruskal-Wallis非参数秩和检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR检测WEE1 mRNA的表达** 各肝脏组织总RNA提取结果良好,总RNA的吸光度 $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$ ,电泳结果证实RNA未降解. WEE1扩增产物电泳图谱显示319 bp处有DNA片段, GAPDH扩增产物显示207 bp处有DNA片段(图1). 在正常肝脏、肝硬化和肝癌组织中WEE1

## ■相关报道

Masaki通过凝胶测定wee1激酶的活性发现在小鼠肝炎到肝硬化、肝癌的发生过程中其表达水平是逐渐升高的。

表 1 WEE1蛋白表达与肝癌病理学特征的关系

分组	n	阳性n(%)	P值	WEE1表达强度(n)			
				-	+	++	+++
HCC组织	42	35(83.3)		7	4	14	17
分化程度							
高	10	4(40.0)		6	1	2	1
中	20	19(95.0) <sup>d</sup>	0.002	1	2	10	7
低	12	12(100.0) <sup>d</sup>	0.003	0	1	2	9
病理分级							
I	4	1(25.0)		3	0	1	0
II	12	10(83.3)	0.063	2	2	7	1
III	10	9(90.0) <sup>a</sup>	0.041	1	2	3	4
IV	16	16(100.0) <sup>d</sup>	0.004	0	0	3	13

<sup>a</sup>P<0.05 vs I级; <sup>d</sup>P<0.01 vs 高分化组.

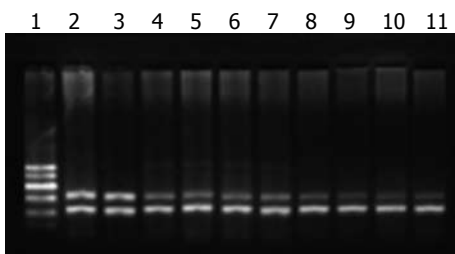


图 1 不同肝脏组织目的基因WEE1及内参基因GAPDH RT-PCR结果. 1: Marker(100-600 bp); 2, 3: 肝癌组织; 4-7: 肝硬化组织; 8-11: 正常肝组织.

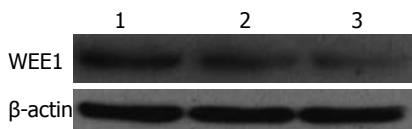


图 2 Western blot检测不同肝脏组织中WEE1蛋白的表达. 1: 肝癌组织; 2: 肝硬化组织; 3: 正常肝组织.

mRNA阳性表达率逐渐增高, 肝癌组与正常组、硬化组比较有统计学意义( $\chi^2 = 30.762, P < 0.01$ , 表1). 三组相对表达量分别为 $0.6835 \pm 0.1275$ 、 $0.9164 \pm 0.0664$ 和 $0.9986 \pm 0.0643$ ; 3组间差异具有统计学意义. 肝癌组与正常组、硬化组比较有统计学意义( $F = 38.372, P < 0.01$ ).

**2.2 Western blot检测WEE1蛋白的表达** 正常肝脏、肝硬化和肝癌组织中WEE1蛋白表达阳性率分别为13.04%、40%和78.6%, 3组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 26.69, P < 0.01$ , 图2). 3组相对表达量分别为 $0.2430 \pm 0.0365$ 、 $0.5089 \pm 0.0866$ 、 $0.7503 \pm 0.1238$ , 3组间差异有统计学意义, 肝癌组与正常组、硬化组比较有统计学意义( $F = 36.347, P < 0.01$ ).

**2.3 免疫组织化学检测WEE1蛋白的表达** WEE1蛋白阳性表达为棕黄色颗粒, 在肝癌组织中细胞核、细胞质均有表达(图3). 正常肝脏、肝硬化和HCC组织中WEE1蛋白的阳性表达率分别为17.4%、60%、83.3%, 3组间WEE1表达强度有统计学意义( $\chi^2 = 33.143, P < 0.01$ ).

**2.4 WEE1表达强度与HCC临床病理特征的关系** 高分化组与中、低分化组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), Edmondson IV级、III级、II级与I级差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 不同分化程度和不同病理分级的HCC组织中WEE1表达强度差异有统计学意义( $\chi^2 = 17.454, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 14.559, P < 0.01$ ), HCC组织中WEE1表达越强, 分化程度就越低, 病理分级也越高(表1).

### 3 讨论

人类的WEE1(WEE1A; WEE1hu)是从人类细胞中克隆出来的WEE1同源基因, 编码一种为核蛋白的酪氨酸激酶, 属于蛋白激酶中丝氨酸/苏氨酸家族的一员<sup>[1]</sup>. WEE1基因表达的wee1激酶是一种双特异性激酶, 可磷酸化cyclin B-P34 CDC2复合物中的CDC2的Tyr15而抑制CDC2的活化. 从而延迟有丝分裂, 是调控细胞周期G2期阻滞的关键元件, 在保证细胞进入有丝分裂前完成DNA复制以及在DNA损伤的修复, 从而避免异常的DNA进入有丝分裂而发生细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>. 很多研究表明细胞周期的进程特别是DNA的复制需要精确的调控, 轻度的偏差将会使细胞经历死亡<sup>[5]</sup>. Wang等<sup>[6]</sup>发现在肿瘤细胞中WEE1的高表达可以对抗DNA损伤后引起的凋亡.

本研究对正常肝脏、肝硬化和HCC组织中

### ■创新盘点

本研究首次应用RT-PCR、Western blot和免疫组织化学3种方法探讨WEE1在肝癌发生过程中的作用, 发现其不仅与肝癌发生发展有关, 而且与肝癌的分化程度及病理分级密切相关.

### ■应用要点

WEE1在肝癌形成过程中起了重要的作用, 有可能对诊断、治疗早期肝癌具有重要的临床指导作用.

### ■名词解释

RNA干扰(RNAi): 有21-25个碱基对组成的小干扰性双链RNA能够诱发细胞内基因沉默,与双链RNA有同源序列的mRNA被降解,从而抑制该基因的表达,这种现象称为RNA干扰。

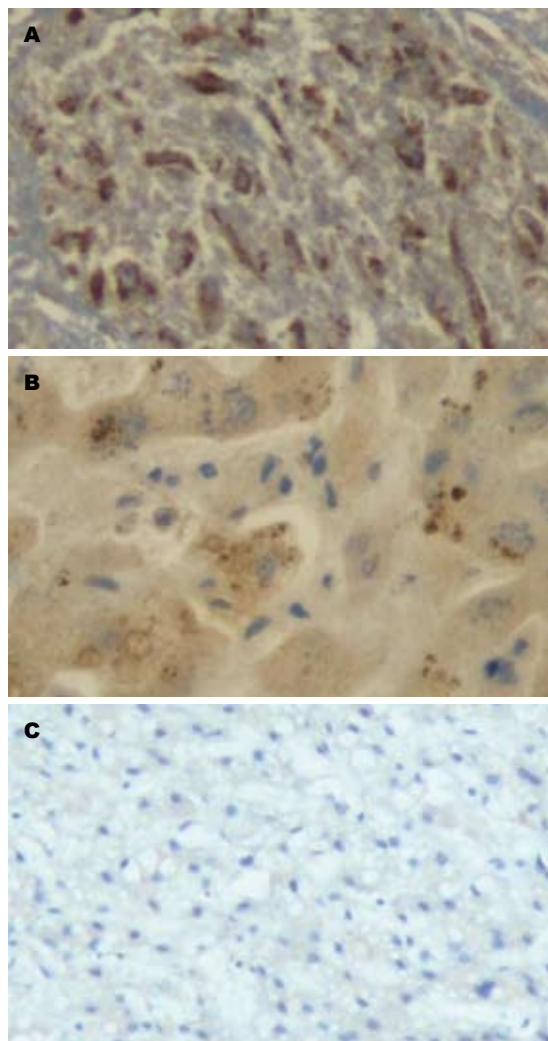


图3 不同肝组织中WEE1蛋白表达的免疫组织化学结果( $\times 200$ )。A: 肝癌组织; B: 肝硬化组织; C: 正常肝组织。

WEE1表达进行分析,证明WEE1在HCC的发生过程中呈上调表达,且在肝癌组织中的表达与前两者相比差异有统计学意义。Masaki等<sup>[7]</sup>研究小鼠肝癌形成模型发现wee1激酶在肝炎到肝硬化、肝癌的发生过程中表达水平是逐渐升高的。Mir等<sup>[8]</sup>发现在恶性胶质瘤细胞中WEE1高表达,通过抑制WEE1的表达可以使肿瘤细胞分裂时直接跳过G2期DNA修复,提早结束有丝分裂,致细胞死亡。并认为通过抑制WEE1的表达可能会作为一种潜在的治疗恶性胶质瘤的方法。Iorns等通过RNA干扰筛选技术发现乳腺癌细胞株大量表达WEE1,通过抑制WEE1的表达会明显降低乳腺癌细胞的增殖<sup>[9,10]</sup>。

由于疾病的发生往往与特异蛋白质的变化更加密切相关,因而检测肝组织中的WEE1蛋白可能更具临床意义。本组资料提示,在肝癌组织中WEE1蛋白阳性表达率和相对表达量均明显增高,3组间差异具有统计学意义,并与

HCC的分化程度、病理分级有密切的关系。这在蛋白水平印证了WEE1的表达在肝癌的发生发展过程中起着重要作用。同样Yoshida等<sup>[11]</sup>应用免疫组织化学的方法在非小细胞性肺癌组织中检测到WEE1蛋白的大量表达,而且WEE1表达与肺癌的复发密切相关,是一个判断预后的指标。Butz等<sup>[12]</sup>应用免疫组织化学的方法检测垂体腺瘤和正常脑垂体中WEE1蛋白的表达,发现WEE1蛋白在腺瘤中的表达更高,通过RNA干扰WEE1表达在mRNA水平无明显变化,而在蛋白水平的表达明显下降,提示WEE1表达与肿瘤的发生相关。

由于目前国内文献中关于WEE1在人肝癌中的表达情况的研究极少,WEE1在肝癌发生发展过程中确切的作用机制目前尚未完全明了,还需要进一步研究其作用机制。相关研究显示肿瘤细胞的共同改变主要是涉及正常细胞周期调控及DNA损伤修复的细胞传导通路的改变<sup>[13]</sup>。正常细胞癌变后,由于基因的改变,肿瘤细胞多数有细胞周期调控点G1的缺陷,而且对DNA损伤更敏感,因此在细胞DNA复制及损伤修复过程中更依赖于G2调控点。而WEE1是调控细胞G2/S期的关键因子,推测肿瘤细胞增殖迅速,DNA大量复制,WEE1表达增加,当有DNA损伤时细胞感应器ATM和ATR将被激活,通过ATM-CHK2/ATR-CHK1传导通路的级联放大信号传导激活细胞周期调控点的效应器Chk1、Chk2激活并进一步活化wee1激酶。促进WEE1表达增加<sup>[14,15]</sup>。本实验结果证明WEE1在mRNA和蛋白水平均是高表达,且与肿瘤分化程度及病理分期相关。他有可能作为分子靶点在肝癌的基因诊断及治疗中发挥作用。

### 4 参考文献

- Masuda H, Fong CS, Ohtsuki C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G2/M transition. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 555-569
- Watanabe N, Broome M, Hunter T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J* 1995; 14: 1878-1891
- Wang Y, Decker SJ, Sebolt-Leopold J. Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 305-313
- Harrison JC, Bardes ES, Ohya Y, Lew DJ. A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 417-420
- O'Farrell PH. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 512-519
- Wang F, Zhu Y, Huang Y, McAvoy S, Johnson WB, Cheung TH, Chung TK, Lo KW, Yim SF, Yu MM, Ngan HY, Wong YF, Smith DI. Transcriptional

- repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; 24: 3875-3885
- 7 Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, Igarashi K, Matsumoto K, Nishioka M, Hatanaka Y, Omata M. Hepatocellular carcinoma cell cycle: study of Long-Evans cinnamon rats. *Hepatology* 2000; 32: 711-720
  - 8 Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, Balaj L, Claes A, Niers JM, Van Tilborg AA, Zwinderman AH, Geerts D, Kaspers GJ, Peter Vandertop W, Cloos J, Tannous BA, Wesseling P, Aten JA, Noske DP, Van Noorden CJ, Würdinger T. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; 18: 244-257
  - 9 Iorns E, Lord CJ, Grigoriadis A, McDonald S, Fenwick K, Mackay A, Mein CA, Natrajan R, Savage K, Tamber N, Reis-Filho JS, Turner NC, Ashworth A. Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets. *PLoS One* 2009; 4: e5120
  - 10 Murrow LM, Garimella SV, Jones TL, Caplen NJ, Lipkowitz S. Identification of WEE1 as a potential molecular target in cancer cells by RNAi screening of the human tyrosine kinase. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122: 347-357
  - 11 Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, Shitara Y, Kuwano H. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 252-256
  - 12 Butz H, Likó I, Cziráj S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rác K, Patócs A. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: E181-E191
  - 13 Stathis A, Oza A. Targeting Wee1-like protein kinase to treat cancer. *Drug News Perspect* 2010; 23: 425-429
  - 14 Leijen S, Beijnen JH, Schellens JH. Abrogation of the G2 checkpoint by inhibition of Wee-1 kinase results in sensitization of p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Curr Clin Pharmacol* 2010; 5: 186-191
  - 15 Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 513-519

#### ■同行评价

本文选题新颖, 方法科学, 结果可靠, 论据充分, 对临床肝细胞癌患者预后判断和治疗具有重要的参考作用。

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 •

### 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)

# 汶川地震灾区中学教师肠易激综合症的患病率和相关因素

付万朝, 郑仕诚, 董晓薇, 王一平, 张强, 王丽丽, 王刚, 彭亚军

## ■背景资料

肠易激综合征 (IBS)是世界性常见的疾病之一,其病因是非常复杂的,各国不同人群的发病率也有不同,“5.12”汶川地震发生后,是否不同人群IBS发病率有所增高,以及是否受相关地震因素的影响没有研究。

付万朝, 郑仕诚, 董晓薇, 成都市龙泉驿区第一人民医院 四川省成都市 610100  
王一平, 四川大学华西医院 四川省成都市 610041  
张强, 四川大学华西公共卫生学院 四川省成都市610041  
王丽丽, 四川省青川中学 四川省广元市 628100  
王刚, 四川省彭州市通济中学 四川省彭州市 611900  
彭亚军, 成都市龙泉中学 四川省成都市 610100  
四川省卫生厅科研基金资助项目, No. 090103  
作者贡献分布: 此课题由郑仕诚负责; 由郑仕诚、付万朝及王一平设计; 研究过程付万朝、郑仕诚、董晓薇、王丽丽、王刚及彭亚军参与完成; 研究所用分析工具、问卷及数据分析由张强提供和完成; 本论文写作由付万朝与郑仕诚完成。  
通讯作者: 郑仕诚, 610100, 四川省成都市龙泉驿区欧鹏大道417号, 成都市龙泉驿区第一人民医院消化内科。  
zsc333-007@163.com  
电话: 028-84852246  
收稿日期: 2011-02-26 修回日期: 2011-04-28  
接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Prevalence and risk factors for irritable bowel syndrome among middle school teachers in areas affected by Wenchuan earthquake

Wan-Chao Fu, Shi-Cheng Zheng, Xiao-Wei Dong, Yi-Ping Wang, Qiang Zhang, Li-Li Wang, Gang Wang, Ya-Jun Peng

Wan-Chao Fu, Shi-Cheng Zheng, Xiao-Wei Dong, the First People's Hospital of Longquanyi District, Chengdu 610100, Sichuan Province, China  
Yi-Ping Wang, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Qiang Zhang, School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Li-Li Wang, Qingchuan Middle School, Guangyuan 628100, Sichuan Province, China  
Gang Wang, Tongji Middle School of Pengzhou City, Pengzhou 611900, Sichuan Province, China  
Ya-Jun Peng, Longquan Middle School of Longquanyi District, Chengdu 610100, Sichuan Province, China  
Supported by: the Research Foundation of the Sichuan Provincial Health Department, No. 090103  
Correspondence to: Shi-Cheng Zheng, the First People's Hospital of Longquanyi District, 417 Oupeng Avenue, Longquanyi District, Chengdu 610100, Sichuan Province, China. zsc333-007@163.com  
Received: 2011-02-26 Revised: 2011-04-28  
Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To analyze the prevalence, clinical characteristics, and risk factors for irritable bowel syndrome (IBS) among middle school teachers

in areas affected by Wenchuan earthquake.

**METHODS:** Multi-stage random sampling was adopted to select 269 teachers from three middle schools in earthquake-affected areas and three in non-affected areas to conduct epidemiological investigation of IBS.

**RESULTS:** The overall prevalence of IBS, which was diagnosed according to the revised Rome II criteria, was 22.5% (95%CI: 17.3%-24.7%). The prevalence of IBS among teachers in earthquake-affected areas was significantly higher than that in non-affected areas (27.9% vs 15.7%,  $P < 0.05$ ). No significant difference was found in the prevalence of anxiety and depression between teachers in earthquake-affected areas and those in non-affected areas. However, the prevalence of anxiety and depression was significantly higher in teachers with IBS than in those without IBS ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The prevalence of IBS among teachers was higher in earthquake-affected areas than in non-affected areas. The prevalence of anxiety and depression was higher in teachers with IBS than in those without IBS. Earthquake experience might increase the prevalence of IBS among middle school teachers.

**Key Words:** Earthquake-stricken area; Irritable bowel syndrome; Teachers; Prevalence

Fu WC, Zheng SC, Dong XW, Wang YP, Zhang Q, Wang LL, Wang G, Peng YJ. Prevalence and risk factors for irritable bowel syndrome among middle school teachers in areas affected by Wenchuan earthquake. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1520-1523

## 摘要

**目的:** 研究肠易激综合征 (IBS) 在汶川地震灾区 (汶川) 中学教师中的患病率、发病特征、致病相关危险因素。

**方法:** 采用多级随机抽样方法, 随机抽取地震灾区和非灾区3所中学269名教师进行IBS的流行病学调查。

**结果:** 校正后符合罗马 II 诊断标准IBS的患

■同行评议者  
田文静, 副教授,  
哈尔滨医科大学  
公共卫生学院

病率为22.5%(95%CI: 17.3%-24.7%)。其中地震灾区患IBS有38例, 患病率为27.9%(95%CI: 20.4%-35.4%), 非地震灾区患IBS有17例, 患病率为15.7%(95%CI: 8.8%-22.6%), 经比较IBS在地震灾区的教师中患病率高于非灾区, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 通过HAD量表调查发现, 地震灾区和非灾区教师在焦虑和抑郁状况方面没有统计学意义, 而患IBS教师发生率要高于非IBS教师, 有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:** 地震灾区教师IBS的患病率27.9%, 高于非灾区教师的患病率。非灾区教师生理机能优于灾区教师, 在焦虑和抑郁状况方面患IBS教师发生率要高于非IBS教师, 说明地震应激事件可加重地震灾区教师的IBS发病, 使其病情复杂化和治疗难度加大。

**关键词:** 地震灾区; 肠易激综合征; 教师; 患病率

付万朝, 郑仕诚, 董晓薇, 王一平, 张强, 王丽丽, 王刚, 彭亚军. 汶川地震灾区中学教师肠易激综合症的患病率和相关因素. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1520-1523  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1520.asp

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)虽不是绝症, 但持久的腹痛、腹泻、便秘等症状和昂贵的医疗费用, 严重地降低了患者的生活质量, 可以说是消化系统病中一种不折不扣的顽症, 社会影响巨大, 其诊断标准不断修订, 但该病发生的原因仍不清楚<sup>[1]</sup>。“5.12”汶川大地震不但给人们造成物质上巨大的损害, 也给人们造成精神上的伤害<sup>[2,3]</sup>, 他对IBS的患病有如何影响, 国内外均未有研究和报道。通过地震灾区中学教师IBS患病率的流行病学调查, 以及对饮食习惯、诱发因素、胃肠道症状和躯体精神心理等相关因素的分析, 阐明地震这样强应激事件对IBS发病的影响, 为灾区IBS患者的治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用多级整群随机抽样方法, 在2009-12我们从国务院公布的《汶川地震灾害范围评估报告》10个极重灾区县(市)中, 随机抽取2个县(市)的一所中学的教师进行问卷调查, 他们分别是青川县中学、彭州市通济中学, 同时随机抽取非灾区的成都市龙泉中学的教师同步进行调查, 在入选的学校中, 根据教师的自愿填答问卷。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本量:** 此次调查共发放和收回问卷269

份, 问卷条目缺失比例在50%以上者共2份, 故获得实际有效问卷267份, 调查有效率为99.26%, 其中地震灾区144人, 占问卷总数53.9%, 非灾区123人, 占问卷总数46.1%。

**1.2.2 调查:** 调查问卷由IBS调查表、地震经历感受、SF-36量表和HAD量表四部分组成。地震经历感受调查表由四川大学华西公共卫生学院提供。IBS调查表采用文献<sup>[4]</sup>, 具有下列4个特点: (1)调查表为多维评定。含饮食习惯(包括纤维素、蛋白类、脂肪类及辛辣食物等)、诊断标准(罗马II标准)、诱发因素(包括胃肠道感染及药物等)、胃肠道症状(包括咽喉异物感、胸骨后不适、烧心及纳差等)和躯体精神心理(包括失眠、疲劳、情绪及娱乐方式等)共5个领域; (2)调查表既相关又独立。 (3)调查表简明扼要, 具有较强的实用性及可操作性; (4)IBS调查表具有较好的信度、效度及反应度, 可作为IBS流行病学的测评工具。SF-36量表和HAD量表采用文献<sup>[5,6]</sup>。由专门培训的消化科医师先对被抽到学校自愿填表的教师进行指导, 要求根据亲身经历对调查表内容进行逐项填写。调查结束后对所有被调查者的问卷进行复核, 条目的缺失比例在50%以上, 则予以剔除。

**1.2.3 诊断标准:** IBS诊断标准主要根据罗马II标准<sup>[1]</sup>并排除既往有腹部大手术、消化性溃疡、溃疡性结肠炎、糖尿病及甲状腺功能亢进等疾病。

**统计学处理** 以检出率作为IBS的期间患病率。用EpiData3.1软件录入数据, SPSS17.0统计分析软件包进行统计分析。计数资料组间比较采用 $\chi^2$ 检验, 等级资料采用Mann-Whitney U检验。

## 2 结果

本次调查IBS的总患病率为22.5%(95%CI: 17.3%-24.7%), 其中地震灾区患IBS有38例, 患病率为27.9%(95%CI: 20.4%-35.4%), 非地震灾区患IBS有17例, 患病率为15.7%(95%CI: 8.8%-22.6%), 灾区教师IBS患病率高于非灾区教师, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.132, P = 0.023$ )。在支持IBS的症状方面, 如每周排便 $< 3$ 次、每天排便频率、大便性状异常、腹痛时排便次数和腹痛排便后缓解症状等, 地震灾区和非灾区患IBS教师均无统计学意义(表1)。无论是灾区还是非灾区, 患IBS的教师饮食习惯、诱发因素和胃肠道症状等多项单因素方面相比较无统计学意义(表2, 3)。地震灾区IBS教师生理机能要低于非灾区教师, 以生理和情感职能、躯体疼痛和一般健康状况、精力、社会功能和精神更差, 余各项差

### ■ 相关报道

Vege等报道睡眠障碍可使IBS发病增高, 他是IBS发病的独立因素。

### ■ 创新盘点

本文首次对汶川地震灾区成年人(教师)的IBS的发病及相关因素进行调查报道, 并且利用罗马II标准诊断IBS, 同时对该类人群的IBS症状、诱发因素、饮食结构、胃肠症状、生理机能的焦虑等因素均作了分析。

### ■应用要点

自从罗马Ⅱ和罗马Ⅲ标准颁布后,在国内外尚无地震后利用这些标准对受灾人员进行大样本临床调查.本调查结果显示地震灾区教师患病率为27.9%,显著高于国内外的平时状态下调查的患病率为5%-25%的结果.目前尚缺少国外一些大地震后的调查资料.

表 1 IBS患者的症状

症状	n(%)	地震灾区n(%)	非地震灾区n(%)	P值
无支持症状	7(12.7)	3(7.9)	4(23.5)	0.108
每天排便>3次	2(3.6)	2(5.3)	0(0.0)	1.000
每周排便<3次	6(10.9)	6(15.8)	0(0.0)	0.161
大便性状异常	19(34.5)	13(34.2)	6(35.3)	0.938
排便不尽	29(52.7)	23(60.5)	6(35.3)	0.083
黏液便	17(30.9)	11(30.0)	6(35.3)	0.638
腹胀	28(50.9)	21(55.3)	7(41.2)	0.334

表 2 地震灾区和非地震灾区IBS患者的饮食习惯比较

	地震灾区n(%)			非地震灾区n(%)			P值
	无	偶尔	经常	无	偶尔	经常	
生冷食物	1(2.6)	35(92.2)	2(5.2)	0(0.00)	14(82.4)	3(17.6)	0.113
辛辣食物	0(0.00)	28(73.7)	10(26.3)	0(0.00)	11(64.7)	6(35.3)	0.502
乳制品	3(15.8)	29(52.6)	6(31.6)	2(11.8)	12(70.6)	3(17.6)	0.905
纤维素食物	0(0.00)	21(56.8)	16(43.2)	0(0.00)	6(40.0)	9(60.0)	0.278
高脂肪食物	1(2.6)	33(86.9)	4(10.5)	0(0.00)	15(93.7)	1(6.3)	0.848
高蛋白食物	1(2.6)	26(68.5)	11(28.9)	0(0.00)	14(82.4)	3(17.6)	0.488
淀粉类食物	2(5.2)	19(50.1)	17(44.7)	1(6.7)	6(40.0)	8(53.3)	0.683

表 3 地震灾区和非地震灾区IBS患者的诱发因素和胃肠道症状比较

	n(%)	地震灾区n(%)	非地震灾区n(%)	P值
胃肠道感染史	23(41.8)	17(45.9)	6(35.3)	0.512
腹部手术史	2(3.6)	2(5.4)	0(0.0)	1.000
服用抗生素	11(20.0)	10(27.0)	1(5.9)	0.143
服用止痛药	8(15.1)	6(16.7)	2(11.8)	0.642
家族聚集史	16(29.1)	14(38.2)	2(11.8)	0.106
就诊意识	20(71.4)	15(40.5)	5(29.4)	0.473
吞咽困难	11(20.0)	9(23.7)	2(11.8)	0.307
咽部异物感	17(30.9)	13(34.2)	4(23.6)	0.428
吞咽梗塞感	8(14.5)	5(13.2)	3(17.7)	0.663
胸骨后疼痛	14(25.5)	11(28.9)	3(17.7)	0.374
胸部不适烧心	16(30.2)	12(33.3)	4(23.6)	0.468
打嗝	17(30.9)	12(31.6)	5(29.4)	0.872
用吞气终止打嗝	19(34.5)	15(39.5)	4(23.6)	0.250
食欲减退	18(32.7)	13(34.2)	5(29.4)	0.726

异无统计学意义(表4).通过HAD量表调查发现,地震灾区和非灾区教师在焦虑和抑郁状况方面没有统计学意义,而患IBS教师的焦虑和抑郁发生率要高于非IBS教师,有统计学意义(表5).

### 3 讨论

IBS是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变和(或)大便性状异常,并缺乏可解释症状的形态学改变和生化异常的功能性肠病,严重影响患

者的生活质量并耗费大量医疗资源,现病因和发病机制尚不十分清楚,任何学说均无法单独解释IBS的各种表现<sup>[7]</sup>,有研究表明独立生活事件或精神因素可能是发病的原因之一<sup>[8]</sup>.但像“5.12”汶川大地震这样独立生活事件与IBS发病的关系如何,目前未见有报道,我们使用罗马调查马Ⅱ标准发现灾区教师IBS患病率为27.9%,高于非灾区教师,其差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.132, P = 0.023$ ),并高于5%-25%的各人群的患

表 4 IBS患者与非IBS患者生理机能各项的比较

分组	IBS患者	非IBS患者	P值
生理功能(PF)	74.1 ± 26.9	78.3 ± 23.8	0.281
生理职能(RP)	53.7 ± 39.3	76.0 ± 35.3	<0.001
情感职能(RE)	54.9 ± 41.5	67.5 ± 40.1	0.043
躯体疼痛(BP)	65.2 ± 14.5	72.1 ± 14.0	0.002
总体健康(GH)	51.9 ± 17.1	59.9 ± 16.0	0.002
活力(VT)	57.3 ± 16.7	65.6 ± 17.4	0.002
社会功能(SF)	21.4 ± 11.2	87.4 ± 22.4	<0.001
精神健康(MH)	62.1 ± 18.0	69.7 ± 15.4	0.002
健康变化(HT)	49.8 ± 17.6	44.4 ± 16.6	0.033

表 5 IBS患者与非IBS患者的焦虑和抑郁状况 n(%)

分组	阴性(0-7)	阳性(8-21)	合计
IBS患者	31(57.4)	23(42.6)	54(100.0)
非IBS患者	147(72.8)	55(27.2)	202(100.0)
合计	178(69.5)	78(30.5)	256(100.0)

$\chi^2 = 4.748, P = 0.029.$

病率<sup>[9]</sup>, 也与Schmulson等<sup>[10]</sup>的调查结果和我们调查地震灾区和非灾区中学生IBS的患病率是无差别的结论不同<sup>[11]</sup>, 但与李明阳等<sup>[12]</sup>认为汶川地震后抗震军人的功能性胃肠病的发病率较高的报道相一致, 说明地震应激事件与成人发病相关, 亦说明青少年和成年人发生IBS的原因是不同的, 与Endo等<sup>[13]</sup>认为青少年IBS发病率和原因几乎相同, 但与成年人的IBS患病率是不同的结论相似. 从相关危险因素的调查后, 发现地震灾区和非灾区的教师在临床症状、饮食习惯(包括纤维素、蛋白类、脂肪类及辛辣食物等)、诱发因素(包括胃肠道感染及药物等)和胃肠道症状(包括咽喉异物感、胸骨后不适、烧心及纳差等等)等领域是无差别的, 这与有些报道认为IBS发病与食物不耐受和肠道感染等因素相关不相同<sup>[14,15]</sup>, 其原因不清.

我们通过SF-36量表发现, 符合罗马II标准的地震灾区IBS教师生理机能要低于非灾区教师, 以生理和情感职能、躯体疼痛和一般健康状况、精力、社会功能和精神更差, 说明地震应激事件对教师生理状态的影响是比较明显. 在焦虑和抑郁状况发生率方面, HAD量表调查发现, 地震灾区患IBS教师的焦虑和抑郁状况要高于非IBS教师, 并有统计学意义, 也说明地震

对患IBS教师焦虑和抑郁状况的影响是明确的, 可以说明地震应激事件不但对IBS的发病率有影响, 对IBS患病情的的发展和演变有累积和推动作用, 增加了地震灾区IBS患者的治疗难度, 早期心理干预可能是最好的策略.

#### 4 参考文献

- 胡品津, 方秀才, 肠易激综合征诊断和治疗. 第1版. 北京: 科学出版社, 2009: 12-18; 47-48
- 刘平, 蒋兰慧, 杨磊, 王力, 林明福, 邱仁义, 吴坎坎, 张林, 李幼平. 汶川地震225位遇难学生父母精神状况的横断面调查. 中国循证医学杂志 2010; 10: 653-657
- 罗兴伟, 高雪屏, 蔡太生, 陈晋东, 刘哲宁, 郭锐, 付晓阳, 戴建峰. 汶川地震亲历者心理健康状况调查. 中国临床心理学杂志 2008; 16: 571-573
- 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. 中华流行病学杂志 2000; 21: 26-29
- Brazier JE, Harper R, Jones NM, O' Cathain A, Thomas KJ, Usherwood T, Westlake L. Validating the SF-36 health survey questionnaire: new outcome measure for primary care. *BMJ* 1992; 305: 160-164
- 徐志洁, 段丽萍, 王琨, 夏志伟, 林三仁. 焦虑和抑郁与胃食管反流病症状发生的相关研究. 中华医学杂志 2005; 85: 3210-3215
- 张鸣鸣, 姜敏. 肠易激综合征发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2484-249
- Thijssen AY, Jonkers DM, Leue C, van der Veek PP, Vidakovic-Vukic M, van Rood YR, Clemens CH, Masclee AA. Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: e236-e241
- Liu J, Hou X. A review of the irritable bowel syndrome investigation on epidemiology, pathogenesis and pathophysiology in China. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 88-93
- Schmulson M, Vargas JA, López-Colombo A, Remes-Troche JM, López-Alvarenga JC. Prevalence and clinical characteristics of the IBS subtypes according to the Rome III criteria in patients from a clinical, multicentric trial. A report from the Mexican IBS Working Group. *Rev Gastroenterol Mex* 2010; 75: 427-438
- 郑仕诚, 付万朝, 董晓薇, 刘忠, 周骥, 王一平, 张强. 地震灾区(汶川)中学生肠易激综合征患者的焦虑性情绪障碍状况分析. 四川医学 2010; 31: 876-878
- 李明阳, 王志强, 孙刚, 杨云生. 军人在汶川地震中功能性胃肠病发病的调查及相关因素. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1594-1597
- Endo Y, Shoji T, Fukudo S, Machida T, Machida T, Noda S, Hongo M. The features of adolescent irritable bowel syndrome in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 106-109
- Gwee KA. Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome, an Inflammation-Immunological Model with Relevance for Other IBS and Functional Dyspepsia. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 30-34
- Hsueh HF, Jarrett ME, Cain KC, Burr RL, Deechakawan W, Heitkemper MM. Does a self-management program change dietary intake in adults with irritable bowel syndrome? *Gastroenterol Nurs* 2011; 34: 108-116

■同行评价  
本文设计合理, 内容新颖, 但学术价值一般.

编辑 李薇 电编 何基才

# 便秘型肠易激综合征100例

郭红, 姚萍

## ■背景资料

便秘型肠易激综合征发病率较高, 长期便秘虽然不影响患者的日常生活, 但是大大降低了患者的生活质量。

郭红, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

作者贡献分布: 此课题由姚萍设计; 研究过程由姚萍与郭红操作完成; 数据分析、本论文写作由郭红完成; 论文修改由姚萍完成。

通讯作者: 姚萍, 副教授, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化科。

pingyaozh@sina.com

电话: 0991-4362608

收稿日期: 2011-03-23 修回日期: 2011-05-05

接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-05-18

## Risk factors for constipation-predominant irritable bowel syndrome: an analysis of 100 cases

Hong Guo, Ping Yao

Hong Guo, Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Associate Professor Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 South Liyushan Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2011-03-23 Revised: 2011-05-05

Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-05-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the risk factors for constipation-predominant irritable bowel syndrome (C-IBS) to guide treatment and prevention of the disease.

**METHODS:** This was a 1 : 1 case-control study. A questionnaire survey was conducted among 100 patients who were diagnosed with C-IBS and 100 healthy volunteers from November 2010 to January 2011. The questionnaire requested general information and information on life style and psychological factors (depression). Statistical analysis was performed using SPSS17.0 software.

**RESULTS:** A family history of constipation (RR = 6.493), regular defecation (RR = 0.120) and depression (RR = 2.195) were independently associated with the incidence of C-IBS (all  $P < 0.05$ ).

## ■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

A family history of constipation and depression were risk factors for C-IBS, whereas regular defecation was a protective factor.

**CONCLUSION:** Lifestyle and mental status can affect the incidence of C-IBS. Improvement of lifestyle and mental intervention can prevent and relieve C-IBS.

**Key Words:** Irritable bowel syndrome; Constipation; Case-control study; Risk factors

Guo H, Yao P. Risk factors for constipation-predominant irritable bowel syndrome: an analysis of 100 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1524-1528

## 摘要

**目的:** 研究便秘型肠易激综合征(C-IBS)发病的相关危险因素, 为指导治疗及预防发生便秘型肠易激综合征提供资料。

**方法:** 采用一般资料问卷、生活状况问卷、仲氏抑郁量表对2010-09/2011-01新疆医科大学第一附属医院门诊确诊为C-IBS的100例患者及100例健康体检者进行调查问卷, 采用1 : 1病例对照研究。

**结果:** 发病相关因素有便秘家族史、定时排便及心理因素(抑郁), 其中有便秘家族史(RR = 6.493, 95%CI: 1.814-23.237)、心理因素(抑郁)(RR = 2.195, 95%CI: 1.050-4.589)为危险因素, 而定时排便(RR = 0.120, 95%CI: 0.040-0.356)为保护因素。

**结论:** C-IBS发生率较高, 且受生活方式和心理状态(抑郁)等多方面的影响。可通过改善生活方式及干预心理状态来预防和缓解C-IBS症状。

**关键词:** 肠易激综合征; 便秘; 病例对照研究; 危险因素

郭红, 姚萍. 便秘型肠易激综合征100例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1524-1528

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1524.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是胃肠道最常见功能性胃肠疾病之一,在西方国家IBS患病率约10%<sup>[1]</sup>. IBS是消化系统常见功能性疾病,世界范围内IBS的总体就诊率达30%<sup>[2]</sup>. IBS虽不危及生命,但不同程度的降低患者的生活质量,卫生经济学相关研究表明IBS患者不仅担负着较高的医疗费用<sup>[3,4]</sup>,并且占用了大量医疗资源,因而一直是研究热点<sup>[5]</sup>. 据2006年修订的罗马III诊断标准将IBS分为4型,即便秘型IBS(constipation-predominant IBS, C-IBS)、腹泻型IBS(diarrhea-type IBS, D-IBS)、混合型IBS(mixed IBS, M-IBS)及不定型IBS(uncertain form IBS, U-IBS)<sup>[6]</sup>. 随着生活方式的改变、社会的发展等影响,其中C-IBS的发病率逐渐上升,C-IBS与急性心脑血管病变、结直肠癌的发病有着密切的关系,但是C-IBS至今仍然未引起人们的足够重视,就诊率较低. 本文就C-IBS发病的影响因素进行研究,目的在于了解C-IBS发病的相关危险因素,为指导治疗及预防C-IBS的发生提供资料.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-09/2011-01就诊于新疆医科大第一附属医院并确诊为C-IBS的患者100例,诊断标准按2006年在罗马国际会议提出的罗马III诊断标准入选,排除患有可致便秘的相关因素如甲状腺疾病、糖尿病、腹部手术等,并均行电子肠镜检查结果为阴性者. 对照组选自同时同一医院进行健康体检的健康人,配对条件为排除胃肠道器质性疾病的体检的健康体检者、年龄与病例组相差<4岁,共收集100例形成正常对照组. 病例组与对照组性别构成一致.

### 1.2 方法

1.2.1 研究工具: 采用调查问卷收集病例. 问卷内容参考国外成人肠易激综合征调查表<sup>[7]</sup>,结合我国国情及文化差别,由研究者自行设计. 问卷包括3部分: (1)一般资料问卷: 包括年龄、性别、婚姻状况、教育程度、经济状况等人口学特征; (2)生活状况问卷: 主要用于了解患者饮食结构、运动情况、胃肠道感染、服药史、有无定时排便、便秘家族史等情况; (3)心理问卷: 采用ZUNG氏抑郁量表,此表为自评量表,共20道问题,累计相加得分过半为阳性,分值越高说明抑郁水平越重.

1.2.2 诊断标准: 以2006年修订的罗马III诊断标

准为标准,排除既往有甲状腺疾病、糖尿病、腹部手术、服用阿片类药物等.

1.2.3 调查: 与被调查者沟通后,由相关专业的医学生现场指导与监督. 合格问卷的回收率为100%.

**统计学处理** 应用统计学软件SPSS17.0进行1:1病例对照的COX统计学数据分析.

## 2 结果

有便秘家族史、定时排便、抑郁为C-IBS发病的影响因素,其相对危险度为6.493、0.120、2.195,其中定时排便为保护因素,有便秘家族史、抑郁为C-IBS的危险因素. 有便秘家族史的危险性最高,其RR值为6.493,说明有便秘家族史的人患C-IBS是无便秘家族史患C-IBS的6.493倍(表1).

## 3 讨论

IBS是一种慢性的功能性肠病,以有腹痛腹胀等不适为主,伴大便性状和排便习惯改变,经检查无器质性病变. 目前最新的诊断标准为2006修订的罗马III诊断标准. IBS目前已成为胃肠道功能性疾病的代表,受到胃肠病学专家及流行病学工作者的广泛关注. 目前对于C-IBS的发病的危险因素的研究结果不尽相同,尚无准确定论.

有研究资料表明女性较男性C-IBS的患病率高,可能与女性性激素水平明显升高,特别是体内孕激素水平增高,抑制肠平滑肌收缩<sup>[8]</sup>,胃肠蠕动减慢,从而导致便秘;也有学者发现在妊娠过程及产褥期等体内雌孕激素高的时候便秘发病率高<sup>[9]</sup>,也说明激素水平和便秘有一定的关系,但Tillisch等<sup>[10]</sup>研究结果提示性别与IBS的发病无关. 对于民族对C-IBS发病的影响,研究较少. 本研究结果则提示性别和民族与C-IBS无相关性.

有研究发现城市居民的C-IBS就医率及诊断率高于农村<sup>[11]</sup>,但本实验研究表明C-IBS患者的居住地区(城乡分布)和家庭经济条件并不是C-IBS发病的危险因素. 考虑出现这种情况可能与患者就医选择医院的自主性有关. 另外此次研究结果提示文化程度与C-IBS的发病两者无相关性,这与北京的调查结果显示相同<sup>[12]</sup>,但天津的调查结果认为随文化程度的增高便秘的患病率下降<sup>[13]</sup>,出现这种差别可能与被调查人群的文化程度构成不同有关.

在既往的研究中纤维素的摄入情况是和便

### ■研究前沿

目前关于便秘型肠易激综合征研究的热点主要在于病因的研究,针对病因从根本治疗便秘型肠易激综合征是目前亟待解决的问题.

### ■相关报道

Lea等对IBS患者流行病学研究表明超过60%的患者有精神心理疾病,80%的患者病情变化与精神心理因素有关.

### ■创新盘点

本文研究结果提示性别、增加食物中膳食纤维、增加运动量等变量不是影响便秘型肠易激综合征发病的影响因素,与常规研究结果不同。

表 1 C-IBS组与正常对照组多因素COX分析

	B	SE	Sig	Exp(B)	95%CI
性别	1.602	1.388	0.248	4.963	0.372-75.401
民族	-0.575	0.510	0.260	0.562	0.437-2.202
生活地区	-0.305	1.507	0.840	0.737	0.038-14.149
经济收入	0.684	0.842	0.416	1.982	0.381-10.325
文化程度	-1.006	0.582	0.084	0.366	0.017-1.144
蔬菜	-0.981	0.643	0.122	0.375	0.108-1.299
辛辣食物	0.370	0.570	0.517	1.447	0.474-4.420
甜食	-0.505	0.692	0.465	0.603	0.156-2.341
高脂食物	0.424	0.658	0.519	1.528	0.421-5.546
奶、豆制品	0.844	0.568	0.137	2.327	0.764-7.083
饮水量	-1.133	0.819	0.167	0.322	0.065-1.604
运动	0.115	0.557	0.836	1.122	0.065-1.604
幽门螺杆菌感染	1.128	1.224	0.357	3.090	0.281-34.028
定时排便	-2.132	0.557	0.000	0.120	0.040-0.356
便秘家族史	1.871	0.651	0.004	6.493	1.814-23.237
Zung氏抑郁	0.786	0.376	0.037	2.195	1.050-4.589

密切相关。通常我们认为纤维素可以使食物的容量增加,使粪便容积增加,增加了细菌的繁殖和产物,同时细菌的发酵产物对结肠运动起刺激作用,从而显著缩短食物在胃肠道的通过时间。但新近研究表明纤维素的摄入对便秘没有影响<sup>[14]</sup>,增加膳食纤维无助于改善便秘情况<sup>[15]</sup>。本研究结果与之类似,饮食结构与C-IBS无相关性,蔬菜摄入对C-IBS没有影响。

运动与C-IBS的关系研究报道结果不尽相同,运动量的大小目前很难统一量化,不同的人对运动的量的认识不同,所以导致研究的结果不统一。国外有文献提示缺乏运动,引起胃肠道动力不足,导致胃肠动力减慢而引起便秘<sup>[16]</sup>,另有报道运动和便秘没有一定相关,食物在胃肠道的通过时间不能通过体育锻炼缩短<sup>[17]</sup>,增大运动量虽有益健康,但无助于改善便秘<sup>[18]</sup>。本调查结果也没有提示体育锻炼与C-IBS有相关性。

目前,国内外有关幽门螺杆菌感染与IBS相关性研究的报道不少,但结果差异很大。Locke等<sup>[19]</sup>与Gerards等<sup>[20]</sup>学者研究结果说明幽门螺杆菌感染与IBS相关。然而,日本一项IBS流行病学调查显示,IBS不伴幽门螺杆菌感染与伴幽门螺杆菌感染的人数几乎相同<sup>[21]</sup>,与Reshetnikov等<sup>[22]</sup>报道相同。但对IBS各亚型与幽门螺杆菌感染有无关系无明确研究。至今仍不明确幽门螺杆菌感染与IBS有无关系。此次研究结果提示幽门螺杆菌与C-IBS发病无相关性既不是保护因素也不是危险因素。

有研究测得C-IBS患者直肠顺应性增高、直肠敏感性降低,肛门直肠感觉间接反映内脏感觉<sup>[23]</sup>,因此提示C-IBS患者存在内脏感觉减退,即直肠对粪便的刺激也感觉减退。因此要养成定时排便的习惯,减少粪便对直肠的刺激。与上述文献研究结果相同,定时排便可作为C-IBS的保护因素(RR = 0.120)。

国内外已有文献报道便秘和家族便秘史有一定相关<sup>[24]</sup>,本调查也提示有便秘家族史表现者便秘较没有者显著升高,其原因是和家族中生活环境的差异性有关还是和家族遗传因素有关也有赖于进一步研究,但是有研究证实C-IBS与遗传学存在着密切的关系。谭慧珍等<sup>[25]</sup>研究发现IBS患者中5-HT转运体STin2.12/10基因型的出现可能与IBS发病有关,而其中基因联合多态区等位基因L/L基因型和其与STin2.12/10基因型关联出现增加了C-IBS的发病率,而L/S基因型的出现增加了D-IBS的发病率。在一项5-HT转运体蛋白活动中基因编码的功能性多态现象与IBS关系的Meta分析中, Van Kerkhoven等<sup>[26]</sup>证明短链等位基因的发生与IBS发病风险增加并无联系, Lee等<sup>[27]</sup>的研究也同样认为总体来说两者之间并无明显联系。因此C-IBS与便秘家族史的关系有待进一步研究。

有研究表明IBS患者存在明显的焦虑、抑郁、敌对负性情感等,焦虑、抑郁等与结肠黏膜P物质表达存在相关性<sup>[28]</sup>; Lea等<sup>[29]</sup>对IBS患者流行病学研究表明超过60%的患者有精神心理

疾病, 80%的患者病情变化与精神心理因素有关。本组资料表明, 抑郁为C-IBS的危险因素(RR = 2.195), 表明患有抑郁的患者其患C-IBS的概率为正常人的2.195倍。C-IBS患者易出现抑郁状态, 一方面因长期受病痛折磨, 严重影响生活质量, 在生理、心理上产生明显的负面影响。另一方面, 心理障碍可影响脑肠轴的调控, 进一步损害排便机制, 降低疗效, 使患者缺乏信心和耐心, 降低治疗依从性<sup>[30]</sup>。随着对心理-生理医学模式认识的深入, 人们逐渐认识到人作为一个整体, 心理因素在疾病发病中重要性。

本组研究提示心理因素(抑郁)、便秘家族史为C-IBS的危险因素, 定时排便为保护因素, 因此对于有便秘家族史的人应警惕发生C-IBS的可能, 养成良好的生活习惯, 预防C-IBS的发生, 降低其发生率; 对于已患有C-IBS的患者也应当注意调节心理状态、建立并养成良好的排便习惯。

总之, C-IBS是常见的危害人们健康的一种消化道疾病, 并且其发病机制复杂, 是多因素作用的结果, 因此需要进一步研究其病因, 针对病因积极预防, 有助于降低C-IBS的发生率。

#### 4 参考文献

- Spinelli A. Irritable bowel syndrome. *Clin Drug Investig* 2007; 27: 15-33
- Katsinelos P, Lazaraki G, Kountouras J, Paroutoglou G, Oikonomidou I, Mimidis K, Koutras C, Gelas G, Tziomalos K, Zavos C, Pilpilidis I, Chatzimavroudis G. Prevalence, bowel habit subtypes and medical care-seeking behaviour of patients with irritable bowel syndrome in Northern Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 183-189
- Patel RP, Petitta A, Fogel R, Peterson E, Zarowitz BJ. The economic impact of irritable bowel syndrome in a managed care setting. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 14-20
- Boivin M. Socioeconomic impact of irritable bowel syndrome in Canada. *Can J Gastroenterol* 2001; 15 Suppl B: 8B-11B
- Hadley SK, Gaarder SM. Treatment of irritable bowel syndrome. *Am Fam Physician* 2005; 72: 2501-2506
- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- Drossman DA, Corazziari E, Delvaux M, Spiller R, Talley NJ, Thompson WG. Appendix B: Rome III diagnostic criteria for functional gastrointestinal disorders. *Rev Gastroenterol Mex* 2010; 75: 511-516
- Bielefeldt K, Waite L, Abboud FM, Conklin JL. Nongenomic effects of progesterone on human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996; 271: G370-G376
- Ponce J, Martínez B, Fernández A, Ponce M, Bastida G, Plá E, Garrigues V, Ortiz V. Constipation dur-

- ing pregnancy: a longitudinal survey based on self-reported symptoms and the Rome II criteria. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 56-61
- Tillisch K, Mayer EA, Labus JS, Stains J, Chang L, Naliboff BD. Sex specific alterations in autonomic function among patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2005; 54: 1396-1401
- Perveen I, Hasan M, Masud MA, Bhuiyan MM, Rahman MM. Irritable bowel syndrome in a Bangladeshi urban community: prevalence and health care seeking pattern. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 239-243
- 刘世信, 赵丽中, 段淑珍, 马玉兰, 张培达. 天津市区人群便秘患病率流行病学研究. *中国实用外科杂志* 1994; 14: 533-535
- 李增金, 于普林, 时秋宽, 姜中央, 褚德法, 吕锡珠. 北京市部分地区城乡老年人便秘的现状调查. *中国老年学杂志* 2000; 20: 1-2
- Voderholzer WA, Schatke W, Mühlendorfer BE, Klauser AG, Birkner B, Müller-Lissner SA. Clinical response to dietary fiber treatment of chronic constipation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 95-98
- Fishman L, Lenders C, Fortunato C, Noonan C, Nurko S. Increased prevalence of constipation and fecal soiling in a population of obese children. *J Pediatr* 2004; 145: 253-254
- Wong ML, Wee S, Pin CH, Gan GL, Ye HC. Sociodemographic and lifestyle factors associated with constipation in an elderly Asian community. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1283-1291
- Meshkinpour H, Selod S, Movahedi H, Nami N, James N, Wilson A. Effects of regular exercise in management of chronic idiopathic constipation. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2379-2383
- Tuteja AK, Talley NJ, Joos SK, Woehl JV, Hickam DH. Is constipation associated with decreased physical activity in normally active subjects? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 124-129
- Locke CR, Talley NJ, Nelson DK, Haruma K, Weaver AL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Helicobacter pylori and dyspepsia: a population-based study of the organism and host. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1906-1913
- Gerards C, Leodolter A, Glasbrenner B, Malfertheiner P. H. pylori infection and visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis* 2001; 19: 170-173
- Kawamura A, Adachi K, Takashima T, Yuki M, Ono M, Kinoshita Y. Prevalence of irritable bowel syndrome and its relationship with Helicobacter pylori infection in a Japanese population. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1946
- Reshetnikov OV, Kurilovich SA, Denisova DV, Zav'ialova LG, Svetlova IO, Tereshonok IN, Krivenchuk NA, Eremeeva LI. [Prevalence and risk factors of the development of irritable bowel syndrome in adolescents: a population study]. *Ter Arkh* 2001; 73: 24-29
- 查慧, 谢小平, 侯晓华. 不同类型便秘患者直肠敏感性的差异. *临床内科杂志* 2006; 23: 488-491
- 吕农华, 谢勇, 黄德强, 王崇文, 袁兆康, 胡锦涛, 李钢生, 熊文坚. 南昌市部分人群中慢性便秘的流行病学调查分析. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 236-237
- 谭慧珍, 谢军, 冯崇廉, 曾晖, 梁庆辉, 周鹏志. 肝郁脾虚型肠易激综合征与5-羟色胺转运体基因多态性的关系. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 147-149

#### ■应用要点

本文的研究结果可以用于指导临床预防与治疗便秘型肠易激综合征。

### ■同行评价

本文内容较新颖,具有一定的临床指导意义.

- 26 Van Kerkhoven LA, Laheij RJ, Jansen JB. Meta-analysis: a functional polymorphism in the gene encoding for activity of the serotonin transporter protein is not associated with the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 979-986
- 27 Lee DY, Park H, Kim WH, Lee SL, Seo YJ, Choi YC. [Serotonin transporter gene polymorphism in healthy adults and patients with irritable bowel syndrome]. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 18-22
- 28 张瑜, 卜平. IBS患者肠粘膜5-HT物质的表达及其与焦虑、抑郁的相关性研究. *中外健康文摘* 2010; 7: 371-373
- 29 Lea R, Whorwell PJ. New insights into the psychosocial aspects of irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 343-350
- 30 Lembo A, Camilleri M. Chronic constipation. *N Engl J Med* 2003; 349: 1360-1368

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 •

## 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)

# MNA联合SGA在炎症性肠病患者营养评价中的应用

何文英, 朱芳丽, 李秀荣, 张晓岚

何文英, 朱芳丽, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

李秀荣, 河北医科大学第二医院肿瘤会诊部 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 此课题由张晓岚与何文英设计; 研究过程由何文英与朱芳丽操作完成; 数据分析由何文英与李秀荣完成; 本论文写作由何文英、朱芳丽及张晓岚完成。

通讯作者: 张晓岚, 教授, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化科. xiaolanzh@126.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2011-01-04 修回日期: 2011-04-23

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-05-18

## Evaluation of nutritional status in patients with inflammatory bowel disease using mini nutritional assessment and subjective global assessment

Wen-Ying He, Fang-Li Zhu, Xiu-Rong Li, Xiao-Lan Zhang

Wen-Ying He, Fang-Li Zhu, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Xiu-Rong Li, Department of Tumor Consultation, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2011-01-04 Revised: 2011-04-23

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-05-18

### Abstract

**AIM:** To explore the application of nutritional assessment in patients with inflammatory bowel disease (IBD).

**METHODS:** Mini nutritional assessment (MNA) and subjective global assessment (SGA) were used to assess nutritional status in IBD patients. Hemoglobin (Hb), total lymphocyte count (TLC), prealbumin (PA), serum albumin (ALB), Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, were measured.

**RESULTS:** Pearson's correlation analysis showed that MNA score was positively correlated with Hb, ALB, and Na<sup>+</sup> ( $r = 0.281, P = 0.013; r = 0.413, P = 0.000; r = 0.309, P = 0.014$ ). Kendall's

tau-b correlation analysis showed that MNA score was positively correlated with SGA score in assessing nutritional status in IBD patients ( $r = 0.772, P = 0.000$ ).

**CONCLUSION:** Combined MNA and SGA are more accurate and might produce better results in assessing nutritional status in patients with IBD.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Malnutrition; Mini nutritional assessment; Subjective global assessment; Nutritional assessment

He WY, Zhu FL, Li XR, Zhang XL. Evaluation of nutritional status in patients with inflammatory bowel disease using mini nutritional assessment and subjective global assessment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1529-1533

### 摘要

**目的:** 探讨炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者营养评估的合理方法。

**方法:** 选择微型营养评定法(MNA)联合营养状况主观综合评估(SGA)对IBD患者进行营养状况评估, 同时结合包括血红蛋白(Hb)、总淋巴细胞计数(TLC)、前白蛋白(PA)、白蛋白(ALB)以及血浆钠、钾和钙浓度等实验室指标进行相关性分析。

**结果:** Pearson相关分析显示, MNA值与Hb、ALB、和Na<sup>+</sup>有显著相关性( $r = 0.281, P = 0.013; r = 0.413, P = 0.000; r = 0.309, P = 0.014$ )。Kendall's tau-b相关方法分析证明MNA与SGA两种营养评估方法具有很好的相关性( $r = 0.772, P = 0.000$ )。

**结论:** MNA联合SGA对IBD患者进行营养状况评估科学、准确。

**关键词:** 炎症性肠病; 营养不良; 微型营养评定法; 营养状况主观综合评估; 营养评价

何文英, 朱芳丽, 李秀荣, 张晓岚. MNA联合SGA在炎症性肠病患者营养评价中的应用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(14): 1529-1533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1529.asp>

### ■背景资料

微型营养评定法(MNA)是20世纪90年代由Guigoz等提出的营养评价方法, 该方法是一种简易、快捷的无创性营养评价方法, 适合护理人员操作。Margareta和Vellas的研究均发现, MNA法可以很好地用来评估老年人营养。

### ■同行评议者

万军, 主任医师, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

## ■ 研发前沿

目前,国内已经把MNA应用于恶性梗阻性黄疸、糖尿病、肠道肿瘤和慢性病住院老年人的营养状况评估,但该方法是否适用于IBD患者的营养状况评估国内尚无报道。

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。营养不良是IBD患者常见和突出的并发症,严重影响其免疫功能、生活质量和长期存活率。近20年来,随着生活和工作环境的改变,IBD在我国的发病率呈逐年增高趋势,近5年的患者数是20世纪90年代同期的8倍<sup>[1]</sup>。目前国内关于IBD患者营养不良营养评价方法的研究较少。微型营养评定法(mini nutritional assessment, MNA)是20世纪90年代由Guigoz等提出的营养评价方法,该方法是一种简易、快捷的无创性营养评价方法,适合护理人员操作<sup>[2,3]</sup>。Margareta和Vellas的研究均发现,MNA法可以很好地用来评估老年人营养<sup>[4,5]</sup>。John Hoffer提出的营养状况主观综合评估(subjective global assessment, SGA)体系是应用最早、最多的定性评估蛋白质-能量营养状况的方案,具有可重复性<sup>[6,7]</sup>。但是,MNA和SGA是否适合于IBD患者的营养状况评估尚不清楚。本研究目的就是通过MNA和SGA结合实验室相关指标对IBD患者进行营养状态评估,探讨MNA与SGA在IBD患者中的应用价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-09/2010-02在河北医科大学第二医院就诊的IBD患者,入选病例均符合“对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年,济南)”制订的诊断标准<sup>[8]</sup>。符合纳入标准的共计85例,其中男46例,女39例。年龄13-75(平均为42.51±14.65)岁。病例入选标准:(1)有持续或反复发作的黏液脓血便,可伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状,可有有关节、皮肤、眼、口及肝胆等肠外表现;(2)结肠镜检查可见病变多从直肠开始,呈连续性、弥漫性分布,且有以下之一:黏膜血管纹理模糊、紊乱、充血、水肿、质脆、出血及脓性分泌物附着,可见黏膜粗糙、细颗粒状;病变明显处可见弥漫性多发性糜烂或溃疡;慢性病变者结肠囊袋变浅或消失,假息肉及桥型黏膜形成;(3)除外细菌性痢疾、阿米巴痢疾、血吸虫病、肠结核及缺血性、放射性结肠炎;(4)意识清楚,病情稳定,具有语言交流能力,并且愿意参加本研究。剔除病例标准:合并大肠肿瘤者;合并全身其他部位肿瘤及恶性血液病者;合并中枢神经系统疾病者,如脑炎、脑瘤、脑实质或脑神经先天发育

异常等;妊娠期或哺乳期妇女;合并心肌肥大者;病理发现有结节病样肉芽肿者;未定型结肠炎者;病情危重无法耐受结肠镜检查者;严重认知障碍、精神病和终末期患者。

### 1.2 方法

1.2.1 MNA评价:由经培训的专业人员采用统一的问卷进行评定。内容有:(1)人体测量:体质量指数(body mass index, BMI)、上臂围(AC)、上臂肌围(AMC)、小腿围和近3 mo体质量丢失情况等;(2)整体评定:包括生活、心理、用药情况、医疗和疾病状况等;(3)膳食评估:包括食欲、每天摄食量和摄食行为模式等;(4)主观评定:对自身健康及营养状况的评价等。上述各项评分相加得MNA总分。判断标准为:MNA≥24,提示营养状态良好;17≤MNA<24,提示存在发生营养不良的危险性;MNA<17,提示营养不良<sup>[2,3]</sup>。

1.2.2 SGA评价:SGA营养评估由医生了解患者消化道症状、饮食摄入不足持续时间、体重减轻程度、活动或功能状况等病史,检查有无肌肉萎缩、脂肪丢失及水肿和腹水等体征。分为:营养良好(A级)、轻中度营养不良(B级)、重度营养不良(C级)。评定某一级别所含内容大于4项即可确定<sup>[6,7]</sup>。

1.2.3 实验室相关指标测定:(1)血红蛋白与总淋巴细胞计数测定:血红蛋白(hemoglobin, Hb)和总淋巴细胞计数(total lymphocyte count, TLC)采用全自动血常规监测仪测定。TLC>(2.5-3.0)×10<sup>9</sup>/L者为营养正常,(1.8-1.5)×10<sup>9</sup>/L者为轻度营养不良,(1.5-0.9)×10<sup>9</sup>/L者为中度营养不良,<0.9×10<sup>9</sup>/L者为重度营养不良。TLC虽不能及时、准确的反映营养状况的变化,但他是评价免疫功能的简易方法;(2)白蛋白、前白蛋白、电解质的检测:白蛋白(albumin, ALB)以及血浆钠、钾和钙浓度采用美国雅培公司Aeroset全自动生化分析仪检测;前白蛋白(prealbumin, PA)采用双抗体夹心ELISA法测定。

**统计学处理** 计量资料数据均以mean±SD表示,用SPSS13.0软件进行统计分析。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间采用SNK法作两两比较。营养指标的相关性采用Pearson相关与Kendall's tau-b相关分析。*P*<0.05具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 IBD患者临床情况 85例IBD患者中54例主

表 1 患者一般情况 (mean ± SD)

项目	男(n = 46)	女(n = 39)	合计(n = 85)
MNA	17.60 ± 4.98	17.50 ± 5.15	17.55 ± 5.03
年龄(岁)	43.23 ± 14.39	41.55 ± 15.19	42.51 ± 14.65
Hb(g/L)	111.51 ± 43.07	112.05 ± 24.98	111.78 ± 34.98
ALB(g/L)	37.85 ± 8.76	39.30 ± 8.10	38.56 ± 8.42
PA(mg/L)	262.66 ± 148.34	224.44 ± 152.08	244.26 ± 149.97
TLC(10 <sup>9</sup> /L)	1.66 ± 0.78	2.48 ± 1.98 <sup>a</sup>	2.07 ± 1.55
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	2.21 ± 0.44	2.18 ± 0.25	2.19 ± 0.34
K <sup>+</sup> (mmol/L)	3.71 ± 0.75	3.67 ± 0.59	3.69 ± 0.66
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	138.13 ± 4.91	138.73 ± 4.88	138.45 ± 4.87

<sup>a</sup>P<0.05 vs 男性组.

■应用要点  
MNA联合SGA  
对IBD患者进行  
营养状况评估科  
学、准确.

表 2 SGA营养评价结果

营养状态	n	构成比(%)
重度营养不良(C)	29	34.11
轻中度营养不良(B)	38	44.71
营养良好(A)	18	21.18

表 3 MNA营养评价结果 (mean ± SD)

营养状态	n	构成比(%)	MNA评分
营养不良(C)	37	43.53	12.84 ± 2.94 <sup>a,c</sup>
潜在营养不良(B)	37	43.53	20.03 ± 1.82 <sup>a</sup>
营养正常(A)	11	12.94	25.09 ± 1.45

<sup>a</sup>P<0.05 vs 营养正常组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 潜在营养不良组.

要临床表现为黏液脓血便, 18例主要表现为便血, 7例仅表现为腹痛, 6例有发热表现. CD患者2例, UC患者83例. UC患者中慢性复发型35例、慢性持续型23例、暴发型6例和初发型19例. 根据“对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南)”制定的IBD诊断标准, 结肠镜检查可见中、重度患者黏膜充血水肿、有糜烂、溃疡形成, 多有脓性或脓血性黏液附着, 轻度患者黏膜高度充血水肿, 黏膜呈颗粒感, 质脆, 易出血. 男女IBD患者中年龄、MNA值、血清Hb、ALB、PA、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>没有统计学差异, 但是TLC在女性患者明显高于男性患者(2.48 × 10<sup>9</sup>/L ± 1.98 × 10<sup>9</sup>/L vs 1.66 × 10<sup>9</sup>/L ± 0.78 × 10<sup>9</sup>/L, P = 0.019, 表1).

2.2 SGA营养评价结果 在85例IBD患者中, A级占21.18%, B级占44.71%, C级占34.11%(表2).

2.3 MNA营养评价结果 根据MNA评价结果, 本研究中IBD患者营养不良率为43.53%, 潜在营养不良率亦为43.53%, 而营养正常率仅为12.94%(表3).

2.4 MNA与生化营养评定指标的相关性 年龄、TLC、PA、K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>浓度在营养不良组、潜在营养不良组及营养正常组间无明显差异. 在营养不良组, Hb水平明显低于潜在营养不良组, 具有统计学意义(98.94 g/L ± 40.11 g/L vs 124.00 g/L ± 22.68 g/L, P = 0.003); 而与营养正常组比较

没有统计学意义. ALB水平, 营养不良组低于潜在营养不良组(34.75 g/L ± 7.69 g/L vs 41.43 g/L ± 8.05 g/L, P = 0.001)及营养正常组(34.75 g/L ± 7.69 g/L vs 42.78 g/L ± 6.39 g/L, P = 0.003), 存在统计学差异. 在营养不良组Na<sup>+</sup>水平明显低于潜在营养不良组, 存在统计学差异(136.91 mmol/L ± 4.37 mmol/L vs 140.00 mmol/L ± 5.42 mmol/L, P = 0.018), 而与营养正常组之间无明显差别. Pearson相关分析显示, MNA值与Hb、ALB、和Na<sup>+</sup>有显著相关性(表4, 5).

2.6 MNA法与SGA法的相关性 采用Kendall's tau-b相关方法分析得出的结果显示, 在评估IBD患者营养状态时, MNA与SGA两种营养评估方法具有很好的相关性(r = 0.772, P = 0.000).

### 3 讨论

营养状况与IBD的发病率、发病机制以及治疗方法的选择密切相关. 由于饮食摄入减少、肠道丢失等原因, 营养不良是IBD的常见并发症之一. 保证足够的热量和蛋白质摄入可以控制炎症的发展、维持缓解、减少复发、并明显改善预后, 因此, 营养支持在IBD的发生和发展过程中均具有重要作用. 进行营养支持治疗前, 就IBD患者的营养状况做出及时、准确的评估, 对治疗方案的选择至关重要. 目前, 国内已经把

### 同行评价

本文选题新颖,具有一定的临床实用价值。

表 4 生化指标评价结果 (mean ± SD)

项目	营养不良	潜在营养不良	营养正常
年龄(岁)	40.97 ± 15.82	42.97 ± 14.15	47.14 ± 12.10
Hb(g/L)	98.94 ± 40.11 <sup>c</sup>	124.00 ± 22.68	113.87 ± 38.60
ALB(g/L)	34.75 ± 7.69 <sup>bc</sup>	41.43 ± 8.05	42.78 ± 6.39
PA(mg/L)	336.49 ± 163.98	214.57 ± 141.13	248.66 ± 149.71
TLC(× 10 <sup>9</sup> /L)	1.77 ± 1.02	2.27 ± 1.74	2.40 ± 2.23
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	2.11 ± 0.43	2.24 ± 0.23	2.34 ± 0.22
K <sup>+</sup> (mmol/L)	3.69 ± 0.76	3.68 ± 0.64	3.71 ± 0.39
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	136.91 ± 4.37 <sup>c</sup>	140.00 ± 5.42	139.01 ± 3.07

<sup>a</sup>P<0.05 vs 营养正常组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 潜在营养不良组。

表 5 生化指标与MNA营养评价结果的Pearson相关分析

	年龄	Hb	TLC	ALB	PA	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
r值	0.152	0.281	0.121	0.413	-0.049	0.270	0.018	0.309
P值	0.215	0.013	0.291	0.000	0.726	0.024	0.086	0.014

MNA应用于恶性梗阻性黄疸、糖尿病、肠道肿瘤和慢性病住院老人的营养状况评估<sup>[9-12]</sup>,但该方法是否适用于IBD患者的营养状况评估国内尚无报道。我们在总结吸收前面研究的基础上,分别采用SGA和MNA方法评价IBD患者的营养状况,以期验证MNA在IBD患者营养状态评估中的应用价值以及MNA与SGA指标的相关性。

根据SGA体系进行评估,纳入研究的85例IBD患者中,A级占21.18%,B级占44.71%,C级占34.11%。本研究应用MNA方法发现IBD患者中营养不良率为43.53%,潜在营养不良患者同样为43.53%,营养异常率高达87.06%。由于该类患者营养不良及潜在营养不良率高,因此在患者入院后应立即根据营养评价结果给予合理的营养支持,以降低疾病活动度,延缓手术,并降低病死率。本研究中营养不良、潜在营养不良及营养正常组的年龄、PA和TLC差异无统计学意义,考虑其原因可能为患者之间疾病类型及病程长短相似,肝脏功能没有受损,蛋白合成能力比较一致;另外TLC反映了IBD患者免疫功能相似。我们的研究发现,营养不良组Hb比潜在营养不良组明显下降;而营养正常组与这两组比较在统计学上却没有差异,这反映了潜在营养不良组患者Hb的合成相对于营养不良组可能存在更好的代偿机能,并不除外潜在营养不良组患者腹泻程度较轻,体液丢失后出现短暂的血液浓缩而导致Hb浓度假性增高。MNA评估发现营

养不良患者与营养正常和潜在营养不良组比较ALB明显降低,这是因为ALB是反映人体蛋白质合成与代谢的一个很重要的分子,IBD患者往往病情反复,病程比较长,营养不良患者容易出现低蛋白血症。贫血在IBD患者中很常见,CD患者贫血常见的原因包括铁、叶酸和维生素B12缺乏;UC患者贫血常是单一铁的缺乏所引起,肠溃疡和便血是铁丢失的主要原因。对电解质的评估发现,3组间K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>没有统计学差异,而Na<sup>+</sup>营养不良患者比潜在营养不良组明显降低,这与营养不良患者长期腹泻有一定的关系,潜在营养不良组的Na<sup>+</sup>浓度与正常组无统计学差异,可能同样与体液丢失后出现短暂的血液浓缩有关。

目前,对于营养状况的评价尚无金标准,应用单一营养评价指标存在一定缺陷,如人体测量指标仅能反映较长时间内营养状态变化;ALB半衰期长达20 d左右,对营养状况和蛋白代谢在短期内变化不敏感;PA虽然在判断蛋白质急性改变方面较ALB更为敏感,但与IBD患者病情没有相关性。MNA评价内容中已涵盖了人体测量指标如BMI、AMC、AC及体质量变化情况,且本研究发现:根据MNA结果分级的营养不良、潜在营养不良及营养正常3组患者中,MNA值与Hb、ALB、Ca<sup>2+</sup>和Na<sup>+</sup>有显著相关性。由此表明MNA方法与人体测量指标及生化营养指标均相关,可以用于IBD患者的营养状况评价。

MNA方法以量表形式进行检测, 评价内容包括人体测量、整体评定、膳食评定和主观评定, 更能综合反映机体的营养状况, 并依据得分多少对研究对象作出营养不良程度上的判别, 更有利于早期发现营养不良患者。

SGA方法作为定性评估蛋白质-能量营养状况方案, 为临床医生综合判断营养不良提供了一定依据。相较于SGA方法, MNA因为有客观的量化指标, 所以在评估IBD患者的营养状况方面更客观、简单和准确, 并能及时发现潜在的营养不良风险。因此, 我们认为联合应用MNA方法与SGA方法对IBD患者进行营养状况评估会更科学, 误差也会有所缩小, 可以更好地保证医生和护理人员对IBD患者病情判断的准确性。

总之, MNA适合于IBD患者的营养评价, 与SGA、Hb、ALB之间有良好相关性, 在IBD患者中应用MNA问卷进行营养状况评价有一定实用价值。联合应用MNA与SGA对IBD患者进行营养状况评估会更科学, 误差也会有所缩小, 可以更好地保证医生和护理人员对IBD患者病情判断的准确性。

#### 4 参考文献

- 1 肠内外营养学分会指南与规范编委会. 炎症性肠病. 中国临床营养杂志 2008; 16: 67-69
- 2 Gulgoz Y, Vellas B, Garry PJ. Mini Nutritional Assessment: a practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Facts Res Gerontol* 1994; 4 (Suppl 2): 15-59
- 3 Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ. Assessing the nutritional status of the elderly: The Mini Nutritional Assessment as part of the geriatric evaluation. *Nutr Rev* 1996; 54: S59-S65
- 4 Persson MD, Brismar KE, Katzarski KS, Nordenström J, Cederholm TE. Nutritional status using mini nutritional assessment and subjective global assessment predict mortality in geriatric patients. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 1996-2002
- 5 Vellas B, Villars H, Abellan G, Soto ME, Rolland Y, Guigoz Y, Morley JE, Chumlea W, Salva A, Rubenstein LZ, Garry P. Overview of the MNA--Its history and challenges. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 456-463; discussion 463-465
- 6 Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11: 8-13
- 7 Hasse J, Strong S, Gorman MA, Liepa G. Subjective global assessment: alternative nutrition-assessment technique for liver-transplant candidates. *Nutrition* 1993; 9: 339-343
- 8 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). 中华消化杂志 2007; 27: 545-550
- 9 田莉莉, 李丽, 赵洁, 马兴涛, 王若乔, 马瑞珩, 叶志霞. 微型营养评定法在恶性梗阻性黄疸患者营养评价中的应用. 解放军护理杂志 2007; 24: 4-6, 9
- 10 金科美, 华金中. 简易营养评价法在评价老年糖尿病患者营养状况中的应用. 中国临床营养杂志 2008; 16: 26-30
- 11 陆连芳, 周岩冰. 微型营养评定法评价胃肠道肿瘤病人营养状况的应用. 肠外与肠内营养 2008; 15: 239-241
- 12 饶志勇, 胡雯, 袁红, 王鸿. 微型营养评价法评价慢病住院老人的营养状况. 现代预防医学 2008; 35: 673-675, 685

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》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)